

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

Faculté des Sciences
Département de Chimie



Domaine : **Science de la matière**
Filière : **Chimie**
Spécialité : **Chimie pharmaceutique**

Mémoire de Master

Thème

**Extraction de substances bioactives – Optimisation
Criblage phytochimique et activités biologiques du
*Myrtus Communis***

Présenté par :

BESSACI Melissa

Soutenu publiquement, le 25 / 06 / 2024, *devant le Jury composé de :*

Mme IBOUKHOULEF Hamida	MCA	UMMTO	Présidente
Mme BENZAOUZ Amina	MCA	UMMTO	Promotrice
Mme AYATI Fadila	MCA	UMMTO	Examinatrice

Session 2023 / 2024

Remerciements

À l'issue de ce modeste labeur, je souhaite adresser mes plus sincères et profonds remerciements à toutes les âmes généreuses qui, de près ou de loin, ont contribué, par leur soutien et leurs efforts, à l'accomplissement de ce travail.

Ce travail a été mené au Laboratoire de Chimie Pharmaceutique du Département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Mouloud Mammeri (UMMTO) et au Laboratoire de Recherche de Physique et Chimie des Matériaux (LPCM) de la même institution, sous la direction éclairée de Madame Benazzouz Amina, Maître de conférences à l'UMMTO. À elle, j'exprime ma plus profonde gratitude pour l'encadrement dont elle m'a honorée, empreint d'une compétence remarquable, d'un enthousiasme indéfectible et d'une disponibilité sans faille. Les efforts considérables qu'elle a déployés, le temps précieux qu'elle m'a généreusement accordé, ainsi que ses conseils avisés et ses remarques perspicaces, ont été pour moi un phare guidant mes pas tout au long de ce travail.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance sincère pour son optimisme inébranlable et la confiance qu'elle m'a prodiguée, sans lesquels ce projet n'aurait pu voir le jour.

Je tiens également à remercier le responsable du Laboratoire de Recherche de Physique et Chimie des Matériaux (LPCM) pour avoir donné accès au laboratoire, d'avoir mis à disposition tout le matériel nécessaire pour le bon déroulement des expériences.

J'exprime mes profonds remerciements pour

Mme IBOUKHOULEF Hamida maitre de conférence A à L'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour l'honneur qu'elle nous a fait pour assurer la présidence du jury.

Mme AYATI Fadila maitre de conférence A à L'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou d'avoir bien voulu accepté de juger ce travail.

Je souhaite également adresser mes remerciements chaleureux à tous mes enseignants universitaires dont l'engagement a enrichi mon parcours académique. Leur précieuse contribution mérite notre profonde reconnaissance.

Dédicaces

« En vérité, le Chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout »

Albert Camus.

« Je dédie ce travail à ma famille, dont le soutien indéfectible m'a permis d'atteindre cet objectif »

« A toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail par leur soutien, leur aide et leurs encouragements »

« A tous ceux qui m'aime, A tous ceux que j'aime »

Résumé

Cette étude a pour objectif d'examiner et d'analyser l'huile essentielle de *Myrtus communis* L., ainsi que les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles, récoltées dans la région de la Kabylie en Algérie.

Le criblage des facteurs a permis d'identifier ceux ayant une influence significative sur le rendement de l'huile essentielle. Par la suite, l'optimisation des conditions opératoires de l'extraction assistée par ultrasons de l'essence végétale, effectuée à l'aide de la méthode des surfaces de réponse, nous a permis de déterminer les paramètres optimaux influençant le rendement de l'essence. Ces paramètres incluent le temps de sonication et le rapport entre la masse de matière végétale et la masse d'eau.

Le screening phytochimique et la caractérisation de l'huile essentielle reflète la richesse de notre espèce végétale en métabolites secondaire influençant positivement les activités biologiques étudiées. L'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de réduction du radical DPPH et la méthode FRAP (réduction du fer ferrique), a révélé que l'huile essentielle présente une activité antioxydante modérément forte, tandis que les deux extraits possèdent un pouvoir antioxydant très élevé.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro a révélé un taux élevé d'inhibition de la dénaturation des protéines par le SAB, témoignant ainsi d'une capacité anti-inflammatoire particulièrement prononcée de l'huile essentielle. L'estimation de l'effet antimicrobien des échantillons a été déterminée, par la technique de méthode de microdilution en milieu liquide. Les résultats obtenus varient d'une souche à l'autre., avec l'effet inhibiteur le plus marqué observé contre *Staphylocoque aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots clés : huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique, optimisation, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité antibactérienne.

Abstract

This study aims to examine and analyze the essential oil of *Myrtus communis* L., as well as the aqueous and ethanolic extracts of the leaves, harvested in the Kabylie region of Algeria. The screening of factors allowed us to identify those having a significant influence on the yield of the essential oil. Subsequently, the optimization of the operating conditions for ultrasound-assisted extraction of the plant essence, performed using the response surface methodology, enabled us to determine the optimal parameters influencing the yield of the essence. These parameters include the sonication time and the ratio between the mass of plant material and the mass of water.

The phytochemical screening and characterization of the essential oil reflect the richness of our plant species in secondary metabolites positively influencing the studied biological activities. The evaluation of antioxidant power using the DPPH radical reduction method and the FRAP method (ferric reducing antioxidant power) revealed that the essential oil exhibits moderately strong antioxidant activity, while the two extracts possess very high antioxidant power.

The evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity revealed a high rate of inhibition of protein denaturation by the essential oil, thus demonstrating a particularly pronounced anti-inflammatory capacity of the essential oil. The estimation of the antimicrobial effect of the samples was determined using the microdilution method in liquid medium. The results obtained vary from one strain to another, with the most marked inhibitory effect observed against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords : essential oil, aqueous extract, ethanolic extract, optimization, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, antibacterial activity.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
INTRODUCTION GENERALE	1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le <i>Myrtus communis</i> L	2
I.1. Description botanique	2
I.2. Classification	2
I.3. Distribution géographique du genre <i>Myrtus</i>	3
I.4. Utilisations	4
I.4. Utilisations médicinales traditionnelles	4
I.5. Utilisations culinaires, cosmétiques et industrielles	4
II. Généralités sur les huiles essentielles	4
II.1. Localisation des huiles essentielles dans la plante	4
II.2. Conservation des huiles essentielles	5
II.3. Composition chimique des huiles essentielles	5
II.3.1. Composés terpéniques	5
a. Hémiterpènes (C ₅ H ₈)	5
b. Monoterpènes (C ₁₀ H ₁₆)	5
c. Sesquiterpènes (C ₁₅ H ₂₄)	6
II.3.2. Composés aromatiques	7
II.3.3. Composés d'origines diverses	8
II.4. Facteurs de variabilité	8
II.4.1. Origine botanique	8
II.4.2. L'organe producteur	8
II.4.3. Origine géographique	8
II.5. Huile essentielle du <i>Myrtus communis</i> L	9
III. Effets thérapeutiques du <i>Myrtus communis</i> L	9
III.1. Effets thérapeutiques de l'huile essentielle du Myrte	10
III.2. Les métabolites secondaires	10
III.3. Effets thérapeutiques des métabolites secondaires du Myrte	11
III.4. Activité antioxydante du myrte	11
III.5. Activité anti-inflammatoire du myrte	12
III.6. Activité antibactérienne	12
IV. Procédé d'extraction	13
IV.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	13
IV.2. L'expression à froid	13
IV.3. Extraction par hydrodistillation	14
IV.4. Extraction par micro-ondes	14
IV.5. Extraction assistée par ultrasons	14
V. Méthodologie des plans d'expériences	15
V.1. Définitions	15
V.1.1 Facteur	15
V.1.2 Réponse	15
V.1.3 Facteur significatif	16
V.1.4 Variables codées	16
V.1.5 Matrice d'expériences	16
V.1.6 Plan d'expérimentation	17
V.1.7 Méthodologie des plans d'expériences	17
V.2. Etude de criblage (screening)	17

V.3. Méthodologie des surfaces de réponse.....	18
V.3.1. Plan composite centrée (PCC)	18
VI.3.2. Modèle mathématique.....	19
V.3.3. Validation du modèle	20

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel.....	21
I.1. Matériel végétal	21
II. Méthodologie	21
II.1. Extraction de l'huile essentielle du Myrtus communis	21
II.1.1. Extraction par hydrodistillation.....	21
II.1.2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	22
II.1.3. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation assistée par ultrasons	22
III. Caractérisation de l'huile essentielle du Myrtus communis L.	22
III.1. Caractéristiques organoleptiques	22
III.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	23
III.2.1. Indice de réfraction.....	23
III.2.2. Indice d'acide.....	23
III.2.3. Indice de saponification.....	23
III.2.4. Indice d'ester.....	24
III.2.5. Potentiel hydrogène.....	24
IV. Screening phytochimique	24
IV.1. Tests phytochimiques.....	24
IV.2. Préparation des extraits	25
IV.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique.....	25
IV.2.2. Préparation de l'extrait aqueux.....	25
IV.3. Détermination de la teneur des polyphénols totaux.....	26
IV.4. Estimation quantitative des flavonoïdes totaux.....	26
V.1. Evaluation de l'activité antioxydante du myrte	27
V.1.1. Evaluation du pouvoir anti radicalaire par la méthode de DPPH	27
V.1.2. Evaluations du pouvoir anti-radicalaire par la méthode du FRAP.....	28
V.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire du myrte	29
V.2.1. Inhibition de la dénaturation des protéines.....	29
V.3. Evaluation de l'activité antibactérienne	30
V.3.1. Préparation des cultures	30
V.3.3. L'ensemencement.....	30
V.3.4. Détermination de l'effet antibactérien (aromatogramme).....	30
V.3.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	31

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Extraction de l'huile essentielle du Myrtus communis L.	32
I.1. Détermination de la Cinétique d'extraction et le rendement.....	32
I.2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	33
I.3. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation assistée par ultrasons.....	34
II. Modélisation de l'extraction de l'huile essentielle	34
II.1. Criblage des facteurs.....	35
II.1.1. Domaine expérimental des facteurs.....	35
II.1.2. Construction de la matrice des expériences	35
II.1.3. Estimation des poids des facteurs.....	36
II.1.4. Etude graphique des effets du rendement.....	37
II.2. Optimisation du rendement d'extraction de l'huile essentielle de Myrte.....	38
II.2.1. Domaine de variation des facteurs.....	38
II.2.3. Modèle mathématique.....	39
II.2.4. Qualité de prédiction.....	39
a. Fonction de variance de prédiction.....	40

b. Isovariance par rotation	40
II.3.2. Modèle mathématique affiné (avec pointstests).....	41
II.4. Analyse des résidus.....	42
II.5. Analyse de la variance (ANOVA)	42
II.6. Optimisation.....	42
III. Screening phytochimique	43
III.1. Teneur en eau	43
III.2. Tests phytochimiques.....	44
III.3. Détermination de la teneur des polyphénols totaux.....	45
III.4. Estimation quantitative des flavonoïdes totaux	47
III.5. Caractérisation de l'huile essentielle du <i>Myrtus communis</i> l.	48
III.5.1. Caractéristiques organoleptiques.....	48
III.5.2. Caractéristiques physico-chimiques	48
III.5.2.1. Indice de réfraction.....	48
III.5.2.2. Indice d'acide.....	48
III.5.2.3. Indice de saponification.....	49
III.5.2.4. Indice d'ester.....	49
III.5.2.5. Potentiel hydrogène	49
IV. Evaluation de l'activité antioxydante du myrte	49
IV.1. Evaluation du pouvoir anti radicalaire par la méthode de DPPH.....	49
IV.1.1. Détermination de la IC50.....	51
IV.2. Evaluations du pouvoir anti-radicalaire par la méthode du FRAP.....	52
V. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire du myrte.....	54
VI. Evaluation de l'activité antibactérienne	55
VI.1. Détermination de l'effet antibactérien (aromatogramme)	55
VI.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	56
CONCLUSION GENERALE	58

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

ABREVIATIONS

% : pourcentage

A.pseudomonas : Pseudomonas aeruginosa

AA : Acide Ascorbique

ADN : acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association française de normalisation.

ANOVA : Analysis of variance (analyse de variance)

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ATCC : American Type Culture Collection

Bouillon MH : BOUILLON DE MUELLER-HINTON

CG/MS : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

CMI : concentration minimale inhibitrice

Ddl : degré de liberté

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

E.coli : Escherichia coli

EA : Extrait Aqueux

EAG/g : Equivalent acide gallique/g

EE : Extrait Ethanolique

EQ/g : Equivalent quercétine/g

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

HE : Huile Essentielle

HIV : virus de l'immunodéficience humaine

IA : Indice d'Acide

IC50 : concentration inhibitrice médiane

IE : Indice d'Ester

IR : Infra-Rouge

IS : Indice de Saponification

ISO : International Organization for Standardization (Organisation internationale de normalisation).

KI : Kovat index.

MAHD : microwave-assisted hydrodistillation (hydrodistillation assistée par micro-ondes)

MRS : Méthodologie des surfaces de réponses

PCC : Plan composite centré

pH : potentiel Hydrogène

PI : Pouvoir Inhibiteur

PR : Pouvoir Réducteur

R² : coefficients de détermination

R_A² : coefficients de détermination ajusté

S.aureus : Staphylococcus aureus

SAB : bovine serum albumin

SCEL : somme des carrés des écarts dues à la liaison

SCER : somme des carrés des écarts des résidus

SCET : somme totale des carrés des écarts

TE : Teneur en eau

UV-Vis : ultraviolet-visible

Var : Variance

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.1 : Taxonomie de l'espèce <i>Myrtus communis</i> L	3
Tableau I.2 : Analyse GC/MS de l'huile volatile provenant de feuilles de <i>Myrtus communis</i>	9
Tableau I.3 : Activités biologiques de certains composés terpéniques	10
Tableau I.4 : activités biologiques des métabolites secondaires du Myrte.....	11
Tableau I.5 : tableau ANOVA.....	20

MATERIEL ET METHODES

Tableau II.1 : Références et familles des souches bactériennes utilisées	21
---	----

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III.1 : résultats du rendement d'extraction a différentes périodes de temps	33
Tableau III.2 : rendement extraction assistée par micro-ondes.	34
Tableau III.3 : rendement d'extraction assistée par ultrasons.....	34
Tableau III.4 : Domaine expérimental des facteurs.....	35
Tableau III.5 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle (Y%).....	36
Tableau III.6 : Estimations des coefficients du modèle.	36
Tableau III.7 : Domaine expérimental des facteurs	38
Tableau III.8 : Matrice d'expériences et plan d'expérimentation	39
Tableau III.9 : Tests statistiques appliqués aux points tests.	41
Tableau III.10 : Estimation et statistique des coefficients	41
Tableau III.11 : Valeurs optimales des variables et les rendements expérimentaux et calculé	43
Tableau III.12 : Résultats du criblage phytochimique.	44
Tableau III.13 : caractéristique organoleptique de l'HE	48
Tableau III.14 : sensibilité et diamètre de la zone d'inhibition des extraits testés vis-à-vis les germes à étudier	55
Tableau III.15 : valeurs de la CMI des différents échantillons.	56

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I.1 : Arbuste <i>Myrtus communis</i> L.	2
Figure I.2 : Aire de distribution du genre <i>Myrtus</i>	3
Figure I.3 : 2-méthyl-1,3 butadiène (Isoprene).....	5
Figure I.4 : Structure de quelques monoterpènes.....	6
Figure I.5 : Structure de quelques sesquiterpènes.....	7
Figure I.6 : structure de quelques composés aromatiques dérivés du phénylpropane	8
Figure I.7 : Le domaine de variation du "facteur" englobe toutes les valeurs incluses entre son niveau bas et son niveau haut.	15
Figure I.8 : Schématisation d'un dispositif expérimental.....	16
Figure I.9 : Plan composite pour l'étude de deux facteurs.	19

MATERIELS ET METHODES

Figure II.1 : préparation de l'extrait éthanolique	25
Figure II.2 : Préparation de l'extrait aqueux.	25
Figure II.3 : Réaction redox entre les polyphénols et le réactif Folin Ciocalteu	26
Figure II.4 : Principe de réaction entre les flavonoïdes et $AlCl_3$ [.....	26
Figure II.5 : Mécanisme de réduction du radical DPPH [·] par un oxydant AH.	27
Figure II.6 : Schéma sur la réaction de test FRAP.	28
Figure II.7 : ensemencement des souches bactériennes.	30

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure III.1 : Montage avec Clevenger pour l'hydrodistillation.	32
Figure III.2 : Représentation graphique des effets des facteurs.	37
Figure III.3 : Variation de la fonction de variance.....	40
Figure III.4 : Variation de la réponse - R dans le plan : Rapport S/L, Temps.	43
Figure III.5 : Teneurs en polyphénols totaux.	46
Figure III.6 : teneur des flavonoïdes totaux	47
Figure III.7 : Densité optique des échantillons.	50
Figure III.8 : variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration.....	50
Figure III.9 : IC50 des différents extraits.....	52
Figure III.10 : pouvoir réducteur des différents échantillons.....	53
Figure III.11 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA.....	54
Figure III.12 : détermination de la CMI par méthode microdilution en milieu liquide sur microplaque.....	56



*INTRODUCTION
GÉNÉRALE*



Depuis des siècles, les plantes aromatiques sont utilisées par l'Homme pour enrichir ses plats, pour leurs parfums envoûtants, mais surtout pour leurs vertus thérapeutiques. Plus tard, il a été découvert que les bienfaits médicaux de ces plantes sont liés aux substances odorantes qu'elles renferment. Au début du XXème siècle, des chercheurs établissent les preuves des propriétés antiseptiques et antioxydantes des huiles essentielles, marquant ainsi le début de l'aromathérapie moderne [1].

Depuis, les propriétés thérapeutiques des huiles essentielles intéressent les scientifiques et les utilisateurs des médecines douces, cherchant un retour aux traitements naturels. Bien que l'efficacité de nombreuses huiles essentielles dans le traitement de divers maux soit aujourd'hui reconnue, il reste néanmoins nécessaire de connaître leur composition chimique exacte pour une utilisation optimale. En effet, l'activité thérapeutique de ces huiles essentielles est directement liée à leur composition chimique. Tout changement significatif dans leur profil chimique peut entraîner des variations de leur activité ou même causer une toxicité potentielle [2]. Les plantes renferment une multitude de molécules bioactives qui présentent des intérêts divers, mis à profit dans différent domaine. Parmi ces composés, les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés dans le domaine thérapeutique [3].

L'Algérie, dotée d'une richesse floristique considérable, possède un potentiel de plantes remarquable en plantes médicinales comprenant des milliers d'espèces. Ces plantes offrant divers intérêts et constitue un axe de recherche scientifique important, notamment dans le domaine des substances naturelles [4]. Le *Myrtus communis*, une plante ancienne de la famille des Myrtacées, se distingue par ses propriétés thérapeutiques. Il est particulièrement utilisé pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques et pour leur effet anti-inflammatoire [5].

Notre étude se concentre principalement sur cette espèce végétale avec pour objectifs principaux l'examen de la cinétique d'extraction et l'optimisation des conditions opératoires afin d'améliorer le rendement de l'huile essentielle. Organisée en trois parties distinctes, notre étude commence par une revue exhaustive des données bibliographiques. La deuxième partie se divise en deux chapitres, le premier explore les différentes méthodes d'extraction de l'huile essentielle, tandis que le second est consacré à la modélisation et l'optimisation de l'extraction assistée par ultrasons de l'essence. La troisième partie englobe l'analyse phytochimique et l'évaluation des effets pharmacologiques.



*Synthèse
bibliographique*



I. Le *Myrtus communis* L.

I.1. Description botanique

Le myrte (*Myrtus communis* L.) est une plante médicinale largement reconnue et utilisée dans le monde entier en médecine traditionnelle, faisant partie de la famille des Myrtacées. Le terme « *Myrtus* » vient du grec et désigne le myrte, tandis que « *Communis* » signifie commun en latin, en référence à sa tendance à pousser en groupes [1].

Cette espèce pérenne est typiquement méditerranéenne, auto-compatible et pollinisée par les insectes, et peut vivre plus de cent ans. Elle peut atteindre une hauteur de 4 à 5 mètres dans les sols fertiles [2]. Ses feuilles, de couleur vert foncé, sont très aromatiques en raison de leur forte teneur en huile des glandes foliaires, ce qui en fait une plante précieuse pour l'industrie du parfum. Elles sont hermaphrodites et actinomorphes, avec un diamètre pouvant aller jusqu'à 3cm [3]. Les fruits du myrte sont des baies ovoïdes qui deviennent noires à maturité et sont couronnées par le limbe du calice. La floraison s'étend de mai à octobre, tandis que la maturation des fruits se produit d'octobre à fin novembre [4]. Le myrte est généralement trouvé à des altitudes ne dépassant pas 800 mètres [5].



Figure I.1 : Arbuste *Myrtus communis* L.

I.2. Classification :

Position taxonomique de l'espèce *Myrtus communis* L. [6] :

Tableau I.1 : Taxonomie de l'espèce *Myrtus communis* L.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Magnoliophytina
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	Myrtus
Espèce	<i>Myrtus communis</i> L.
Variétés	<i>M. communis</i> var. <i>italica</i> L. <i>M. communis</i> var. <i>baetica</i> L. <i>M. communis</i> var. <i>lusitanica</i> L.

I.3. Distribution géographique du genre *Myrtus*

Le myrte commun se retrouve spontanément en Europe méditerranéenne, Asie occidentale et Afrique septentrionale [7], Il se développe sur un substrat le plus souvent siliceux dans les climats semi-humide, humide [8].

L'Algérie possède une des flores les plus diversifiées et les plus originales du bassin méditerranéen où elle compte 3139 espèces réparties dans près de 150 familles parmi lesquelles 653 espèces sont endémiques, soit un taux de 12,6 % [9].

Le myrte pousse spontanément sur l'Atlas tellien et les régions côtières d'Alger et de Constantine. La distribution horizontale très large de cette espèce peut être expliquée par le résultat de l'interaction des variations de différents facteurs du milieu, incluant les effets de l'altitude et la latitude, et la variabilité génétique au sein des populations de l'espèce en pleine évolution. Ainsi, il n'existe officiellement qu'un seul autre taxon au sein du genre *Myrtus* : il s'agit du myrte de *Nivelle* ou *Myrtus nivellei* [10,11].

**Figure I.2** : : Aire de distribution du genre *Myrtus* [12].

I.4. Utilisations médicinales traditionnelles

Myrtus communis L., est utilisé depuis l'antiquité aussi bien comme une épice dans les préparations alimentaires et à des fins médicinales. En médecine traditionnelle, le Myrte est souvent consommé en infusion et décoction [13].

En tant que plante médicinale, le Myrte est particulièrement réputé pour ses propriétés anti-hyperglycémiques, antiseptiques et anti-inflammatoires [14]. Toutes les parties du Myrte (feuilles, les fleurs, fruits) possèdent des propriétés stomachiques, stimulantes et astringentes. Ils sont utilisés dans les remèdes populaires contre les affections des voies respiratoires et urinaires. On les recommande également contre les bronchites partielles, la sinusite, l'otite, la diarrhée les hémorroïdes. Les fruits sont consommés verts ou desséchés sont également réputés pour renforcer le cœur [15]. La décoction des fleurs est recommandée pour arrêter les diarrhées aiguës, ainsi que pour traiter la toux et les rhinites. L'huile fixe issue des fruits est utilisée localement pour soulager les douleurs rhumatismales [16].

I.5. Utilisations culinaires, cosmétiques et industrielles

L'huile essentielle, grâce à ses propriétés astringentes est utilisée en bain de bouche. De plus, elle aide à tonifier et à raffermir la peau, contribuant ainsi à réduire les rides. Elle est également réputée pour son effet hémostatique, aidant à arrêter les saignements en provoquant la contraction des vaisseaux sanguins [17].

II. Généralités sur les huiles essentielles

Selon la norme ISO 9235 de l'AFNOR l'huile essentielle est « Produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de fruits de citrus (agrumes), soit par distillation sèche, après séparation de l'éventuelle phase aqueuse par des procédés physiques. » [18].

Au sens de la VI édition de la Pharmacopée Européenne l'HE est « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. » [19].

II.1. Localisation des huiles essentielles dans la plante

L'huile essentielle est contenue dans divers types d'appareils producteurs, variables selon la partie de la plante considérée. On distingue : les cellules sécrétrices, les poches sécrétrices et

les canaux sécréteurs. Il apparaît alors nécessaire et important, du point de vue pratique, de connaître la nature et la localisation des éléments producteurs d'huiles essentielles car elles déterminent les conditions et les méthodes d'extraction [20].

II.2. Conservation des huiles essentielles

Pour éviter les possibles réactions d'oxydation des huiles essentielles, ces derniers doivent se conserver [21] :

- à l'abri de l'air et de la lumière.
- de préférence à basse température (4°C).
- dans des flacons propres, secs, étanches, en verre coloré ou en acier inoxydable ou en aluminium.

II.3. Composition chimique des huiles essentielles

Une huile essentielle renferme majoritairement des terpènes volatils, issus de la condensation d'unités isopréniques, et des dérivés aromatiques dérivés du phénylpropane [22].

II.3.1. Composés terpéniques

Les terpènes (isoprénoides) sont des produits naturels, formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées, appelées unités isopréniques, plus de 36000 structures différentes de terpènes ont été identifiées et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques [23].

a. Hémiterpènes (C_5H_8)

Les hémiterpènes sont les terpènes les plus simples et moins d'une centaine de composés sont connus sous le nom d'isoprène et de dérivés oxygénés prénil, acide tiglique, acide angélique et acide isovalérique [24].

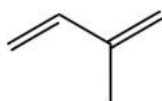


Figure I.3 : 2-méthyl-1,3 butadiène (Isoprene).

b. Monoterpènes ($C_{10}H_{16}$)

Les monoterpènes sont des composés organiques à 10 atomes de carbone, volatils contenus dans les fruits, légumes, feuilles et herbes aromatiques comestibles. Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène [25].

On distingue les monoterpènes linéaires (acycliques), les monoterpènes monocycliques et bicycliques.

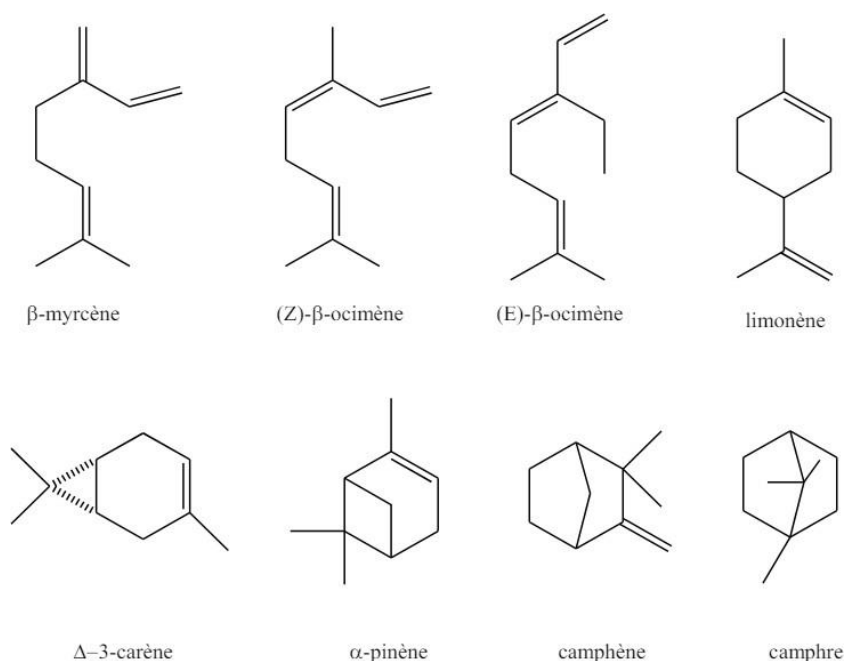


Figure I.4 : Structure de quelques monoterpènes.

c. Sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$)

Les sesquiterpènes sont formés de l'assemblage de trois unités isoprène (C_5). L'extension de la chaîne augmente le nombre de cyclisations ce qui permet une grande variété de structures [26].

La structure et la fonction des sesquiterpènes sont similaires à celles des monoterpènes :

- **Carbures** : azulène, b-bisabolène, cadinènes, b-caryophyllène, logifolène, curcumènes, élémènes, farnésènes, zingibérène, etc.
- **Alcools** : bisabol, cédrol, b-nérolidol, farnésol, carotol, b-santalol, patchoulol, viridiflorol, etc.
- **Cétones** : germacrone, nootkatone, cis-longipinan-2,7- dione, b-vétinone, turmérone, etc.
- **Epoxyde** : oxyde de caryophyllène, époxydes d'humulène, etc.

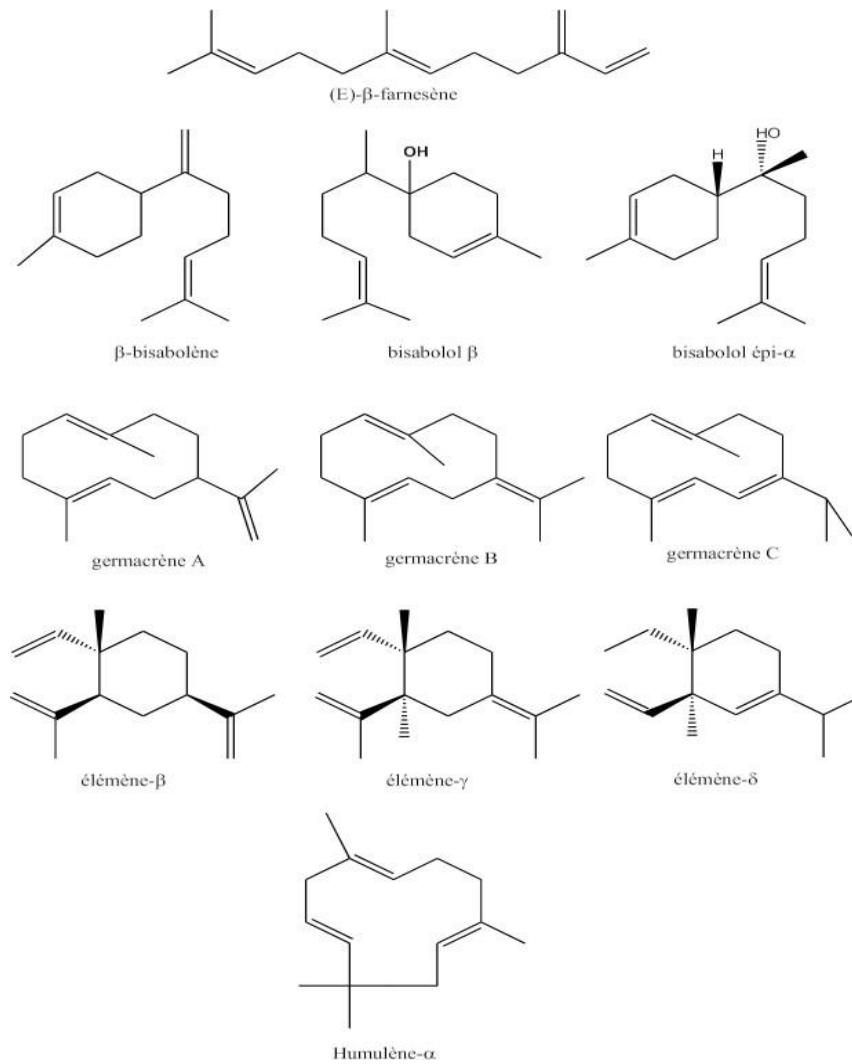


Figure I.5 : Structure de quelques sesquiterpènes.

II.3.2. Composés aromatiques

On peut avoir des composés dérivés du phénylpropane qui sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Généralement, ces composés sont responsables des caractères organoleptiques traditionnels des huiles essentielles [27].

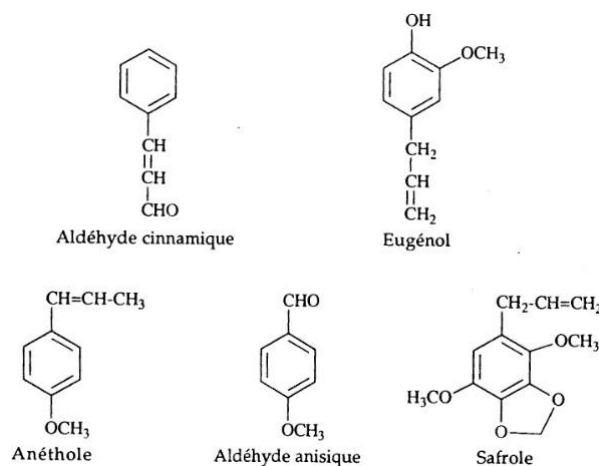


Figure I.6 : structure de quelques composés aromatiques dérivés du phénylpropane [28].

II.3.3. Composés d'origines diverses

De faibles quantités de composés acycliques non terpéniques et de poids moléculaires peu élevés peuvent se retrouver dans certaines huiles essentielles (alcools, aldéhydes, cétones, etc) [29].

II.4. Facteurs de variabilité

Les études expérimentales ont démontré que la composition chimique des huiles essentielles est hautement variable, car elle est soumise à l'influence de nombreux facteurs biotiques et abiotiques :

II.4.1. Origine botanique

La composition d'une essence végétale varie en fonction de l'espèce productrice. En effet, l'extraction de l'huile essentielle d'un même organe de deux plantes différentes ne donne pas la même composition chimique [30].

II.4.2. L'organe producteur

La composition et le rendement d'une huile essentielle varient selon la partie de la plante à partir de laquelle est extraite [31].

II.4.3. Origine géographique

La composition chimique des huiles essentielles d'une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol peut être différente [32].

II.5. Huile essentielle du *Myrtus communis* L.

Le myrte a été toujours utilisé pour la qualité de ses huiles essentielles, à propriétés essentiellement antiseptiques. Mais il est également utilisé en aromathérapie et en parfumerie, l'huile essentielle est de couleur jaune ambré [33].

Les HE du *Myrtus Communis* L. sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plus d'une centaine de composés, principalement des terpènes [34].

Le tableau I.2 résume les principaux constituants de l'huile essentielle. Dix-neuf composés ont été identifiés dans l'huile volatile de feuilles *M. communis* en utilisant l'analyse GC/MS : 8-Cineol (27.19%), α -pinene (25.53%), linalool (11.75%) représentent les composés majoritaires [35].

Tableau I.2 : Analyse GC/MS de l'huile volatile provenant de feuilles de *Myrtus communis*.

Composés identifiés	Pourcentage de superficie relative	KI
α -Pinene	25.53	931
Limonene	1.6	1022
1,8-cineol	27.19	1029
Linalol oxide	0.5	1071
Linalol	11.75	1094
Fenchyl alcohol	0.16	1109
α -Terpineol	0.65	1169
Cis-pinocarveol	0.43	1180
Nerol	0.37	1226
Mertenyl acetate	4.2	1239
Geraniol	0.66	1259
Linalyl acetate	3.39	1261
P-menth-1-enol	6.95	1289
α -Terpinyl acetate	1.4	1351
Neryl acetate	2.94	1361
Methyl eugenol	0.51	1398
Trans caryophyllene	0.54	1406
α -Humulene	0.63	1448
Pourcentages totaux de composés identifiées	90.24	

III. Effets thérapeutiques du *Myrtus communis* L.

Au cours de la dernière décennie, les propriétés biologiques des plantes ont été corroborées par de nombreuses recherches. De nombreux chercheurs ont apportés une contribution significative

à cette connaissance en réalisant une synthèse bibliographique exhaustive sur les activités biologiques des plantes médicinales, favorisant ainsi le développement de nouvelles approches thérapeutiques [36].

III.1. Effets thérapeutiques de l'huile essentielle du Myrte

Le rôle physiologique des huiles essentielles pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés connues et utilisées depuis longtemps [37]. Les composés majoritairement présents dans l'huile essentielle extraite à partir des feuilles du Myrte sont le 1,8- cinéole, l' α -pinène, le limonène, le linalol et parfois l'acétate de myrtényle [38]. Selon la littérature les différentes activités biologiques des constituants de l'huile essentielle sont résumées dans le tableau I.3 [39] :

Tableau I.3: Activités biologiques de certains composés terpéniques [40].

Familles	Effets thérapeutiques
Hydrocarbures aliphatiques Monoterpènes	Fongistatique, bactériostatique, insecticide, herbicide, stimulation générale.
Sesquiterpènes	Calmant, anti-inflammatoire, anti -allergique, antibactérien et antifongique.
Alcool Monoterpéniques	Anti- inflammatoire, antiseptique, bactéricides, fongicides, antiviral, immunostimulants, neurotoniques.
Phénols	Antioxydant, stimulants, toniques, antiseptiques, bactéricides, fongicides, antivirale, irritants, antiparasitaire.
Cétones	Calmant, antivirales, antifongiques, neurotoxiques, dépresseurs à doses élevées.

III.2. Les métabolites secondaires

Le terme de métabolite secondaire a été forgé originellement par défaut, comme étant la classe des composés qui sont présents dans certaines espèces végétales et pas dans d'autres. Par conséquent ils ne peuvent pas être impliqués dans le métabolisme basal en œuvre dans chaque plante [41].

Les métabolites secondaires sont répartis dans trois grandes familles : les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés. Dans cette dernière famille, les alcaloïdes sont les plus importants de par leur nombre et leur diversité [42].

III.3. Effets thérapeutiques des métabolites secondaires du Myrte

Les extraits du genre *Myrtus*, sont riches et diversifiés en métabolites secondaires. De nombreuses molécules ont été isolées, identifiées et testées selon diverses méthodes afin d'évaluer leur potentiel biologique, comme le confirment les travaux antérieurs. Les activités biologiques des métabolites secondaire du myrte sont résumés dans le tableau I.4 [43].

Tableau I.4 : activités biologiques des métabolites secondaires du Myrte [44].

Composé	Effets thérapeutiques
Polyphénols	Antioxydantes et antivirales, antibactériennes, antidiabétiques, anticancéreuses, anti-inflammatoire, antipyrétiques, antifongique, antiallergiques et vasodilatatrices
Flavonoïdes	Antioxydantes, antitumorales, vasodilatatrices, antibactériennes, anticarcinogènes, anti- inflammatoires, hypotensives, antivirales, ostéogènes
Tannins	Anti-diarrhéiques, vasoconstrictrices, antioxydantes, antiviral.
Saponines	Antiulcéreuses, antidiabétique, anti-obésité, anticancéreuse, anti-inflammatoires, immunostimulantes, antimicrobiennes, antioxydantes et antibactériennes
Alcaloïdes	Anti-inflammatoires, antiprolifératives, analgésiques, antioxydantes, anti-malaria, antimicrobiennes, sédatives, anxiolytiques, hypnotiques
Coumarines	Protectrices vasculaires, antiinflammatoires, antiparasitaires analgésiques et anti- œdémateuses
Stérols et triterpènes	Antimicrobiens, antiprolifératifs, antiinflammatoires, immunomodulateurs, insecticide, antinéoplasiques, antiulcéreux, anti- hypercholestérolémiques

III.4. Activité antioxydante du myrte

Les cellules et tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques, chimiques et métaboliques. La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dues à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [45].

Un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules [46].

Les antioxydants naturels font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé [47].

L'examen des données bibliographiques met en évidence une multitude de méthodes spectrophotométriques pour la détermination de l'activité antioxydante. Parmi les tests les plus

couramment employés, la méthode au DPPH (Diphényl Picrylhydrazyle) et la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

III.5. Activité anti-inflammatoire du myrte

L'inflammation est une partie de la réponse immune qui peut prévenir une infection à travers la production et la synthèse des médiateurs chimiques pro-inflammatoires en réponse à la présence des facteurs endogènes ou exogènes [48]. Ce processus de production et de synthèse est bénéfique dans la mesure où il permet de maintenir l'intégrité de l'organisme. Cependant, lorsqu'une inflammation n'est pas contrôlée, elle peut causer une destruction des tissus ainsi qu'une série des réactions qui entraînent la douleur [49].

Le traitement actuel d'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent empêcher leur utilisation à long terme [50]. L'activité anti-inflammatoire des plantes est attribuée à leur contenu en métabolites secondaires biologiquement actifs. Ces substances actives peuvent agir sur plusieurs stades de la réponse inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, participant au mécanisme de transduction du signal de l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, expression d'adhésion et activation du facteur nucléaire Kappa-B et production d'oxygène actif [51, 52].

III.6. Activité antibactérienne

Les maladies infectieuses représentent la cause majeure de mortalité dans le monde, ce sont des affections provoquées par des microorganismes pathogènes et touchent des millions de personnes dans le monde [53]. L'infection bactérienne est la propagation d'une souche de bactéries nuisibles sur ou dans le corps. Les bactéries peuvent infecter n'importe quelle partie du corps. La pneumonie, la méningite et l'intoxication alimentaire ne sont que quelques-unes des maladies pouvant être causées par des bactéries nocives.

Le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée et peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes [54].

Des études reportent que les composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes et les tanins exercent une activité antibactérienne vis à vis des microorganismes. En théorie, les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase ce qui leur confère un

puissant effet antibactérien [55]. De nombreuses études ont rapporté que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, ainsi, ils empêchent la liaison du virus à la cellule hôte [56].

Parmi les hypothèses avancées, le mécanisme d'action antibactérien des polyphénols se révèle d'une grande complexité et mobilise divers modes d'action, tels que [57] :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- La séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer,
- L'inhibition du métabolisme microbien.

IV. Procédé d'extraction

Le procédé d'obtention d'une essence végétale joue un rôle déterminant dans la nature des produits d'extraction. Cette opération est délicate, car elle vise à extraire des molécules fragiles élaborées par les plantes sans en altérer la qualité. Plusieurs méthodes d'extraction sont connues et utilisées à ce jour :

L'AFNOR (1996) et l'ISO (1997) dans leur définition ont valides trois méthodes d'extraction :

- L'entraînement à la vapeur, qui, à la différence de l'hydrodistillation, ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter ; [58]
- L'expression à froid, qui est un procédé mécanique sans chauffage, généralement réservé à l'extraction des essences des agrumes [59, 60] ;
- L'hydrodistillation : le matériel végétal est directement plongé dans de l'eau en ébullition et l'huile est entraînée par la vapeur qui s'en dégage [61].

IV.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement direct à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE. Ce procédé d'entraînement consiste à récupérer l'huile essentielle de végétaux, en faisant passer un courant de vapeur d'eau à travers la matière végétale sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés organiques volatils sont ensuite condensées, et ces composés sont récupérés par décantation. Ce procédé est particulièrement adapté aux matières végétales sensibles qui pourraient être endommagées par une ébullition prolongée [62].

IV.2. L'expression à froid

Cette méthode n'est utilisée que pour les épicarpes des Citrus. Toutefois, ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. Le principe de la méthode est

très simple : Les « zestes » sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices qui ont été rompues est récupéré par un procédé physique [63].

IV.3. Extraction par hydrodistillation

Hydrodistillation est la méthode d'extraction des huiles la plus ancienne et la plus simple. La chaleur détruit la structure des cellules végétales et libère les molécules organiques volatiles qui sont ensuite entraînées par la vapeur d'eau. Cette vapeur se condense en passant dans la colonne de refroidissement, et l'huile essentielle est récupérée dans l'essencier, ou elle se sépare naturellement de l'eau par différence de densité. La phase aqueuse contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (hydrolat ou encore eau florale). L'appareil de Clevenger, inventée en 1928, est dispositif en circuit fermé permettant le recyclage de l'eau par cohobation [64].

IV.4. Extraction par micro-ondes

L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAHD) repose entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique [65]. Ce procédé a fait l'objet de plusieurs études et continue d'être amélioré. Il offre de nombreux avantages c'est une technologie verte, qui permet des économies d'énergie et de temps, tout en minimisant les dégradations thermiques et hydrolytiques [66].

Le processus consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans un four à micro-ondes. Le matériel végétal est ainsi placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans du four à micro-ondes. Le système de réfrigération et la partie destinée à la récupération des essences se trouvent à l'extérieur du four. Cette méthode permet de réduire significativement le temps nécessaire à la distillation et d'augmenter le rendement [67, 68].

IV.5. Extraction assistée par ultrasons

Cette technique fut développée en 1950 à l'échelle laboratoire, dans le but d'augmenter les rendements d'extraction, de réduire la consommation d'énergie, de protéger l'environnement et de diminuer le temps d'extraction par rapport à l'hydrodistillation traditionnelle [69].

Les ultrasons provoquent la désorganisation de la structure des parois des plantes et des tissus cellulaires, en raison des ondes ultrasonores et aux micro-cavitations générées. Ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influencer sur la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des huiles essentielles [70].

L'avantage principal de cette méthode réside dans le fait que l'énergie ultrasonique facilite l'entraînement des composés organiques et inorganiques à partir des matrices solides. Elle permet également un gain de temps, une cinétique plus rapide grâce au transfert rapide d'énergie, une extraction sélective, une réduction de la taille des équipements et un meilleur rendement [71].

V. Méthodologie des plans d'expériences

V.1. Définitions

La modélisation des processus est une opération fondamentale en sciences et en ingénierie. Elle consiste à développer des modèles mathématiques qui décrivent le comportement d'un système en reliant des variables d'entrée à des variables de sortie. Grâce à ces modèles, l'expérimentateur peut entreprendre des études d'optimisation, faire des prévisions, et formuler des recommandations [72]. Pour explorer les plans d'expériences, il est essentiel de mettre en place un lexique clairement défini, car ces plans sont un élément fondamental des études de modélisation :

V.1.1 Facteur

Les Facteurs sont des variables expérimentales qui peuvent être modifiées indépendamment les unes des autres. Les facteurs sont généralement examinés à deux niveaux (-1, +1), avec des points centraux (codé 0). L'intervalle entre les niveaux est l'intervalle le plus large dans lequel le facteur peut être varié pour le système étudié et est choisi sur la base des informations de la littérature ou des connaissances antérieures [73].

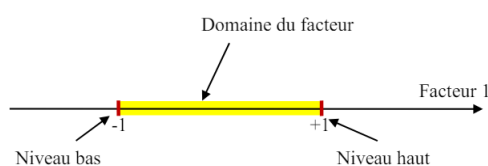


Figure I.7 : Le domaine de variation du "facteur" englobe toutes les valeurs incluses entre son niveau bas et son niveau haut.

V.1.2. Réponse

Ce sont les valeurs mesurées des résultats des expériences. Les réponses typiques sont le signal analytique, La modification de la valeur d'une réponse ne peut s'opérer que de façon indirecte par la variation des facteurs [74].

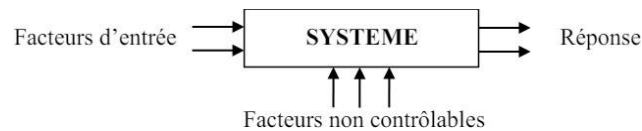


Figure I.8 : Schématisation d'un dispositif expérimental.

V.1.3. Facteur significatif

Un facteur est dit influant si sa modification entraîne une modification de la réponse. Un facteur non significatif n'a aucun effet sur la réponse ou son effet est trop faible pour pouvoir être quantifié [75].

V.1.4. Variables codées

L'utilisation des variables codées présente l'intérêt d'obtenir un plan d'expérience à réaliser quels que soient les facteurs ou les domaines d'études retenus. Remplacer les variables réelles par les variables codées va permettre d'avoir pour chaque facteur le même domaine de variations (entre -1 et +1) et de pouvoir ainsi comparer entre eux l'effet des facteurs [76].

Le passage des variables réelles aux variables codées, et inversement, est donnée par la formule suivante (équation II.2) :

$$X = \frac{A - A0}{\text{pas}} \quad (\text{I.1})$$

Avec :

- X : Valeur codée ;
- A : Valeur réelle ;
- A0 : Valeur réelle moyenne ;
- Pas : La variation entre la position moyenne de la variable et une extrémité du domaine

On introduit également la notion de pas :

$$\text{Pas} = \frac{(A_+) - (A_-)}{2} \quad (\text{I.2})$$

V.1.5. Matrice d'expériences

Une matrice d'expériences est l'organisation de l'ensemble des expériences à réaliser exprimées avec les variables codées ou normées, elle est composée de N lignes, correspondant chacune à une expérience à effectuer, et de k colonnes, représentant chacune un facteur à ajuster. Le rôle de cette matrice est la réalisation d'un nombre minimum d'essais à effectuer

afin de déterminer avec un maximum de précision l'influence respective de chacun des différents facteurs [77].

V.1.6. Plan d'expérimentation

Le plan d'expérimentation correspond à la traduction de la matrice d'expériences en variables réelles [78].

V.1.7. Méthodologie des plans d'expériences

La singularité de cette méthodologie réside dans sa faculté à faire varier, de manière programmée, les niveaux de tous les facteurs simultanément lors de chaque essai. L'objectif est établi en fonction des informations que l'on souhaite obtenir. Ces objectifs se divisent en cinq catégories distinctes [79] :

1. Recherche exploratoire,
2. Criblage de facteurs (screening),
3. Etude quantitative de facteurs,
4. Etude quantitative des surfaces de réponses,
5. Etude des Mélanges.

Indépendamment de l'objectif visé pour obtenir des informations pertinentes, une approche méthodologique doit être rigoureusement suivie [80] :

- Définition des objectifs ;
- Choix des réponses expérimentales ;
- Choix des facteurs et du domaine expérimental ;
- Proposition d'un modèle ;
- Construction du plan d'expérimentation ;
- Réalisation des essais ;
- Estimation des coefficients du modèle ;
- Validation du modèle ;
- Prédiction des valeurs optimales des facteurs du modèle.

V.2. Etude de criblage (screening)

Le criblage des facteurs consiste à distinguer, parmi un ensemble de facteurs potentiellement influents, ceux qui le sont effectivement dans un domaine d'étude fixé [81].

Les matrices de Hadamard sont couramment employées dans le criblage des facteurs. Dans ces matrices, les niveaux des facteurs sont généralement représentés par deux valeurs distinctes, notées -1 et +1 dans le contexte des variables codées [82]. Elles facilitent l'évaluation du "poids" de chaque facteur. La variance de l'estimation de chaque facteur est déterminée par la relation suivante :

$$\mathit{Var}(b_j) = \frac{\sigma^2}{N} \quad (\text{I.3})$$

Où :

- σ^2 : est la variance de la réponse.
- N : le nombre d'expériences à réaliser.
- b_j : l'estimation du poids du facteur j.

Pour K facteurs à deux niveaux, le nombre d'expériences N à réaliser est un multiple de 4 et doit satisfaire la condition :

$$N \geq K+1 \quad (\text{I.4})$$

La construction de la matrice de Hadamard se réalise en quatre étapes :

1. Ecrire la première ligne ou la première colonne ;
2. Recopier cette première colonne par permutation circulaire à partir de la droite ou la gauche, du haut ou du bas ;
3. Compléter la matrice jusqu'à la dernière ligne qui exclusivement remplie de signes négatifs ;
4. Supprimer les éventuelles colonnes superflues.

V.3. Méthodologie des surfaces de réponse

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) constitue le second volet de la méthode des plans d'expériences.

La MSR est une technique statistique empirique qui a pour but de déterminer les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative impliquées dans une expérience [83]. Les surfaces de réponse permettent l'analyse et la modélisation du processus, ainsi que la détermination des conditions optimales. La méthodologie des surfaces de réponse ou plan de second degré, utilise un modèle à polynôme de second degré [84].

Parmi les différents types de plans des surfaces de réponses couramment utilisés, nous citons : les matrices composites centrées, les matrices de Doehlert, les matrices de Box- Behnken et les matrices hybrides [85]. Dans ce travail, nous avons choisi un plan composite centré.

V.3.1. Plan composite centrée (PCC)

Le plan composite centré (PCC) est le plan de surface de réponse le plus utilisé [86]. La première partie de l'étude est un plan factoriel complet complété par des points au centre pour vérifier la validité du modèle. Si les tests de validation sont positifs, l'étude s'achève le plus souvent, mais s'ils sont négatifs, on entreprend des essais supplémentaires pour établir un modèle du second degré. Les essais supplémentaires sont représentés par des points d'expériences situés sur les axes de coordonnées et par de nouveaux points centraux. Les points situés sur les axes de coordonnées sont appelés les points en étoile. Les plans composites présentent donc trois parties [87] :

- **Le plan factoriel** : c'est un plan factoriel complet ou à deux niveaux par facteurs. Le nombre d'expériences à réaliser est $N = 2K$, les points expérimentaux sont aux sommets du domaine d'étude ($NF = 2k$) ;
- **Le plan en étoile** : les points du plan en étoile ($N\alpha$) sont sur les axes et ils sont, en général, tous situés à la même distance du centre du domaine d'étude. Dans le cas d'un domaine cubique ($\alpha = 1$) et pour la géométrie sphérique ($\alpha = (NF) 1/4$) ;
- **Les points au centre du domaine d'étude** ($N0$), On prévoit toujours des points expérimentaux situés au centre du domaine d'étude.

Le nombre n des essais d'un plan composite est donné par la relation [88] :

$$N = NF + N\alpha + N0 \quad (I.5)$$

Le plan composite pour l'étude de deux facteurs, est représenté dans la figure I.9. Les points factoriels sont en noirs, les points en étoile sont en gris clair, les points centraux sont en blanc [89].

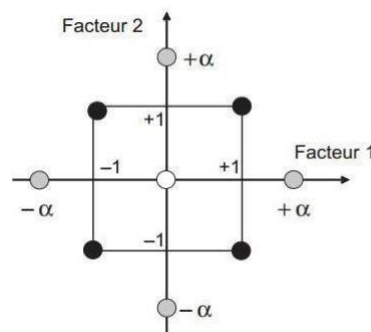


Figure I.9 : Plan composite pour l'étude de deux facteurs.

VI.3.2. Modèle mathématique

Le modèle mathématique postulé pour un plan composite centré est un polynôme du second degré avec interactions. Il est donné par :

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^K b_i X_i + \sum_{i=1}^K b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{K-1} \sum_{j=i+1}^K b_{ij} X_i X_j$$

Où :

- X_i, X_j représentent les variables codées du système,
- b_0, b_i ($i = 1, 2, \dots, k$), b_{ii} ($i = 1, 2, \dots, k$) et b_{ij} ($i = 1, 2, \dots, k-1; j = 2, 3, \dots, k$) sont respectivement les coefficients de régression pour les termes d'ordonnée à l'origine, linéaire, quadratique et d'interaction
- k désigne le nombre de facteurs.

V.3.3. Validation du modèle

La validation du modèle nécessite trois tests : les valeurs des coefficients de détermination et ajustés, qui doivent être proches de l'unité, le test de Student, et l'analyse de variance (ANOVA). L'analyse de la variance compare, à l'aide d'un test F (loi de Fisher), la somme des carrés des écarts attribuables à la régression (ou modèle) avec la somme des carrés des résidus.

On définit :

- La variation due à la liaison linéaire : $SCEL = \sum (y_{calc} - y_{moy})^2$
- La variation résiduelle : $SCER = \sum (y_{exp} - y_{calc})^2$
- La variation totale : $SCET = SCEL + SCER$

On définit de plus un "carré moyen" qui est le quotient d'une somme de carrés par son degré de liberté.

Le tableau d'ANOVA se présente comme suit :

Tableau I.5 : tableau ANOVA

Variation due à	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F
Liaison	SCEL	p-1	$CML = \frac{SCEL}{p-1}$	$F_{obs} = \frac{CML}{S^2}$
Résidus	SCER	N-p	$S^2 = \frac{SCER}{N-p}$	
Totale	SCET	N-1		

Le test F permet alors de comparer pour un risque fixé à l'avance le F_{obs} que l'on a calculé dans le tableau I.5 précédent avec un $F_{(critique)}$ lu dans la table de Fisher-Snedecor avec (p-1) et (N - p) degrés de liberté.



*Matériels
et
méthodes*



Le travail a été réalisées au laboratoire de Chimie pharmaceutique à la Faculté des Sciences de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur la partie aérienne (feuilles) du *Myrtus communis* L. récoltée au mois de Mai 2024 en plein floraison dans la région de Bouzeguène (ⵍⵔⵉⵙⵉⵔⵉⵏ en caractères tfinaghs) de la wilaya de Tizi Ouzou, dans la région de Grande Kabylie en Algérie. Elle se situe à 27 km à l'est d'Azazga et à 38 km au nord d'Akbou,

L'identification botanique a été réalisée au laboratoire botanique de la Faculté des Sciences Biologique et Agronomique de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Les feuilles récoltées sont séchées à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 15 jours pour préserver la substance active. Après 15 jours de séchage les feuilles ont été broyées pour une utilisation ultérieure.

I.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes testées dans notre présent travail ont été fournis par le laboratoire de Microbiologie de la faculté de Médecine de l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Les microorganismes analysés et leurs références sont consignés dans le tableau II.1

Tableau II.1 : Références et familles des souches bactériennes utilisées.

Nom de la souche	Gram	Référence ATCC	Famille
<i>Escherichia Coli</i>	-	25922	Enterobacteriaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	25923	Staphylococcaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	27853	Pseudomonadaceae

II. Méthodologie

II.1. Extraction de l'huile essentielle du *Myrtus communis*

II.1.1. Extraction par hydrodistillation

Les feuilles séchées de *Myrtus communis* (100g) sont placées dans un ballon tricol de 2 litre rempli d'eau distillée (2/3 du volume du ballon) est relié à un dispositif de Clevenger et soumis à l'ébullition pendant 180min. Les vapeurs formées montent le long de la colonne en entraînant les huiles essentielles. Ces vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et récupérées dans une ampoule à décanter. L'huile essentielle obtenue est conservée dans un flacon ombré au réfrigérateur (4°C – 8°C).

II.1.2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation assistée par micro-ondes

Les extractions ont été effectuées dans un four à micro-ondes domestique. Celui-ci délivre une puissance d'entrée de 1250 W via deux magnétrons de 800 W chacun, fonctionnant à une fréquence de 2,45 GHz et sous une tension de 230 volts. Les dimensions de la cavité du four sont de 320 mm x 210 mm x 320 mm. Le temps et la puissance peuvent être réglés manuellement.

Dans un ballon de 1 litre rempli aux deux tiers avec de l'eau distillée, 100 g de feuilles séchées et broyées de la plante étudiée sont placés. Le mélange est soumis à une puissance de 300 W pendant 15 minutes. Après cette activation, le mélange est soumis à une extraction par hydrodistillation classique.

II.1.3. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation assistée par ultrasons

Dans cette étude, l'extraction des huiles essentielles a été réalisée en utilisant une méthode qui consiste à soumettre le mélange à l'activation des ultrasons dans un bain ultrasons qui génère des vibrations sonores à une fréquence de 50Hz et une puissance maximale de 195 W.

100g de la matière végétale sèche ont été mis au contact d'eau distillée dans un ballon de 1L. cette préparation a été exposée aux ultrasons à une température de 60°C pendant 50min [1].

Le mélange préparé a ensuite été soumis à l'activation des ultrasons. Le bain à ultrasons utilisé génère des vibrations sonores à une fréquence de 50/60 Hz avec une puissance maximale de 195 W. Les ultrasons induisent des phénomènes de cavitation dans le liquide, créant des bulles qui implosent sous l'effet de la pression, ce qui favorise la libération des composés volatils de la matière végétale.

III. Caractérisation de l'huile essentielle du *Myrtus communis* L.

III.1. Caractéristiques organoleptiques

L'évaluation des propriétés organoleptiques fait habituellement partie des études qui analysent les facteurs influençant la qualité de l'huile essentielle. Dans cette étude, trois critères sont utilisés pour évaluer la qualité organoleptique : l'odeur, la couleur et l'aspect. Les huiles essentielles ont une saveur acre et une odeur pénétrante, généralement incolores ou jaune pâle à l'état liquide et à température ordinaire [2].

III.2. Caractéristiques physico-chimiques

La qualité et la valeur d'une huile essentielle sont déterminées conformément à des normes établies, qui se fondent sur des indices physico-chimiques.

III.2.1. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est défini selon la norme (NFT 60 212) par le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide à une longueur d'onde définie et la vitesse de propagation dans la substance [3]. L'indice de réfraction est un paramètre qui indique le degré d'insaturation des acides gras entrant dans la composition des matières grasses [4].

L'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe.

III.2.2. Indice d'acide

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaires pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme de matière grasse, l'indice chimique a été analysé selon les recommandations établies par AFNOR [5].

L'indice d'acide est calculé à l'aide de la formule ci-dessous :

$$IA = \frac{56,1 \cdot V \cdot N}{m} \quad (\text{II.1})$$

V : volume KOH utilisé pour le titrage (en ml) ;

N : normalité de la solution de KOH ;

m : masse de la prise d'essai.

III.2.3. Indice de saponification

L'indice de saponification correspond au nombre de milligrammes de potasse nécessaires pour saponifier les acides gras contenus dans 1g de matière grasse [6]. Le dosage a été effectué selon la norme NFT 60 206 (AFNOR, 1981) [7].

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$IS = \frac{56,1 \cdot N(V0 - V)}{m} \quad (\text{II.2})$$

V0 : volume de la solution HCl pour l'essai à blanc (en ml)

V : volume de la solution de HCl utilisé pour la prise d'essai (en ml)

m : masse de la prise d'essai (en g)

N : normalité exacte de la solution de HCl

III.2.4. Indice d'ester

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour saponifier les acides gras liés contenus dans un gramme de corps gras Ce paramètre est donné par la différence entre l'indice de saponification et l'indice d'acide :

$$IE = IS - IA$$

(II.3)

IE : indice d'ester ;

IS : indice de saponification ;

IA : indice d'acide.

III.2.5. Potentiel hydrogène

Dépourvu d'unité, le potentiel hydrogène, désigné par le pH, constitue une grandeur permettant de mesurer l'activité chimique de l'ion hydrogène au sein d'une solution. Par ailleurs, le pH révèle le degré d'acidité ou de basicité d'une solution, indiquant ainsi si celle-ci est acide, basique ou neutre.

IV. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble de méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante. Le but final de l'étude des plantes médicinales est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante [8].

Les molécules identifiées comprennent les polyphénols totaux, les composés terpéniques, les composés azotés, les composés glucosides, les quinones libres, les stérols et polyterpènes, ainsi que les sucres réducteurs (...) [9].

IV.1. Tests phytochimiques

Ces tests ont été réalisés au niveau du laboratoire de Chimie pharmaceutique de la faculté des Sciences de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Le screening Phytochimique est une étude qualitative des extraits aqueux ou alcooliques d'une plante donnée, qui met en évidence la présence ou non de quelques métabolites secondaires. Ces réactions sont basées sur les phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques (Annexe 01)

L'extrait éthanolique a été préalablement préparé par macération de 40g de matière végétale sèche de l'espèce *Myrtus communis L.*, dans un volume de 400 ml d'éthanol [10].

Après 24h le macérât est récupéré par une filtration par gravité à l'aide d'un papier filtre, conservé dans un flacon fermé. (Annexe 01)

IV.2. Préparation des extraits

IV.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique

L'extrait éthanolique a été préparé par macération de 50 g de matière végétale sèche de l'espèce *Myrtus communis L.* dans 500 ml d'éthanol [11].

Après 24 heures, le macérât a été récupéré par filtration gravitationnelle à l'aide d'un papier filtre, puis ce filtrat a ensuite été évaporé à sec sous pression réduite à 65°C à l'aide d'un évaporateur rotatif, jusqu'à obtention d'un résidu sec. Ce résidu sec a été pesé puis conservé dans des flacons scellés et colorés à l'abri de la lumière [12].



Figure II.1 : préparation de l'extrait éthanolique.

IV.2.2. Préparation de l'extrait aqueux

10g de poudre des feuilles dissous dans 150ml d'eau distillée ont été chauffés à reflux pendant 2h, Après filtration à froid ; ce filtrat a ensuite été évaporé à sec sous pression réduite à 65°C à l'aide d'un évaporateur rotatif [13].



Figure II.2 : Préparation de l'extrait aqueux.

IV.3. Détermination de la teneur des polyphénols totaux

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Ciocalteu.

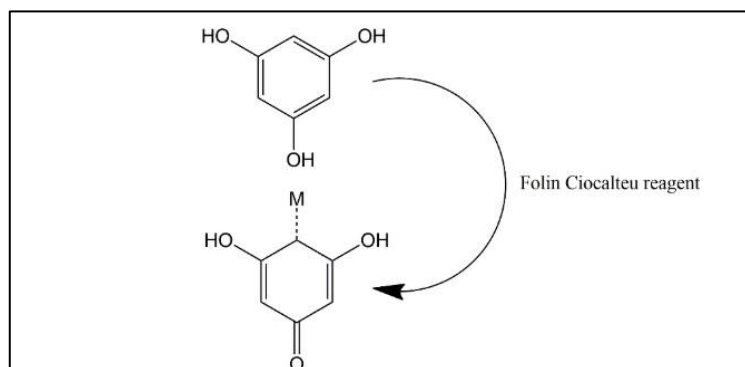


Figure II.3 : Réaction redox entre les polyphénols et le réactif Folin Ciocalteu [14].

Une prise de 500 μ L de l'extrait est mélangée avec 2,5mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10e. Le mélange obtenu est maintenu pendant 2 min à l'obscurité à la température ambiante (27 ± 3 °C), puis 1mL de solution de carbonate de sodium à 75 g/L y sont ajoutés. La solution obtenue a été ensuite incubée à 50 °C pendant 15 min. Les absorbances sont lues à partir du spectrophotomètre UV-visible à 760nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (100- 500 μ g/ml) dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Le blanc est représenté par l'éthanol additionné du Folin-Ciocalteu, de l'eau distillée et de carbonate de sodium. Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

IV.4. Estimation quantitative des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux a été réalisée par la méthode du trichlorure d'Aluminium ($AlCl_3$), conformément au protocole établi par **Bahorum et al. (1996**

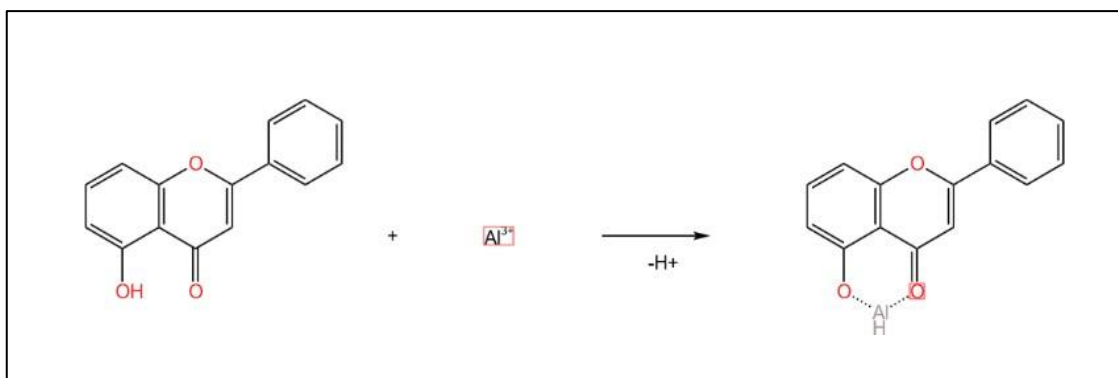


Figure II.4 : Principe de réaction entre les flavonoïdes et $AlCl_3$ [15].

Les extraits sont préparés à raison de 1mg/ml. 2ml de chaque échantillon est ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl₃ (2% dans l'éthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. Pour la quantification des flavonoïdes, la courbe d'étalonnage est établie par la quercétine à différentes concentrations (16-40 µg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage.

Les résultats sont ainsi exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) [16].

V.1. Evaluation de l'activité antioxydante du myrte

V.1.1. Evaluation du pouvoir anti radicalaire par la méthode de DPPH

La détermination de l'activité antiradicalaire de nos extraits et huile essentielle par le test de DPPH a été effectuée en utilisant la méthode décrite par **Molyneux (2003)** légèrement modifiée. Une solution éthanolique de DPPH[•] a été préparée en dissolvant 4 mg de ce produit dans 100ml d'éthanol. Ensuite, 150µl d'extrait à une concentration donnée sont ajoutés 2000µl de la solution DPPH.

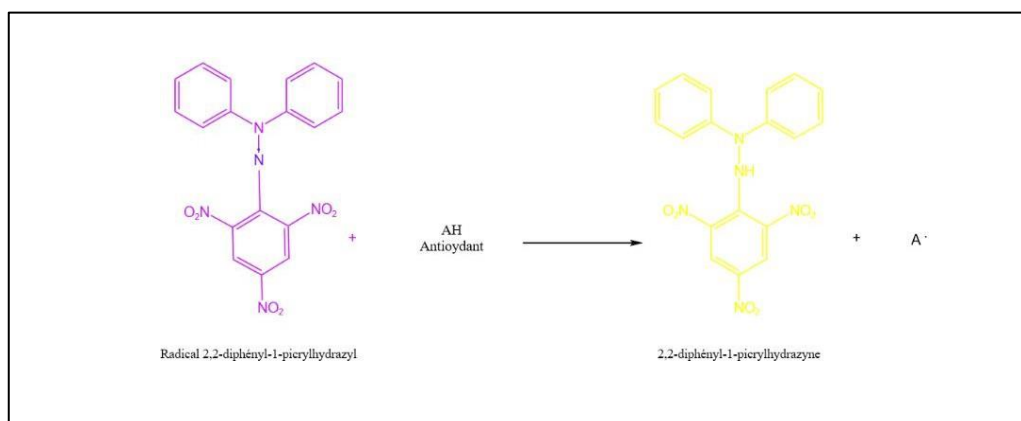


Figure II.5 : Mécanisme de réduction du radical DPPH[•] par un oxydant AH.

L'activité antioxydante liée à l'effet de piégeage du radical DPPH[•] est exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) selon la relation suivante :

$$PI (\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 \quad \text{(II.4)}$$

Où : **A₀** est l'absorbance à 517 nm de l'échantillon témoin et **A_s** est l'absorbance à la même longueur d'onde qui contient l'échantillon testé.

Les extraits éthanoliques ainsi que aqueux sont testés à différentes concentrations (31 - 62 - 120 - 250 - 500 - 1000 $\mu\text{g/ml}$). L'activité de l'huile essentielle a été évaluée pour une gamme de concentrations (62 - 125 - 250 - 500 - 1000 - 2000 $\mu\text{g/ml}$), en utilisant l'acide ascorbique comme référence (250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,62 - 7,81 $\mu\text{g/ml}$). Les mesures ont été mesurées à 517 nm après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité. Deux essais ont été réalisés pour chaque concentration de produit testé.

V12 Evaluations du pouvoir anti-radicalaire par la méthode du FRAP

La détermination du pouvoir réducteur des produits a été réalisé selon a méthode FRAP décrite par **Yen et Chen**. Ce test est basé sur la mesure de la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

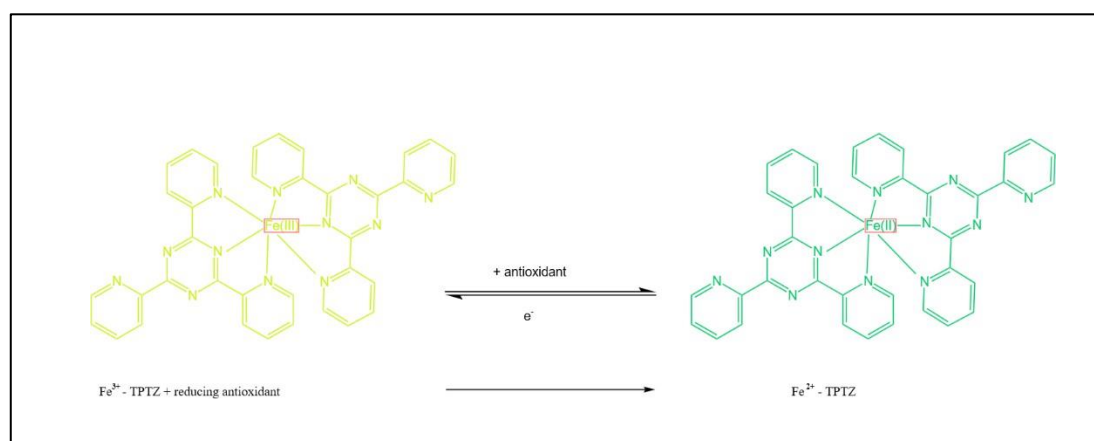


Figure II.6 : Schéma sur la réaction de test FRAP.

TPTZ : ferric2,4,6-tripyridyl-s-triazine.

Fe^{2+} : Ions ferreux.

Fe^{3+} : Ions ferriques

Une gamme de concentration de l'huile essentielle (62 - 2000 $\mu\text{g/ml}$) et les extraits (aqueux et éthanolique) à différentes concentrations (de 31 à 1000 $\mu\text{g/ml}$) a été préparée.

1ml de chaque échantillon est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de de ferricyanure de potassium à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2.5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. 2,5ml du surnageant est ajouté à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de la solution de chlorure de fer à 0,1 %. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 700 nm [18].

L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif avec un éventail de concentrations de 20 à 500µg/ml et dans les mêmes conditions expérimentales.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en Pouvoir Réducteur (PR) à l'aide de la formule suivante [19] :

$$PR = \frac{Aa - Ab}{Aa} \times 100 \quad (\text{II.5})$$

Où : **Aa** est l'absorbance de l'extrait, **Ab** est l'absorbance du blanc.

V2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire du myrte

V2.1. Inhibition de la dénaturation des protéines

L'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits éthanolique et aqueux ainsi que l'huile essentielle de la plante *M communis* est évaluée selon le test d'inhibition de la dénaturation des protéines selon le protocole de **Ghosh**

- Solution d'essai (0.5ml) composé de 0,45ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (BSA) 0.5% w/v et 0,05ml de différents extraits de la plante avec des concentrations varier (500, 1000, 1500µg/ml).
- Solution contrôle (0.5ml) composé de 0,45ml de la solution aqueuse de BSA 0.5% w/v et 0.05ml d'eau distillé.
- Solution contrôle produit (0.5ml) composé de 0.45ml d'eau distillé et 0.05ml de différents extraits de la plante avec des concentrations variées (500, 1000,1500µg/ml).
- Solution standard (0.5ml) composé de 0.45ml de la solution aqueuse de BSA 0.5% w/v et 0.05ml de la solution standard diclofénac sodium avec des concentrations variées (500, 1000, 1500 µg/ml).

Les échantillons ont été incubées à 37°C pendant 20min, ensuite la température était augmenté jusqu'à 57°C pendant 3min, après refroidissement des tubes, 205ml de la solution phosphate buffer saline (ph 6,3) a été ajouté aux solutions [21].

L'absorbance a été observée par spectrophotomètre UV-visible à 255nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines été calculée comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{(100 - (A \text{ solution d'essai} - A \text{ contrôle produit}))}{DO \text{ solution contrôle}} \times 100 \quad (\text{II.6})$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées.

V3 Evaluation de l'activité antibactérienne

V31 Préparation des cultures

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies fraîches qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

V32 Préparation de l'inoculum bactérien

Les suspensions bactériennes ont été préparées par prélèvement de colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures. A l'aide d'une pipette pasteur ces colonies sont déchargées dans un volume de 5mL d'eau physiologique stérile à 0.9%. Les suspensions bactériennes sont homogénéisées puis ajustées à 0,5 Mc Farland qui correspond à une densité optique de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm [22].

V33 L'ensemencement

Un écouvillon stérile est immergé dans la suspension bactérienne en le pressant fermement contre la paroi interne du tube afin d'optimiser le transfert bactérien. L'écouvillon est ensuite étalé sur l'intégralité de la surface de la gélose séchée, en effectuant des séries de stries serrées de haut en bas. Cette opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de Petri de 60 degrés à chaque fois, en faisant pivoter l'écouvillon sur son axe et en l'étalant sur la périphérie de la gélose pour finir l'ensemencement.



Figure II.7 : ensemencement des souches bactériennes.

V34 Détermination de l'effet antibactérien (aromatogramme)

L'aromatogramme est basé sur la technique utilisée en bactériologie médicale appelé antibiogramme [23]. Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide, dans une boîte de Pétri, à partir d'un point précis, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le

microorganisme. L'effet de la substance antibactérien sur la cible a été évalué de manière qualitative par la mesure d'une zone d'inhibition (mm) [24].

Des disques de 9 mm de diamètre, stérilisés, ont été imprégnés à raison de 20 µl de chaque échantillon. L'HE et les deux extraits ont été solubilises dans du DMSO a raison de 1024 µg/ml.

À l'aide d'une pince stérile les disques ont été déposés aseptiquement à la surface du milieu préalablement ensemencé. Les boîtes ont été incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

Après incubation l'effet des échantillons se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition circulaire transparente autour de disque correspondant à l'absence de la croissance bactérienne. L'activité antibactérienne a été déterminée de manière qualitative à l'aide de cette méthode en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible [25]. La zone d'inhibition des souches vis à vis de l'extrait et interprétée selon **Celikel et Kavas (2008)** :

- Résistante : diamètre inférieur à 8 mm.
- Sensible : diamètre compris entre 9 et 14 mm.
- Très sensible : diamètre compris entre 15 et 19 mm.
- Extrêmement sensible : diamètre supérieur à 20 mm.

V35. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée suivant la méthode de microdilution en utilisant les microplaques de 96 puits [27].

La CMI correspond à la plus faible concentration de l'HE ou d'extrait qui produit une inhibition complète de la croissance appréciable à l'œil nu du germe testé après l'incubation.

Les produits actifs ont été dissous dans du DMSO pour obtenir une concentration de solution mère de 1024 µg/ml (1.024 mg/ml). Dix dilutions en série ont été réalisées pour chaque produit et le contrôle positif. Dans le premier puits, 100 µl de notre solution ou de gentamycine et 100 µl de bouillon MH ont été ajoutés et mélangés, puis 100 µl de cette solution ont été transférés dans les puits suivants, chacun déjà contenant 100 µl de bouillon MH. À chaque puits, 10 µl de Résazurine et 10 µl d'inoculum bactérien ont été ajoutés. Chaque microplaque comprenait un contrôle de stérilité (bleu) comprenant du DMSO, du bouillon MH et de la Résazurine, un contrôle positif (gentamycine, inoculum, bouillon MH et résazurine) (bleu) et un contrôle négatif (inoculum, bouillon MH et résazurine) (rose) [28].

I. Extraction de l'huile essentielle du *Myrtus communis* L.

I.1. Détermination de la Cinétique d'extraction et le rendement

L'objectif visé dans ce travail est l'étude expérimentale de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des feuilles de Myrte à l'état sec. Le principe de la méthode consiste à suivre l'évolution de la masse de l'huile d'une même quantité de plante à des intervalles de temps de 30 mn qui s'étalent de 30 minutes 3 heures. Les quantités des huiles essentielles obtenues vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps. Le rendement est la quantité maximale d'huile essentielle que fournit une masse donnée de végétal pendant une période donnée.



Figure III.1 : : Montage avec Clevenger pour l'hydrodistillation.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{m_{HE}}{m_{MVS}} \times 100 \quad (\text{III.1})$$

Où :

R (%) : Rendement en huile essentielle
 m_{HE} : masse d'huile essentielle
 m_{MVS} : masse de matière végétale sèche

La cinétique d'extraction consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Cette étude a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile essentielle des feuilles de Myrte.

Le résultat du rendement de l'extrait aromatique (HE) obtenu est mentionné dans le tableau III.1 :

Tableau III.1 : résultats du rendement d'extraction a différentes périodes de temps.

Temps (min)	30	60	90	120	150
Rendement (%)	0,064	0,254	0,375	0,468	0,488

Les données du tableau III.1 indiquent qu'on a obtenu une quantité huileuse importante qui est de l'ordre de 0,488% à 150 min.

Nous remarquons que le rendement d'HE des feuilles sèches du myrte varie proportionnellement en fonction de la durée d'extraction jusqu'à atteindre un palier où le rendement atteint sa valeur maximale (150min), la matière végétale est alors totalement épuisée. La durée optimale d'extraction est fixée à 150min, au-delà de cette durée le rendement d'huile essentielle chute considérablement.

Le calcul de rendement en HE par rapport au poids total de la partie aérienne (feuilles) de la plante est de 0,488%, ce rendement est comparable à ceux obtenus dans la littérature.

L'extraction par hydrodistillation présente un rendement qui évolue au cours du temps, jusqu'à l'apparition d'un point d'inflexion suivi d'un plateau indiquant la fin du processus d'extraction. Ce plateau permet de déduire la localisation de l'huile essentielle au sein de l'organe étudié. Les plantes dont l'huile essentielle est contenue dans des glandes exogènes afficheront un temps d'extraction relativement court, tandis que celles dont les glandes sécrétrices d'huile sont endogènes, comme c'est le cas pour *Myrtus communis*, nécessiteront un temps d'extraction plus prolongé [1].

Ces phases d'extraction de l'huile essentielle peuvent être élucidées par l'examen des structures anatomiques spécifiques localisées et étudiées, notamment les sites sécréteurs des huiles essentielles situés en profondeur dans le mésophylle (sites endogènes). Les espèces de la famille des Myrtaceae telles que *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus radiata* et *Myrtus communis* illustrent bien ce phénomène. L'allongement du temps de latence observé s'explique par la localisation profonde des glandes sécrétrices d'huile essentielle, requérant ainsi un délai plus considérable pour l'extraction [2].

I.2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation assistée par micro-ondes

Nous avons obtenu un rendement de 0,718 % avec un temps d'extraction de 90 minutes. L'activation par micro-ondes permet d'atteindre une durée d'extraction optimale et un rendement supérieur comparé à l'hydrodistillation traditionnelle.

Tableau III.2 : rendement extraction assistée par micro-ondes.

Matière végétale	Temps	Rendement
100g	90min	0,718%

Ces résultats sont cohérents avec les recherches antérieures qui indiquent qu'un rendement maximal de 1,16 % est atteint à 600 W pour des extractions d'huile essentielle de la même espèce. À mesure que la puissance augmente, l'énergie absorbée par les matériaux devient plus importante et se convertit en chaleur, ce qui conduit à des rendements d'extraction plus élevés.

La variation du rendement des HEs dépend de nombreux facteurs tel que les parties de la plante utilisée, le génotype des plantes, l'origine géographique, la période de récolte de la plante, le degré de séchage, les conditions de séchage, temps et température de séchage et la présence des mauvaises herbes

L'activation par micro-ondes offre ainsi une méthode efficace pour optimiser l'extraction des huiles essentielles, réduisant à la fois le temps nécessaire et augmentant le rendement par rapport aux méthodes traditionnelles.

I.3. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation assistée par ultrasons

Le rendement obtenu par cette méthode est estimé à 0,809%. Ce résultat indique que l'activation par ultrasons engendre un rendement supérieur pour une quantité équivalente de matière végétale, en comparaison avec d'autres méthodes d'extraction tout en réduisant le temps nécessaire à l'extraction.

Tableau III.3: rendement d'extraction assistée par ultrasons

Matière végétale	Temps d'extraction	Rendement
100g	90min	0,809%

II. Modélisation de l'extraction de l'huile essentielle

Dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus à partir de la modélisation et de l'optimisation de l'extraction d'huile essentielle des feuilles du *Myrtus Communis* assisté par ultrasons. La matière végétale est d'abord exposée aux ultrasons puis l'huile essentielle est extraite à l'aide d'un appareil de type Clevenger. La réponse étudiée lors des expériences de modélisation est le rendement de l'essence végétale obtenue.

II.1. Criblage des facteurs

L'objectif de cette étape est de déterminer parmi les facteurs identifiés comme potentiellement influents, ceux qui ont un impact significatif sur la variable d'intérêt, à savoir le rendement d'extraction. Cette identification est indispensable pour réduire le nombre de variables à examiner dans les surfaces de réponse, permettant ainsi une analyse plus efficace et ciblée.

II.1.1. Domaine expérimental des facteurs

Les facteurs et leurs niveaux ont été sélectionnés après une analyse exhaustive des données de la littérature, en vue d'optimiser la configuration expérimentale [3].

Les facteurs pouvant potentiellement exercer une influence sur le rendement de l'extraction de l'huile essentielle sont [4] :

- Le temps d'exposition aux ultrasons (min)
- La température du bain ultrason (°C)
- Le Rapport masse de la matière végétale/masse d'eau (mg/ml)

Le domaine expérimental des facteurs est donné par le tableau III.4 suivants :

Tableau III.4 : Domaine expérimental des facteurs.

Facteurs	Variable codée	Unité	Niveau (-)	Niveau (+)
Temps	X ₁	Min	45	90
Température	X ₂	°C	60	70
Rapport	X ₃	mg/ml	1/10	1/8

II.1.2. Construction de la matrice des expériences

Le criblage des facteurs enclins d'être influents sur le rendement de l'extraction de l'huile essentielle a été réalisé en utilisant la matrice de Hadamard. Le nombre de facteurs de départ est de $k=3$, le plan d'expériences sera une matrice de 4 essais. Afin d'avoir une variance expérimentale de la réponse étudiée, nous avons réalisé un plan double, donc une matrice de 8 expériences.

La matrice d'expérience et le plan d'expériences sont représentés dans l'Annexe 02

Les valeurs du rendement de l'extraction sont illustrées dans le tableau III.5.

Tableau III.5 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle (Y%).

N° exp	Répétitions	Y (%)
1	1	0,198
2	2	0,243
3	1	0,416
4	2	0,373
5	1	0,316
6	2	0,348
7	1	0,360
8	2	0,400

II.1.3. Estimation des poids des facteurs

Il est crucial de calculer l'écart-type, le test de *Student* et le seuil de signification (%) pour chaque coefficient afin d'identifier les facteurs ayant des effets statistiquement significatifs sur la réponse, ils sont donnés par :

$$Var(y) = \frac{\sum ei^2}{N - p} \quad (III.2)$$

$$Var(bj) = \frac{Var(y)}{N} \rightarrow \sigma(bj) = \sqrt{\frac{Var(y)}{N}} \quad (III.3)$$

$$texp \frac{|bj|}{\sigma(bj)} \quad (III.4)$$

σ est l'écart-type,

N est le nombre d'expériences,

p est le nombre des constantes du modèle,

ei représente les résidus : il correspond à la différence entre la valeur expérimentale et la valeur calculée en utilisant le modèle.

En utilisant *la loi de Student*, le seuil de signification (%) est déterminé en connaissant *t exp* et le nombre de *degrés de liberté* (ddl). Dans notre analyse, les poids estimés b_j , les écarts-types et le seuil de signification sont calculés à l'aide du logiciel Nemrodw [5] et les résultats sont présentés dans le tableau III.6 :

Tableau III.6 : Estimations des coefficients du modèle.

Facteurs	Nom	Coefficient	Ecart-type	t. exp	Signif %
	b_0	0.3317	0.0101	32.92	< 0.01 ***
Temps	b_1	-0.0555	0.0101	-5.51	0.530 **
Température	b_2	-0.0243	0.0101	-2.41	7.4
Rapport L/S	b_3	0.0315	0.0101	3.13	3.53 *

t_{exp} : valeur expérimentale du rapport de Student.

* : significatif au niveau de 95%. ** : significatif au niveau de 99% et *** : significatif au niveau de 99.9%.

Typiquement, nous postulons que si le seuil de signification est inférieur à 5 %, l'impact est considéré comme significatif. Par conséquent, les données du tableau III.6 indiquent que les variables qui exercent une influence notable sur la réponse sont :

- Le temps
- Le rapport masse de la matière végétale/masse d'eau

Un modèle théorique est d'autant proche des réponses expérimentales lorsque les coefficients de détermination et le coefficient d'ajustement sont proches de 1.

Le coefficient de détermination est estimé à 0.92 indiquant ainsi une haute fiabilité du modèle dans la prévision du rendement de l'extraction de l'huile essentielle. Ceci indique aussi que 92% des résultats prédit sont fiables et que le modèle décrit bien les résultats. La valeur de R² ajusté (R_A²=0.860) consolide le résultat précédent et confirme que le modèle représentatif est bon.

II.1.4. Etude graphique des effets du rendement

La représentation graphique des effets des facteurs est illustrée par le diagramme indiqué par la figure III.2 affirme que deux facteurs sont influents sur la réponse. Il s'agit du temps d'exposition aux ultrasons et le rapport masse de la matière végétale / masse eau au sein du bain ultrason.

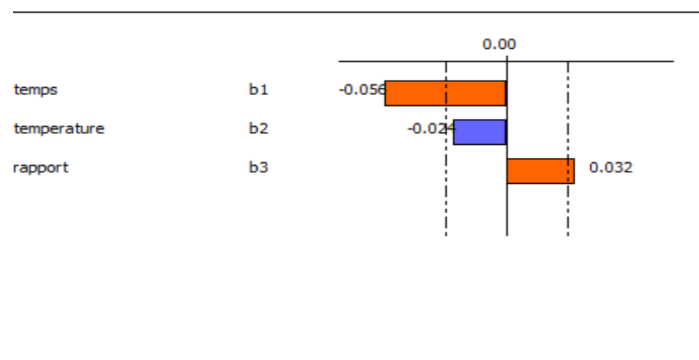


Figure III.2 : Représentation graphique des effets des facteurs.

Le temps d'exposition aux ultrasons augmente le rendement de l'huile essentielle, le coefficient relatif au temps est négatif cela indique que l'influence du facteur est négative sur le rendement d'extraction. En effet le temps d'exposition de la matrice végétale aux ultrasons induit un phénomène de cavitation qui par conséquent la rupture des parois cellulaires, la réduction de

la taille des particules ce qui améliore le transfert de matière et la récupération des composés à extraire [6].

Le coefficient relatif au rapport masse de la matière végétale/masse d'eau (R), est positif ce qui indique le ce facteur influence positivement le rendement, contrairement à la température qui avec son augmentation fait chuter le rendement de l'huile essentielle qui peut être expliquer d'une part, par la dégradation des huiles essentielles, et d'autre part, par l'évaporation d'une quantité importante d'huile sous l'effet d'éclatement des bulles de cavitation à l'interface solution-air [7].

II.2. Optimisation du rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Myrte*

Durant l'étude de criblage, les deux facteurs prises en considération, à savoir le temps de sonication et le rapport S/L, font l'objet d'une analyse approfondie à travers l'étude des surfaces de réponse. Le dispositif expérimental adopté repose sur une matrice composite centrée (PCC) conçue pour deux facteurs X1 et X2.

II.2.1. Domaine de variation des facteurs

L'étude des surfaces de réponse permet de calculer, en chaque point du domaine expérimental d'intérêt, la valeur de la réponse avec une précision au moins égale à celle qu'on obtiendrait en réalisant l'expérience. L'étude de criblage nous a permis de fixer la température à 60°C.

Dans cette étude, les facteurs à prendre à compte sont :

- Le temps
- Le rapport masse de la matière végétale/masse d'eau

Le domaine de variation de chaque facteur est représenté dans le tableau III.7 :

Tableau III.7: Domaine expérimental des facteurs.

Facteurs	Symboles	Niveau		Centre	Pas de variation
		(-1)	(+1)		
Temps(min)	X1	45	90	67.5	22.5
R(mg/ml)	X2	1/10	1/8	0.1125	0.0125

II.2.2. Matrice d'expériences

Cette matrice comprend un ensemble de 16 expériences réparties en quatre points factoriels ($N_F = 4$), quatre points axiaux ($N_\alpha = 4$ et $\alpha = 1,41$) et cinq points situés au centre du domaine ($N_0 = 5$). Les répétitions des points centraux sont réalisées dans le but d'évaluer la

reproductibilité de la méthode et de déterminer la variance de l'erreur pure. Trois points tests sont ajoutés à la matrice composite centrées afin de vérifier la validité du modèle ajusté.

La matrice d'expérience, le plan d'expérimentation ainsi que les résultats du rendement d'extraction sont représentés dans le tableau III.8 :

Tableau III.8 : Matrice d'expériences et plan d'expérimentation

N°exp	Variables codées		Variables réelles		Rendement (%)
	X1	X2	Temps(min)	R(mg/ml)	
1	-1	-1	45	0.1	0.5150
2	1	-1	90	0.1	0.5920
3	-1	1	45	0.125	0.5320
4	1	1	90	0.125	0.6290
5	-1.41421	0	35,68	0.1125	0.4990
6	1.41421	0	99,32	0.1125	0.6410
7	0	-1.41421	67,5	0.0948	0.5670
8	0	1.41421	67,5	0.1302	0.5830
9	0	0	67,5	0.1125	0.5980
10	0	0	67,5	0.1125	0.5960
11	0	0	67,5	0.1125	0.5980
12	0	0	67,5	0.1125	0.5960
13	0	0	67,5	0.1125	0.6000
14	-0.61237	-0.35355	53,72	0.1081	0.5840
15	0.61237	-0.35355	81,28	0.1081	0.7080
16	0	0.70711	67,5	0,1213	0.6440

II.2.3. Modèle mathématique

Pour traduire la dépendance du rendement d'extraction de l'huile essentielle des facteurs choisis, nous avons utilisé un modèle polynomial du second degré

$$Y_e = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$$

II.2.4. Qualité de prédiction

Pour réaliser une étude de surface de réponse, avant de passer à l'expérimental, il faut satisfaire deux critères d'optimalité [8] :

a. Fonction de variance de prédiction

Une matrice d'expérience est considérée comme prévisionnellement acceptable si elle engendre une fonction de variance de la réponse inférieure ou proche de 1 dans tout le domaine expérimental. La valeur maximale de cette fonction est désignée par d_{\max} ($d_{\max} \leq 1$). Il est crucial de connaître cette valeur pour évaluer la faisabilité de l'expérimentation. Dans notre cas, la valeur de d_{\max} s'élève à 0.23.

b. Isovariance par rotation

Nous aspirons à ce que les réponses calculées par le modèle présentent une erreur de prévision uniforme pour des points équidistants du centre du domaine d'étude. Dans ce contexte, on parle de plan isovariant par rotation, comme l'illustre la figure III.3

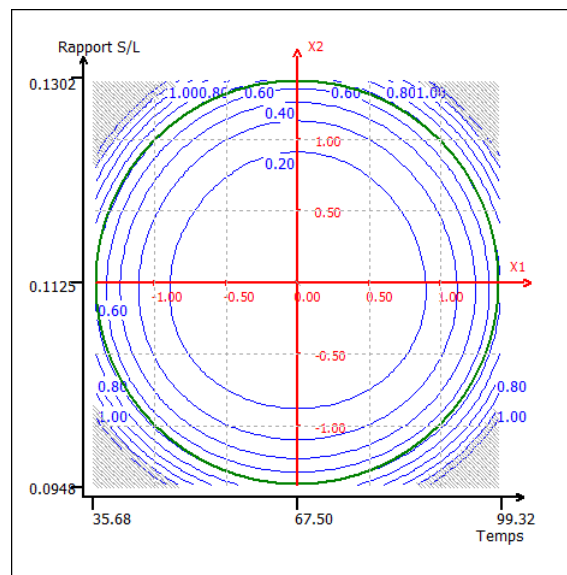


Figure III.3 : Variation de la fonction de variance.

Etant donné que la fonction de variance d_{\max} est inférieure à l'unité et que l'isovariance par rotation est assurée, nous pouvons réaliser l'expérimentation. Les résultats du rendement de l'extraction sont représentés dans le tableau III.8.

L'examen des résultats du rendement (tableau III.8) révèle des valeurs variantes entre 0,499% et 0,708%. Ces variations significatives attestent de l'influence notable du temps d'exposition aux ultrasons et le rapport masse de la matière végétale/masse d'eau.

L'analyse statistique des résultats expérimentaux repose principalement sur le calcul des coefficients du modèle, leur signification par rapport à l'erreur expérimentale, le calcul des résidus, et l'analyse de la variance de la régression. Tous ces calculs ont été effectués à l'aide

du logiciel Nemrodw. Nous examinerons la validité des résultats d'abord sans les points test, puis en les incluant.

II.3.2. Modèle mathématique affiné (avec points tests)

Pour valider le modèle, des expériences ont été menées en des points tests soigneusement sélectionnés afin qu'ils soient les plus éloignés possible des points expérimentaux. Les résultats des tests statistiques présentés dans le tableau III.9 indiquent que l'écart entre les valeurs expérimentales (Y_{exp}) et les valeurs calculées par le modèle (Y_{cal}) reste dans les limites de l'erreur expérimentale. Cela confirme que le modèle est capable de prédire avec précision les données expérimentales, même aux points les plus éloignés, validant ainsi sa robustesse et sa capacité à généraliser au-delà des données d'entraînement initiales.

Tableau III.9 : Tests statistiques appliqués aux points tests.

N°exp	Y_{exp}	Y_{cal}	ei	t_{exp}	dU	ddl	écart-type	signif%
14	0.5840	0.5707	0.0133	13.467	0.158	4	0.002	0.0176 ***
15	0.7080	0.6331	0.0749	51.016	0.158	4	0.002	< 0.01 ***
16	0.6440	0.6116	0.0324	25.092	0.158	4	0.002	< 0.01 ***

Les résultats de l'analyse statistique des données expérimentales sont consignés dans le tableau III.10 .

Tableau III.10 : Estimation et statistique des coefficients

Nom	Coefficient	Ecart-Type	t.exp.	Signif. %
b0	0.616	0.001	948.75	< 0.01 ***
b1	0.052	0.001	91.07	< 0.01 ***
b2	0.009	0.001	15.09	0.0113 ***
b1-1	-0.022	0.001	-35.77	< 0.01 ***
b2-2	-0.020	0.001	-32.90	< 0.01 ***
b1-2	0.002	0.001	2.01	11.4

*Significatif au niveau de 95%, **Significatif au niveau de 99%, ***Significatif au niveau de 99.9%*.

Les valeurs des coefficients de détermination R^2 et R_A^2 sont respectivement 0,767 et 0,65.

II.4. Analyse des résidus

Les résidus correspondent à l'écart entre la valeur expérimental du rendement et la valeur théorique calculé avec le modèle postulé. Le diagramme des résidus (Annexe 02) ne laisse apparaitre aucune relation entre les valeurs prédites (calculées) et les résidus car les points semblent disposés aléatoirement. Ce résultat traduit l'absence d'information dans les résidus et que toute l'information est expliquée par le modèle obtenu. En outre, le tracé des valeurs expérimentales en fonctions des valeurs théoriques (Annexe 02) montre que l'ensemble des points se situe autour de la première bissectrice.

II.5. Analyse de la variance (ANOVA)

Pour procéder à une analyse de la significativité statistique du modèle élaboré on utilise un outil nommé test-F (ou F-ratio), également désigné sous le nom de test de Fisher. Cet outil sert à valider la pertinence du modèle. Une variation est jugée significative pour la réponse lorsque la valeur de son F-ratio excède la valeur critique fournie par la table de Fisher [9].

La valeur de ratio-F est de 3.95, il est supérieur à la valeur critique donnée par la table de Fischer pour un risque alpha de 5% (3.33). On conclut que le modèle est validé.

L'ensemble des résultats, comprenant l'analyse statistique, l'examen des résidus et l'ANOVA, converge pour attester que le modèle élaboré offre une représentation précise dans les conditions spécifiées. Par conséquent, il sera employé pour déterminer l'optimum.

II.6. Optimisation

L'optimisation peut être effectuée en utilisant plusieurs approches tel que la fonction de désirabilité, ou bien les surfaces de réponses.

L'équation du modèle obtenue par le plan composite centré a été utilisée pour déterminer les valeurs de l'optimum. Nous avons choisi de déterminer l'optimum graphiquement avec le logiciel Nemrodw. Dans notre cas, l'objectif est de maximiser le rendement d'extraction de l'huile essentielle du Myrte (Y1).

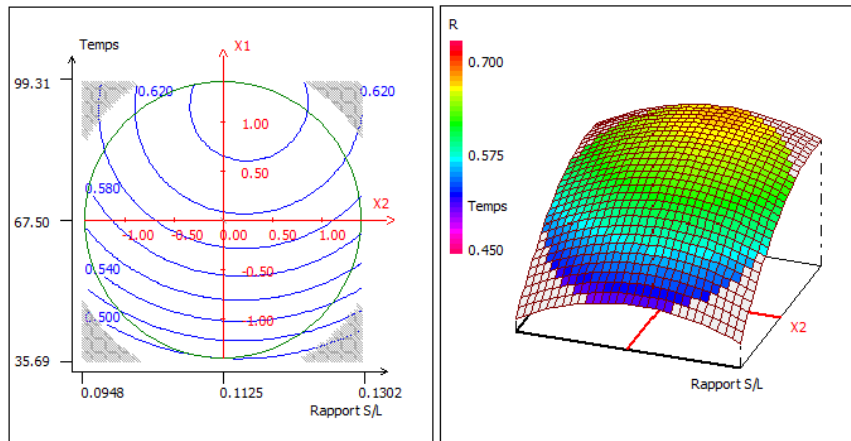


Figure III.4 : Variation de la réponse - R dans le plan : Rapport S/L, Temps.

Les résultats regroupés dans le tableau III.11 montrent que les valeurs expérimentales sont en accord avec les valeurs prédites par le modèle. L'écart observé de 3.4% est inférieur à 5%, nous constatons que le modèle élaboré est validé.

Tableau III.11 : Valeurs optimales des variables et les rendements expérimentaux et calculé

	Valeurs optimales	Rendement (%)	
		Théorique	Expérimental
Temps (min)	96.77		
Rapport S/L(mg/ml)	0.1153	0.647	0.613

III. Screening phytochimique

III.1. Teneur en eau

La teneur en eau du matériel végétal est définie comme étant la perte de masse subie par la matière végétale soumise à une opération de séchage ou à une dessiccation par évaporation. La teneur en eau a été calculée selon la relation :

$$TE (\%) = \frac{\text{poids frais} - \text{poids sec}}{\text{poids sec}}$$

Le taux d'humidité ou la teneur en eau a été déterminé selon le protocole de **Zerrad et al. (2008)** en utilisant le procédé de séchage des échantillons de poids déterminé dans une étuve à 75°C. Les feuilles ont été pesées à l'état frais avant d'être placées dans l'étuve à une température de 75°C. Ensuite, des pesées ont été effectuées toutes les 24 heures jusqu'à obtention d'un poids constant [10]. Le taux d'humidité évalué pour la partie aérienne (feuilles) a été calculé par rapport à la masse de la matière végétale sèche et fraîche. Une teneur en eau avoisinant les 22,54% a été enregistrer. Les travaux antérieurs ont montré une teneur en eau de la région du Sahel et le Littoral algérois (75,71% ± 0,01) supérieure à celle enregistrer par notre plante [11].

Cependant, **Paris et al. (1967)** ont soutenu que l'eau constitue entre 35 % et 50 % des tissus lignifiés. Les valeurs de la teneur en eau d'une même plante présentent une grande variabilité, dépendant de l'organe considéré, de l'âge de cet organe, ainsi que des conditions environnementales dans lesquelles la plante se développe [13].

III.2. Tests phytochimiques

Les résultats de la caractérisation chimique sont catégorisés selon les divers critères d'observation, nous avons ainsi notés :

- Réaction positive : (+++)
- Réaction moyennement positive (+)
- Test négatif : (---)

Les résultats du criblage phytochimique de l'espèce *Myrtus communis L.* sont illustrés dans le tableau III.12 ci-dessous :

Tableau III.12 : Résultats du criblage phytochimique.

<i>Métabolite secondaire</i>	<i>Résultats</i>	<i>Notation</i>	<i>Observation</i>
<i>Alcaloïdes</i>	R.Mayer : précipité de couleur blanche R.Wagner virement de la couleur au brun	+++ +	
<i>Flavonoïdes</i>	Coloration jaune	+++	
<i>Tanins</i>	Coloration bleue-noirâtre (tanins hydrolysables)	+++	
<i>Saponines</i>	La hauteur de la mousse est égale à 1 cm dans le tube n°2. (I=500)	+++	

<i>Stérols et triterpènes</i>	Formation d'un anneau rouge brunâtre a la zone de contact des deux liquides	++	
<i>Dérivés anthracéniques libres</i>	Absence de coloration rouge	---	
<i>Composés réducteurs</i>	Coloration rouge brique	+++	
<i>Glycosides cardiaques</i>	Coloration rouge brunâtre	+	
<i>Quinones libres</i>	Virement de la couleur au jaune	+	
<i>Coumarines</i>	Présence d'une fluorescence	+++	

Le criblage phytochimique réalisé sur les feuilles du *Myrtus Communis L.* a révélé la présence de divers métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, composés réducteurs, saponines ainsi que les coumarines.

De la littérature les auteurs signalent la présence des mêmes métabolites secondaire pour la même espèce étudiée [14, 15]

L'extrait aqueux a montré une faible présence de stérols, triterpènes, glycosides cardiaques, et les quinones libres. Par contre il ne renferme pas les dérivés anthracéniques libres, conformément à l'étude de [16].

III.3. Détermination de la teneur des polyphénols totaux

La teneur en composé phénolique des extraits aqueux et éthanolique ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique exprimés en $\mu\text{g/ml}$, en utilisant l'équation de la

régression linéaire de la courbe d'étalonnage pour l'acide gallique : $y = 2,8x + 0,12$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9899$ (Annexe 03)

Les résultats des taux en polyphénols pour les extraits aqueux et éthanolique sont représentés dans la figure III.5.

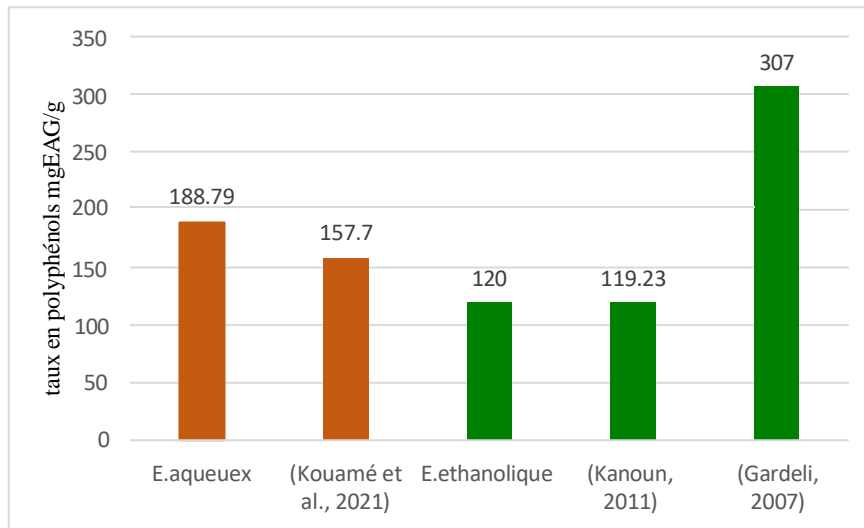


Figure III.5 : Teneurs en polyphénols totaux.

Nous avons obtenu une valeur de $188,79 \pm 0,44$ mgEAG/g de matière fraîche dans L'extrait aqueux et $120 \pm 0,44$ mg EAG/g de matière fraîche pour l'extrait éthanolique, Selon les valeurs enregistrées nous avons remarqué que l'extrait aqueux de *Myrtus communis L.* est le plus riche en polyphénols.

Le taux en composés phénoliques que nous avons enregistré pour l'extrait éthanolique concorde avec les résultats de **Kanoum et ses collaborateurs (2011)** qui est de l'ordre de $119,23 \pm 0,77$ mg EAG /g. Par contre varie considérablement avec les travaux de **(Gardeli, 2007)** qui a enregistré une teneur de 307mgEAG/g.

Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels ; les conditions environnementales, les conditions climatiques ainsi que les conditions de stockage, la période de collecte, la maturité et les facteurs génétiques.

Concernant l'extrait aqueux nos résultats sont largement élevés que ceux enregistré par **Kouamé et ces collaborateurs** qui est de $157,70 \pm 2,65$ mg EAG/g de matière fraîche pour la même espèce végétale.

Le contenu phénolique dans les extraits dépend également du type d'extraits, il a été observé que le mélange d'extraction avec un pourcentage d'eau plus élevé retirait une plus grande

quantité de phénols que le mélange d'extraction avec un pourcentage d'éthanol plus élevé. Cela peut être attribué à plusieurs facteurs : des concentrations élevées d'éthanol dénatureront les protéines qui empêchent la dissolution des phénols, et de faibles niveaux d'éthanol dans l'extraction permettront d'accéder facilement aux cellules et de dissocier les composés phénoliques complexes liés à protéines et polysaccharides dans les parois cellulaires [20].

III.4. Estimation quantitative des flavonoïdes totaux

La quercétine est considérée comme composé de référence utilisé pour le dosage des flavonoïdes totaux. Les résultats obtenus sont représentés dans la courbe d'étalonnage ayant l'équation ($y= 0,0262x-0,0158$) avec un R^2 de l'ordre 0,9913 (Annexe 03).

La teneur de flavonoïdes totaux varie légèrement selon le solvant employé comme l'illustre la figure III.6

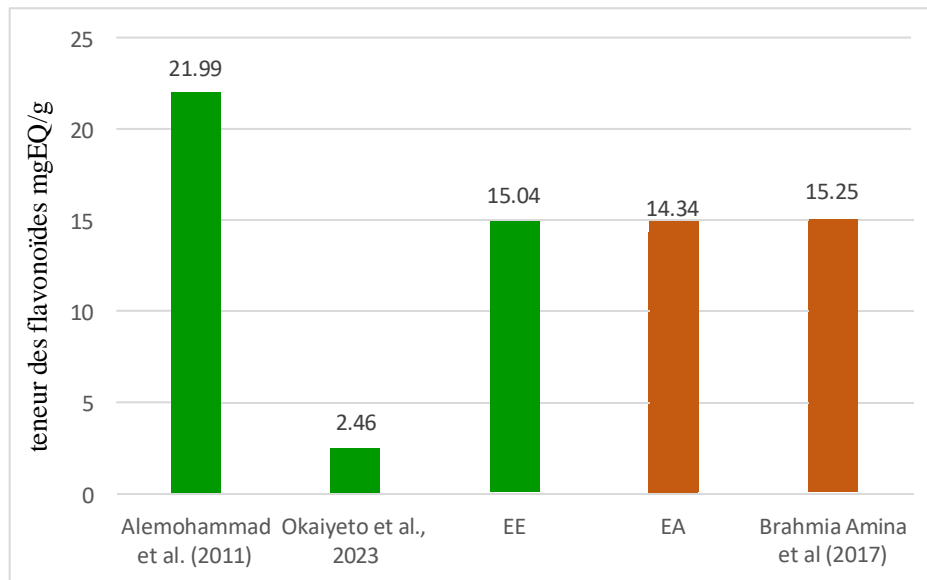


Figure III.6 : teneur des flavonoïdes totaux.

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique est de 15,04mgEQ/g, une valeur subtilement plus élevée en comparaison avec l'extrait aqueux, d'une teneur de 14,34 mg EQ/g. Dans les extrait hydroalcooliques l'alcool permet aux composants de la plante d'absorber l'eau et d'augmenter en taille, permettant à l'alcool pour pénétrer facilement dans la matrice solide et conduire à une augmentation extraction et composants bioactifs de la plante [21, 22].

En se référant à la littérature nos résultats révèlent un meilleur taux de flavonoïdes par rapport à ceux publiés par **Okaiyeto et al., (2023)** qui ont enregistré un taux 2,46 mg EQ/g.

Cependant, **Alemohammad et al. (2011)** rapportent une teneur relativement élevée, soit 21,99 mg EQ/g, dans les échantillons de feuilles de *Myrtus communis L.* provenant d'Iran.

Les résultats de L'extrait aqueux indique une proportionnalité avec la littérature qui ont rapporté une teneur de 15,25 mg EQ/g [24].

D'après **Lapronik et ces collaborateurs (2005)**, le dosage des flavonoïdes est basé sur la solubilisation des composés flavonoïdique dans les solvants. Une solubilité qui dépend du nombre, du type et de la position de la liaison des glucides avec les flavonoïdes. La concentration des flavonoïdes dans les extraits des plantes dépend également type de standard utilisé (quercétine) qui peut aussi changer les résultats [26].

III.5. Caractérisation de l'huile essentielle du *Myrtus communis l.*

III.5.1. Caractéristiques organoleptiques

Tableau III.13 : caractéristique organoleptique de l'HE.

Caractéristique	Couleur	Aspect	Odeur
	Jaune à jaune clair	Liquide	Forte odeur boisée et aromatique

Notre huile essentielle se présente sous forme liquide à température ambiante et se caractérise surtout par une couleur jaune clair et une odeur prononcée rappelant celle des feuilles. Nos résultats sont superposables à ceux obtenus par **Touaibia et al. (2014)**.

III.5.2. Caractéristiques physico-chimiques

III.5.2.1. Indice de réfraction

La valeur de l'indice de réfraction obtenu est de 1.428, très proche de celui rapporté dans la littérature (1.468). L'indice de réfraction renseigne sur la qualité de l'huile essentielle, variant avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés de l'huile essentielle. Une forte teneur en monoterpènes donne généralement un indice élevé [27, 28].

III.5.2.2. Indice d'acide

Le dosage effectué révèle une valeur de l'indice d'acide de 5,049 mg KOH/g d'huile, laquelle est inférieure à celle rapportée par **KARAOUI Radia & TISEMLAL Nawel**, ainsi que par **Bouza et Hamimi (2007)**, qui ont respectivement trouvé des valeurs de IA=1.468 et 6.97.

Un faible indice d'acidité indique que l'huile essentielle est stable, tandis que l'oxydation, qui conduit à sa dégradation, se manifeste par une augmentation de cet indice [31].

III.5.2.3. Indice de saponification

Notre huile essentielle présente notamment une valeur de 62.334 qui est moins élevée que celle trouvée en littérature qui est de 73.86 par **Otsmane, Aicha 2018**, mais presque deux fois plus élevée que (**Hagos et al., 2017**) qui est de 36.465.

La connaissance de l'indice de saponification d'un corps gras nous renseigne sur la longueur de la chaîne carbonée des acides constituant ce corps gras. L'indice de saponification d'un corps gras est d'autant plus élevé que la chaîne carbonée des acides gras est courte [34].

III.5.2.4. Indice d'ester

Concernant l'indice d'ester nous notons 57.285, une valeur nettement plus élevée que celle obtenue dans la littérature qui est de 32.014 [35]. Les valeurs d'indice d'ester indiquent que l'huile contient d'importantes quantités d'acide libre. Les esters sont souvent associés à des arômes agréables et à des propriétés thérapeutiques bénéfiques, telles que des effets calmants et anti-inflammatoires. Et il est admis que plus l'indice d'ester est élevé plus la qualité de l'huile est bonne [37].

III.5.2.5. Potentiel hydrogène

Étant donné que nos résultats présentent une valeur inférieure à 7 sur l'échelle de pH, il est possible d'affirmer que notre huile a un caractère acide et peut suggérer que l'huile essentielle n'a pas été altérée ou dégradée. En général, une huile essentielle bien conservée et non oxydée tend à avoir un pH légèrement acide [38]. Le fait que l'huile essentielle ait conservé un pH légèrement acide après extraction suggère que le processus d'extraction a été effectué correctement. Une extraction inadéquate pourrait entraîner des modifications du pH, indiquant une dégradation ou une présence de composés indésirables.

IV. Evaluation de l'activité antioxydante du myrte

IV.1. Evaluation du pouvoir anti radicalaire par la méthode de DPPH

Cette méthode chimique est l'une des plus couramment appliquées pour déterminer la capacité antioxydante d'un composé à capturer les radicaux libres, car elle est considérée comme pratique, rapide et stable. La mesure de l'absorbance montre des différents échantillons analysés est représenté dans la figure III.7.

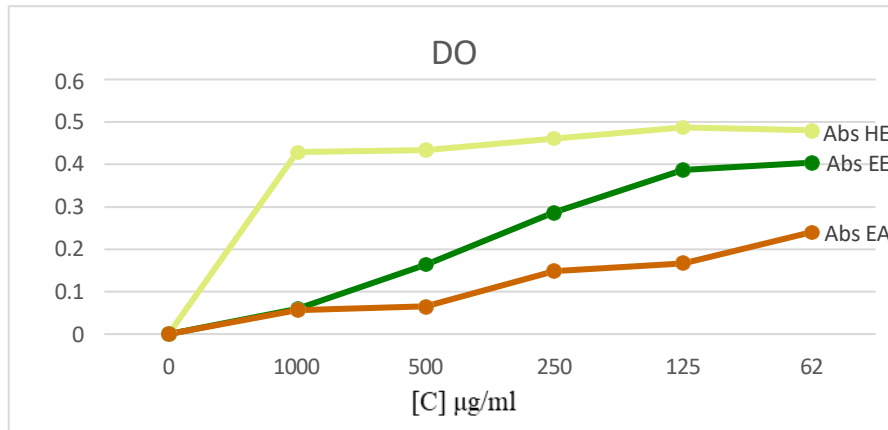


Figure III.7 : Densité optique des échantillons.

Le DPPH absorbe à 515 nm, mais après sa réduction par l'antioxydant l'absorption diminue. D'après les résultats représentés dans la figure III.7, il apparaît clairement que l'augmentation de la concentration des extraits et de l'huile essentielle entraîne une augmentation de l'activité antioxydante.

Au vu de ces résultats, les extraits et l'huile essentielle de *Myrtus communis L.* ont montré une très bonne activité antioxydante, par rapport à l'acide ascorbique à une concentration de 1000µg/ml.

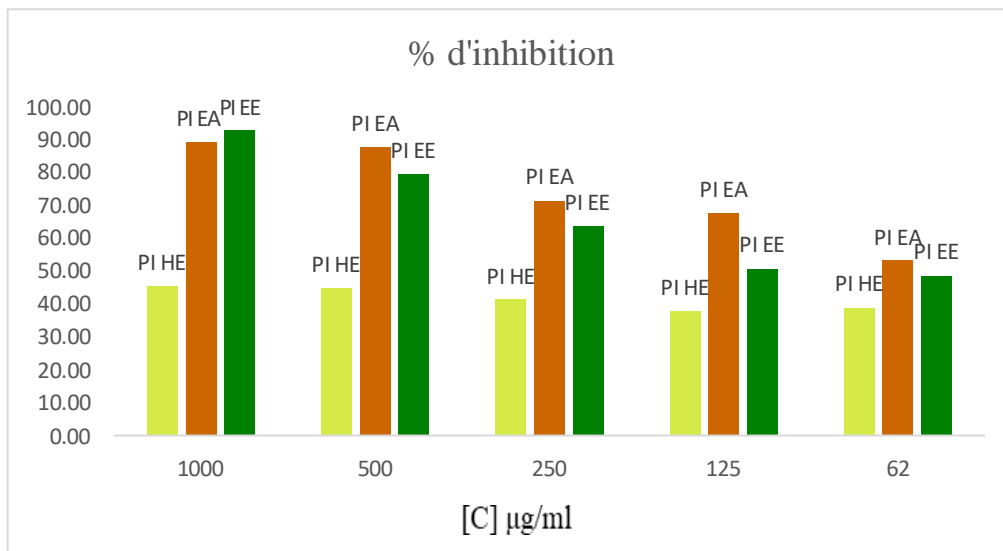


Figure III.8 : variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration.

À 1000 µg/ml : L'extrait éthanolique montre la plus forte l'inhibition avec un pourcentage d'inhibition de 92.47%, suivi EA (88.87%) et HE (45.28%).

À **500 µg/ml** : EA maintient une activité antioxydante très élevée, proche de celle observée à 1000 µg/ml. EE montre une activité légèrement inférieure à EA mais reste élevée. Par contre l'HE a une activité antioxydante autour de 40%, ce qui est nettement inférieur aux deux autres extraits.

À **250 µg/ml** : EA et EE montrent une activité antioxydante similaire, toutes deux autour de 60%. L'HE a une activité autour de 30%, inférieure aux deux autres.

À **125 µg/ml** : EA a une activité antioxydante supérieure à EE, mais les deux restent relativement élevées par rapport à l'HE qui montre une activité antioxydante autour de 37%.

À **62 µg/ml** : Toutes les activités antioxydantes des extraits diminuent encore plus mais reste au voisinage des 50%. L'HE préserve une valeur constante aux alentours des 38%.

La capacité antioxydante de tous les échantillons diminue avec la diminution de la concentration, ce qui est attendu dans ce type de tests. L'EA montre globalement la meilleure capacité antioxydante parmi les échantillons testés, suivi de près par EE et enfin par HE, Qui montre une inhibition significative du radical DPPH^{*} de manière dose dépendante.

Les résultats indiquent que les extraits, particulièrement l'extrait aqueux, possèdent une capacité significative à neutraliser les radicaux libres, une propriété précieuse pour des applications antioxydantes. Cette capacité est due essentiellement à la richesse de l'EA en composants bioactifs [39].

Généralement le pouvoir antioxydant est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène des composés phénoliques.

IV.1.1. Détermination de la IC₅₀

La capacité de capture des extraits a été exprimée en tant que valeur IC₅₀ (la concentration du substrat qui provoque une perte de 50 % de l'activité DPPH). Des valeurs IC₅₀ basses indiquent une forte capacité des extraits à agir en tant que captateurs de DPPH [40].

IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

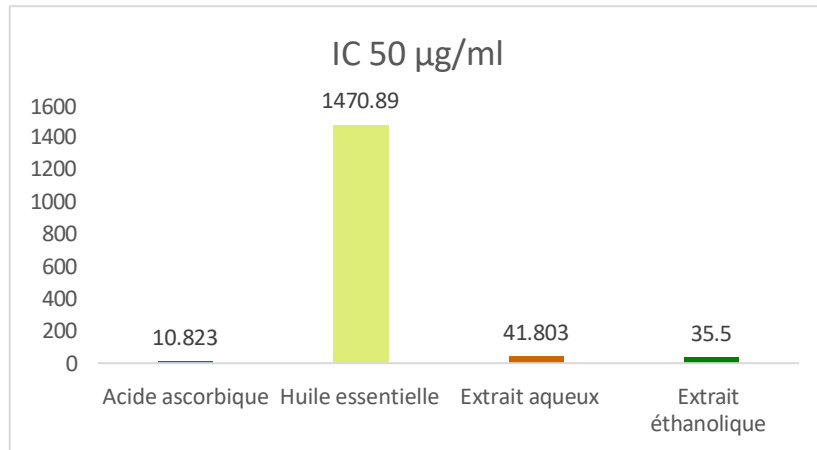


Figure III.9 : IC₅₀ des différents extraits.

Les extraits de *Myrtus communis L.*, ont démontré une capacité substantielle à réduire la concentration des radicaux libres DPPH, avec une réduction significative observée. Les extraits des feuilles obtenus à partir d'eau et d'éthanol ont affiché des valeurs de concentration de 41,803 et 35,50 µg/ml respectivement, comparativement à la valeur standard dont l'IC₅₀ est de 10,82 µg/ml.

L'activité anti-oxydante des extraits dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante [41]. Il a été démontré que les extraits de *Myrtus communis L.*, récoltés en période estivale sont les plus anti-oxydants [43].

D'après la figure III.9, notre huile essentielle présente un pouvoir antioxydant conforme avec celui décrit dans la littérature qui indique une activité antioxydante avec une concentration minimale inhibitrice de 1470,89 µg/ml, bien que moins efficace que le standard. Les huiles essentielles de *Myrtus communis L.*, montrent une IC₅₀ relativement faible. Ces résultats corroborent les observations rapportées antérieurement dans une étude concernant l'huile essentielle extraite des feuilles de myrte commun récoltées en Iran [44].

Les différentes activités antioxydantes entre ces huiles essentielles peuvent être dues à la variabilité de la composition et de la concentration des composés soufrés. Elles peuvent également être attribuées à la présence et la synergie des différents composés mineurs [45].

IV.2. Evaluations du pouvoir anti-radicalaire par la méthode du FRAP

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction du fer est une méthode simple et reproductible. Cette technique peut être appliquée aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux [46]. Les résultats du PR calculés sont illustrés dans la figure ci-suite (annexe 03) :

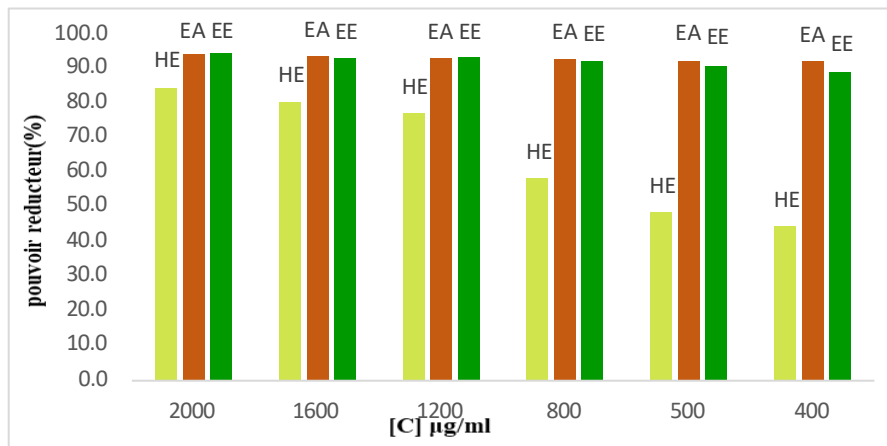


Figure III.10 : pouvoir réducteur des différents échantillons

À l'issue de l'analyse de la figure III.10, il apparaît que les deux extraits manifestent une activité antioxydante notable. À une concentration maximale de 2000 µg/ml, l'extrait aqueux démontre un pouvoir réducteur atteignant 93,9 %. Même à des concentrations plus basses, cet extrait conserve une activité substantielle, se maintenant autour de 91 %.

L'analyse indique que l'extrait éthanolique exhibe également une activité notable de réduction du fer, avec des valeurs qui se comparent à celles de l'extrait aqueux et se rapprochant sensiblement du standard. Une activité maximale de 94,4 % est observée à la concentration la plus élevée (2000µg/ml). En diminuant la concentration, le pouvoir réducteur fluctue légèrement, atteignant 89,1 % à la concentration minimale.

Cependant, l'huile essentielle affiche des valeurs inférieures à celles des deux extraits, tout en présentant une activité antioxydante remarquable. Il est à noter que l'action de l'huile essentielle est dose-dépendante, le pouvoir réducteur augmentant avec la concentration en huile essentielle pour atteindre un maximum de 84,4 % de réduction du fer.

Le classement de nos échantillons de *Myrtus communis L.* Selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique, on obtient l'ordre suivant : acide ascorbique > extrait aqueux > extrait éthanolique > huile essentielle.

Cette activité réductrice élevée peut être expliquée par les travaux de **Romani et al** qui ont montré que les feuilles de *Myrtus communis L.* contiennent des teneurs élevées de flavonols responsables de l'activité antioxydante. De plus, la qualité de ces molécules détermine l'ampleur des propriétés biologiques. En effet, l'action de ces substances est due à leur structure, au nombre de groupements donneurs d'hydrogène et au nombre élevé des groupements hydroxyles présentant une activité antioxydante élevée. Le potentiel réducteur des extraits

végétaux est dû à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables, terminant de ce fait les réactions en chaînes [48].

V. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire du myrte

L'activité anti-inflammatoire in vitro des différents extraits des feuilles de *Myrtus communis* a été mise en évidence par la méthode d'inhibition de la dénaturation de l'albumine (BSA), le processus par lequel les protéines perdent leur structures secondaires et tertiaires dans des conditions extérieures [49].

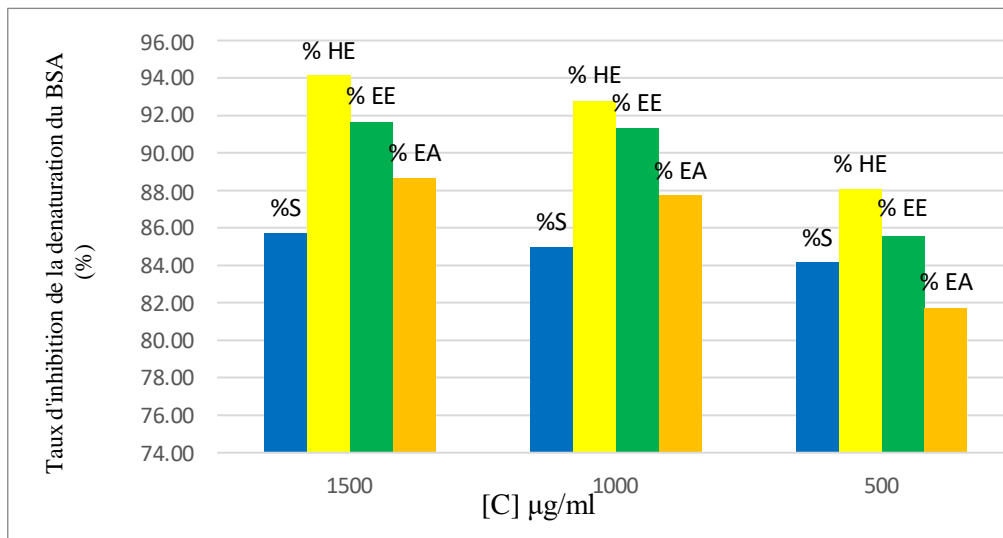


Figure III.11 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA.

Au vu des résultats présentés dans la figure III.11 l'HE et les extraits exercent une excellente activité anti-inflammatoire dépassant les 80%. L'extrait éthanolique a développé une inhibition concentration-dépendante avec un pourcentage maximal de 91,63 % enregistré avec la dose 1500 µg/ml et l'extrait aqueux montre un meilleur résultat à la même concentration avec un pourcentage de 88,69%. Concernant l'huile essentielle le meilleur pourcentage d'inhibition a été estimé à 94,13 % pour la concentration de 1500 µg/ml. Ces pourcentages dépassent ceux du diclofénac (85,73%).

Notre huile essentielle est dotée d'un pouvoir exceptionnel étant capable de préserver la BSA de la dénaturation d'environ 88,07% à 500 µg/ml, en comparant nos résultats avec l'huile essentielle de la même espèce confère un taux d'inhibition de la dénaturation du BAS de 61,80 (%) à seulement 100 µg/ml [51]. De plus l'HE de myrte possède un pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA de 64,08 % à 200 µg/ml [52].

Les auteurs attribuent cela aux présences de monoterpènes oxygénés tels que l'eucalyptol et le linalol et leurs multiples mécanismes qui se chevauchent, seuls ou en combinaison [53].

L'activité anti-inflammatoire des différents échantillons de notre espèce végétale se révèle plus significative que celle rapporté dans la littérature. Selon une étude menée sur les extraits aqueux et alcoolique, l'inhibition observée est de 53.08% et 55.60 % respectivement pour une concentration de 1500 µg/ml [54].

VI. Evaluation de l'activité antibactérienne

VI.1. Détermination de l'effet antibactérien (aromatogramme)

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau III.14.

Tableau III.14 : sensibilité et diamètre de la zone d'inhibition des extraits testés vis-à-vis les germes à étudier.

Souches testées	Sensibilité			Diamètre moyen (mm)		
	HE	EE	EA	HE	EE	EA
<i>Escherichia Coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-	12	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	19	12	14

D'après les résultats recensés dans le tableau III.14 la souche *Escherichia Coli* manifeste une résistance face à tous nos échantillons. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de la littérature qui ont montré que *Escherichia coli* est résistante face à l'HE du Myrte [55].

Ce test qualitatif montre que la souche *Staphylococcus aureus* est sensible seulement à l'extrait éthanolique avec un diamètre d'inhibition de 12mm.

Pseudomonas aeruginosa, une souche bactérienne Gram (-) s'est avérée sensible à nos trois échantillons testés. L'huile essentielle du Myrte a montré une bonne activité avec un diamètre de 19mm. De plus, cette souche a montré une sensibilité aux extraits éthanolique et aqueux avec des diamètre d'inhibition de 12 et 14 respectivement.

Il a été rapporté que cette espèce végétale exerce une excellente activité sur la majorité des souches Gram positif, avec des diamètres d'inhibition allant de 25mm à 28mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) [56]. Le myrte commun du Maroc présente un effet inhibiteur sur les bactéries Gram (+) et Gram (-) [57].

VI.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

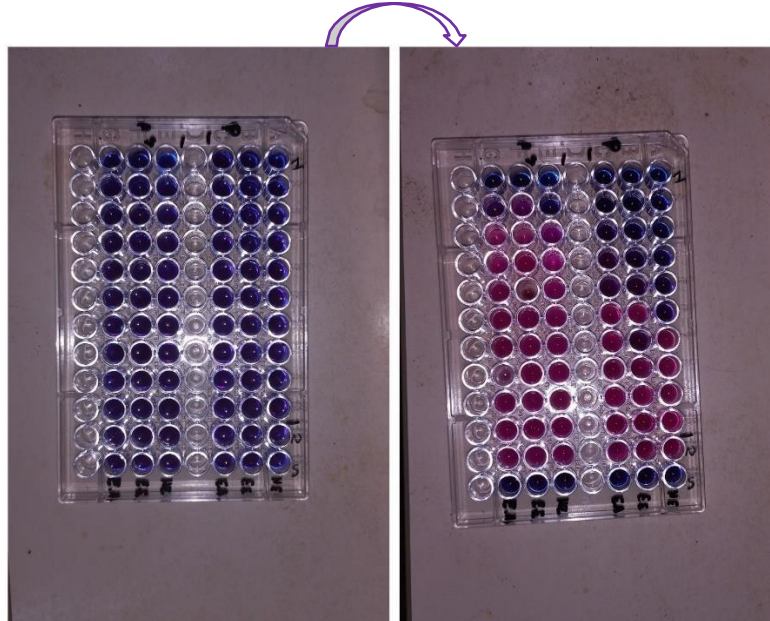


Figure III.12 : détermination de la CMI par méthode microdilution en milieu liquide sur microplaque.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont présentées dans le Tableau III.15 :

Tableau III.15 : valeurs de la CMI des différents échantillons.

Composé	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HE	1/32	1/4
EE	1/16	1/2
EA	1/16	1/2
Gentamycine	2	4

Selon les résultats du tableau III.15, l’huile essentielle a montré un effet antibactérien plus prononcé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 31.25 µg/ml inférieure à celle décrites dans la littérature. Les extraits aqueux et éthanolique ont montré une bonne activité avec une CMI de 62.5 µg/ml vis-à-vis de *S.aureus*. Les 3 composés exercent un effet antibactérien sur le *S. aureus* avec des CMI inférieure à celle de l’antibiotique (2 µg/ml).

Pseudomonas aeruginosa est une souche sensible à la gentamycine avec une CMI de 4 µg/ml, toutefois a montré une certaine résistance vis-à- vis des échantillons testés avec des CMI de 250 µg/ml (HE) et 500µg/ml (EE et EA).

Au regard de ces résultats, l’huile essentielle de *M. communis* a montré un effet antibactérien plus prononcé vis-à-vis de *S.aureus* Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices sont inférieures à celles décrites dans la littérature. L’HE testée sur *Staphylococcus epidermis* et *Staphylococcus aureus* a montré des CMI de 0,25 µg/ml et CMI = 0,25% (v/v) (2,5 µl/mL) [58].

De même l'extrait hydro-alcoolique de feuilles de myrte inhibe *S. aureus* avec une concentration minimale inhibitrice de 0,2 mg/ml. Toutefois, nos extraits se distinguent par une capacité inhibitrice supérieure, présentant des valeurs de concentration minimale inhibitrice encore plus réduites [59]. L'extrait aqueux de *Myrtus communis*, préparée à partir des feuilles sèches, montre une activité contre les bactéries Gram négatif étudiées, avec une CMI variant de 12,5 à 50 mg/ml [60].

L'activité de l'HE de *Myrtus communis* a été attribuée à ses composants majeurs (1,8-cinéole, α -pinène, limonène, acétate de myrtyle, α -terpinéol et γ -terpinène), qui sont des hydrocarbures et des monoterpènes oxygénés connus pour leurs effets antibactériens, qui augmenteraient la perméabilité de la membrane cytoplasmique en perturbant l'ordre des protéines intégrées à la membrane, inhibant ainsi la respiration cellulaire, les processus de transport des ions et l'absorption des nutriments [61, 62, 63].



*CONCLUSION
GÉNÉRALE*



La phytothérapie, qui utilise des plantes provenant de régions spécifiques, apparaît comme une alternative face aux critiques grandissantes concernant l'efficacité et les risques potentiels des médicaments chimiques. Le *Myrtus communis* se distingue comme un exemple de plante répondant à ces préoccupations, ce qui motive cette étude visant à explorer ses potentielles utilisations thérapeutiques

L'étude de la cinétique d'extraction a révélé qu'un rendement optimal d'huile essentielle de 0,488% est atteint après 150 minutes d'extraction. En comparant différentes techniques d'activation, il a été observé que l'activation par ultrasons permet d'obtenir un rendement supérieur (0,809 %) comparativement à l'activation par micro-ondes (0,718 %).

Pour optimiser l'extraction par hydrodistillation assistée par ultrasons, la modélisation par plans d'expériences a été employée. Un criblage des facteurs, utilisant une matrice d'Hadamard, a identifié le temps d'exposition aux ultrasons et le rapport masse de matière végétale/masse d'eau comme variables significatives. La validation du modèle mathématique, confirmée par des points tests et une analyse de variance, a démontré que le modèle prédit le rendement dans tout le domaine expérimental. Les courbes d'isovariance ont permis de déterminer les conditions optimales, avec des résultats expérimentaux ayant confirmé les prédictions du modèle avec un écart de seulement 3,4 %, validant ainsi l'efficacité du modèle.

Le screening phytochimique de notre espèce végétale a révélé la richesse en métabolites secondaire notamment flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, composés réducteurs, saponines ainsi que les coumarines. Le dosage des polyphénols totaux par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (en équivalent d'acide gallique) a souligné la concentration élevée de polyphénols dans l'extrait aqueux ($188,79 \pm 0,44 \text{ mgEAG/g}$) par rapport à l'extrait éthanolique ($120 \pm 0,44 \text{ mgEAG/g}$). L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), en équivalent à la quercétine montre des valeurs voisines des deux extraits.

L'étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle vis-à-vis du radical DPPH a révélé une activité modérément inférieure à celle de l'acide ascorbique ($\text{IC}_{50} = 1470,89 \mu\text{g/ml}$). Les deux extraits ont également montré un pouvoir inhibiteur significatif, avec une concentration efficace pour réduire de 50 % le DPPH de $35,5 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait éthanolique et de $41,803 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux. L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP révèle que l'huile essentielle présente un puissant pouvoir réducteur, atteignant 84%, dépendant de la dose, tout comme les deux extraits qui ont montré un pouvoir réducteur constant, approchant les 90% même à des concentrations diminuées.

L'analyse de l'activité anti-inflammatoire par la méthode d'inhibition de la dénaturation de l'albumine (BSA) révèle que l'huile essentielle a atteint un taux maximal d'inhibition de 94,13%, suivi de près par l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux.

Cette étude a confirmé le pouvoir antibactérien significatif de l'huile essentielle et des extraits, en particulier vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, bien que leur efficacité contre la souche Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* soit relativement moindre.

Pour de futures recherches, il serait bénéfique de mener des études plus approfondies avec les objectifs suivants :

- Isoler et caractériser les métabolites spécifiques des extraits éthanolique et aqueux responsables de la puissante activité antioxydante.
- Réaliser des analyses biochimiques des extraits et l'huile essentielle pour caractériser la nature chimique des substances impliquées dans l'activité anti-inflammatoire ce qui nécessite l'implication des méthodes plus performantes comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase liquide (HPLC).

Cela pourrait conduire au développement de produits à haute valeur ajoutée dans divers secteurs industriels, exploitant les propriétés bénéfiques de *Myrtus communis L.*

- [1] Jollois R, Franchomme P et Pénéol D. 2001. L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Ed. Roger Jollois. 445p.
- [2] Deschepper R. 2017. Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie, Thèse de doctorat, Faculté de Pharmacie, Université d'Aix Marseille, France. 160 p.
- [3] Anderson. O.M ; Markham. K.R. (2006). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press, Taylor & Francis Group, 1(32): 397-425.
- [4] Quezel. P; et Santa. S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II Edition. CNRS. Paris: 804-806.
- [5] Beloued A., 2001. Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Office des Publications Universitaires, Alger.
- [6] Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytother Res* 2014; 28:1125-36.
- [7] Wahid Nadya, Abdousse Jamal, Chkhichekh Aissa, El Aboudi Ahmed, Lamhamedi Mohammed S., Bakry Mustapha. Prospection et modalités d'échantillonnage pour capturer la diversité génétique des populations naturelles : cas du *Myrtus communis* L. au Maroc / Prospecting and sampling procedures to capture the genetic diversity of natural populations : case of *Myrtus communis* L. in Morocco . In: *Ecologia mediterranea*, tome 44 n°1, 2018. pp. 85-96;
- [8] Ciccarelli, D., Garbari, F. et Pagni, AM (2008). La fleur de *Myrtus communis* (Myrtaceae) : Structures sécrétoires, papilles unicellulaires et leur rôle écologique. *Flore - Morphologie, distribution, écologie fonctionnelle des plantes*, 203(1), 85-93.
- [9] Sacchetti, G., Muzzoli, M., Statti, G. A., Conforti, F., Bianchi, A., Agrimonti, C., ... & Poli, F. (2007). Intra-specific biodiversity of Italian myrtle (*Myrtus communis*) through chemical markers profile and biological activities of leaf methanolic extracts. *Natural Product Research*, 21(2), 167-179.
- [10] Migliore, J. Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en Méditerranée et au Sahara. In. Aix-Marseille 3. 2011
- [11] Goetz P, Ghedira K (2012) *Phytothérapie infectieuse*, SpringerVerlag, Paris, Collection : *Phytothérapie pratique* 7
- [12] Paul Franceschini. *Myrtus communis* L. en Corse et en Méditerranée : de sa composition chimique jusqu'à ses utilisations thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. 2016.
- [13] Satrani, B., Farah, A. et Talbi, M. (2006). Effet de la distillation fractionnée sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis* L.) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 153(2), 235-242.
- [14] Bouchenak, O., Yahiaoui, K., Benhabyles, N., Laoufi, R., Toubal, S., El Haddad, D., ... & Arab, K. (2020). Criblage phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles de *myrtus communis* L. et *ramnus alaternus* L.
- [15] Abdiche, S., Boutellaa, N., & Sebti, M. E. (2004). Etude quantitative et qualitative des huiles essentielles de *Myrtus communis* L (Doctoral dissertation, Université de jijel).
- [16] Wahid, N., (2013). Perspectives de la valorisation de l'usage et de la culture du *Myrtus communis* L. au Maroc. *Phytothérapie*, 11: 237-243.
- [17] Henna, A. (2016). Extraction et étude de l'activité biologique des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis* L.). Université de Mostaganem, Algérie, 177.
- [18] Migliore J., 2011. Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en méditerranée et au Sahara. Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III. Faculté des Sciences et Techniques, Discipline Biologie des populations et Ecologie.
- [19] Henna, A. (2016). Extraction et étude de l'activité biologique des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis* L.). Université de Mostaganem, Algérie, 177.
- [20] Birhanie, Muluken Walle; Walle, Bizuayehu; Lebata, Kidist Reba (2016). Hypnotic effect of the essential oil from the leaves of *Myrtus communis* on mice. *Nature and Science of Sleep*, Volume 8(), 267-275.
- [15] Abdiche, S., Boutellaa, N., & Sebti, M. E. (2004). Etude quantitative et qualitative des huiles essentielles de *Myrtus communis* L (Doctoral dissertation, Université de jijel).
- [21] Boukef, M. K. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne.
- [22] Couic-Mariner, F., & Lobstein, A. (2013). Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 22
- [23] Bouzabata, A. (2015). CONTRIBUTION A L'ÉTUDE D'UNE PLANTE MÉDICINALE ET AROMATIQUE

- [24] MYRTUS COMMUNIS L (Doctoral dissertation, Faculté de Médecine, Université Badji-Mokhtar, Annaba, Algérie.).
- [25] Justine, M. G. POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE.
- [26] Moha, R. (2019). La réglementation des huiles essentielles dans les médicaments, dispositifs médicaux, produits cosmétiques, compléments alimentaires et biocides.
- [27] Gbenou Djimon, J. (1999). Huiles essentielles de quelques plantes aromatiques des genres eucalyptus et melaleuca (myrtacees) et chenopodium (chenopodiacees) du Bénin: variations inter et intraspécifiques du rendement et de la composition chimique et propriétés pharmacodynamiques
- [28] Justine, M. N. POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE.
- [29] Couic-Marinié, F., & Lobstein, A. (2013). Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 22-25.
- [30] Bouakkaz, S. (2013). Métabolites secondaires du figuier *Ficus carica* L., Isolement, identification structurale, dosage par HPLC couplée à la spectrométrie de masse et activités biologiques (Doctoral dissertation).
- [31] Lima, P. S., Lucchese, A. M., Araujo-Filho, H. G., Menezes, P. P., Araujo, A. A., Quintans-Junior, L. J., & Quintans, J. S. (2016). Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydrate Polymers*, 151, 965-987.
- [32] Allen, KG, Banthorpe, DV, Charlwood, BV, Voller, CM : *Phytochemistry* 16, 79-83 (1977)
- [33] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. et Idaomar, M. (2008). Effets biologiques des huiles essentielles – Une revue. *Toxicologie alimentaire et chimique*, 46(2), 446-475.
- [34] Gbenou Djimon, J. (1999). Huiles essentielles de quelques plantes aromatiques des genres eucalyptus et melaleuca (myrtacees) et chenopodium (chenopodiacees) du Bénin: variations inter et intraspécifiques du rendement et de la composition chimique et propriétés pharmacodynamiques.
- [35] Gbenou Djimon, J. (1999). Huiles essentielles de quelques plantes aromatiques des genres eucalyptus et melaleuca (myrtacees) et chenopodium (chenopodiacees) du Bénin: variations inter et intraspécifiques du rendement et de la composition chimique et propriétés pharmacodynamiques.
- [36] Samate, D. A. (2002). Compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanaise du Burkina Faso, 250p.
- [37] Martinetti, P. (2013). *Mon guide des huiles essentielles*. Fernand Lanore.
- [38] Roulier, G. (1990). *Les huiles essentielles pour votre santé*. St. Jean-de-Braye, France: Dangles.
- [39] Bowles, E. J. (2020). *Chemistry of aromatherapeutic oils*. Routledge.
- [40] Haj Ammar, A. ; Zagrouba, F. ; Romdhane, M. ; Abderrabba, M. (2010). EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE MYRTE (*MYRTUS COMMUNIS* L.) PROVENANT DE LA TUNISIE PAR HYDRODISTILLATION. *Acta Horticulturae*, (853), 241-250.
- [41] Aydın, C., & Özcan, M. M. (2007). Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey. *Journal of food engineering*, 79(2), 453-458.
- [42] Nassar, M. I., Aboutabl, E. S. A., Ahmed, R. F., El-Khrisy, E. D. A., Ibrahim, K. M., & Sleem, A. A. (2010). Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy research*, 2(6), 325.
- [43] Adorjan B., Buchbauer G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 407–426.
- [45] Valnet, M. (2005). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth *International Journal of Food Microbiology*, 85, 73-81.
- [46] Chalchat, J. C., Garry, R. P., & Michet, A. (1998). Essential oils of myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral. *Journal of essential oil Research*, 10(6), 613-617.
- [47] Mebarki, N. (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne (Doctoral dissertation, Boumerdès).
- [48] Mebarki, N. (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne (Doctoral dissertation, Boumerdès).
- [49] Bouaziz, A. L. (2014). Identification de métabolites secondaires des plantes, protecteurs des photorécepteurs à cônes pour le traitement de la rétinopathie pigmentaire (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie- Paris VI).
- [50] Bruneton J. (1987). *Elément de phytochimie et pharmacognosie*, Paris : Lavoisier - Tech. & doc., 584 p.
- [51] BOUDEN, O. (2020). Etude des activités biologiques d'une plante médicinale (Doctoral

dissertation).

[52] BOUDEN, O. (2020). Etude des activités biologiques d'une plante medicinale (Doctoral dissertation).

[53] Walker J.E.M, Saraste M.J, Runswick and N.J.Gay., 1982.- Distantly related sequences in the alpha- and beta- subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The Embo Journal*, 1(8): 945-51.

[54] Kaur, H., & Halliwell, B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS letters*, 350(1), 9-12.

[55] Djeddi, S., Yannakopoulou, E., Papadopoulos, K., & Skaltsa, H. (2015). Activités anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus numidicus* Poiret., Algérie. *Afrique Science: Revue Internationale Des Sciences Et Technologie*, 11(2), 58-65.

[56] Fleurentin J. 2016. *Du Bon Usage des Plantes qui Soignent*. Ouest-Fran. Ed : Rennes.

[57] Embeya, V. O., & Mavungu, G. N. (2019). Evaluation de l'activité antipyrétique, analgésique et anti- inflammatoire de l'extrait méthanolique de *Vitex congolensis* De Wild. & T. Durand. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(7), 3066-3078.

[58] Belkacemi Imane, (2014). *Activité anti inflammatoire des extraits des feuilles de Clematis flammula*, UNV de Mira Bégai, 2.

[59] Duwiejua M, Zeitlin I J, (1993). Plants as source of anti-inflammatory substances. In: *Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals*. Harvey A L. Eds, Taylor & Francis (RoyaumeUni), pp: 153.

[60] Kherbache, A, (2018). *Propriétés anti-inflammatoire et antioxydant des extraits d'anacyclus clavatus* (Doctoral dissertation).

[61] Alwash, M. S., Ibrahim, N., Ahmad, W. Y. (2013). Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma malabathricum* linn leaves. *American Journal of Infectious Diseases*, 9(2): 46-58. 54 Billing, J., Sherman, P. W. (1998). Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology*, 73(1): 3-49

[62] Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., & Barrett, J. F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 225-230.

[63] Mahmood, N., Pizza, C., Aquino, R., De Tommasi, N., Piacente, S., Colman, S., ... & Hay, A. J. (1993). Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antiviral Research*, 22(2-3), 189-199.

[64] Mohamadi, Y. (2023). *Etude phytochimique et activités biologiques des huiles essentielles des populations du genre Myrtus L. en Algérie* (Doctoral dissertation).

[65] Mila, I., & Scalbert, A. (1993, September). Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis. In *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance* 381 (pp. 749-755).

[66] Lucchesi ME, Chemat F and Smadja J. 2004. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs. Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A*, 1043 (2) : 323-327

[67] AFNOR. 1996. *Huiles essentielles. Volume 1 : échantillonnage et méthodes d'analyse*. AFNOR, Paris. 440 p.

[68] Bremness L and Griggs P. 2005. *Plantes médicinales et aromatiques*. Ed. Le grand livre du mois, Paris. 304 p.

[69] Bruneton J. 2016. *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales*. Tec. & Doc. Lavoisier 5ème édition, Paris. 1504 p.

[70] Khadraoui, A. (2014). *Extraction et pouvoir bio-inhibiteur de substances naturelles d'origine vegetale vis-a-vis de la corrosion acide de l'acier*.

[71] Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 2ème Ed. Lavoisier. Paris. pp. 405-426.

[72] Mohamadi, Y. (2023). *Etude phytochimique et activités biologiques des huiles essentielles des populations du genre Myrtus L. en Algérie* (Doctoral dissertation).

[73] Sahraoui, N. (2012). *Mise au point d'un nouveau procédé d'extraction d'huiles essentielles assisté par micro- ondes: application à la valorisation de plantes locales et comparaison avec les procédés conventionnels* (Doctoral dissertation).

[74] Lahlou M. 2001. *Contribution à l'étude des activités antiparasitaires et insecticides par les plantes*

- médicinales Marocaines. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de Ain Chock, Casablanca, Maroc. 300 p.
- [75] Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. E.E. Stashenko, B. E. Jaramillo, J.R. Martinez, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1025, 105-113.
- [76] Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. E.E. Stashenko, B. E. Jaramillo, J.R. Martinez, *Journal of chromatography A*, 2004, 1025, 93-103.
- [77] Li, Y., A.S. Fabiano-Tixier & F. Chemat, 2014. Essential Oils: From Conventional to Green Extraction. In: *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. Springer International Publishing, p.p. 9-20.
- [78] Herzi, N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂- supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat. 185 p.
- [79] Chemat, Farid, Tomao, Valérie, Virot, Mattieu. Chapter 5: Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis. In: Semih Otles, *Handbook of Food Analysis Instruments*. Boca Raton: CRC Press, 2008, pp. 85-103.
- [80] Trambouze, P. and J.-P. Wauquier, *Le développement des procédés de raffinage et de pétrochimie*. Vol. 3. 1975: Éditions Technip
- [81] Candiotti, L.V., De Zan, M.M., Camara, M.S., Goicoechea, H.C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124, 123-138
- [82] Louvet, F., Delplanque, L. (2006). *Design of experiments : the French touch/ Les plans d'expériences : une approche pragmatique et illustrée*. Témoignage de l'association Expérimentique.
- [83] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965-977.
- [84] Rabier, F. (2007). Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire (Doctoral dissertation).
- [85] Rguig, M., *Méthodologie des surfaces de réponse pour l'analyse en fiabilité des plateformes pétrolières offshore fissurées*. Thèse de Doctorat, Ecole doctorale : 'Mécanique, Thermique et Génie Civil' Université de Nantes, 2005
- [86] Mesli, M., *Séparation des ions de Pb(II) et Cu(II) par les techniques d'émulsion et au point trouble. Etude comparative et modélisation par les plans de Box-Benheken*. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, 2017.
- [87] Sebaoui, O. (2018). *Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron et de son utilisation dans l'encapsulation des composés phénoliques des margines de l'industrie oléicole* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- [88] Sebaoui, O. (2018). *Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron et de son utilisation dans l'encapsulation des composés phénoliques des margines de l'industrie oléicole* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- [89] Goupy, J., *La méthode des plans d'expérience, optimisation des choix des essais & de l'interprétation des résultats*. 1995, Paris: Dunod.
- [90] Goupy, J. (2001). *Introduction aux plans d'expériences*. Dunod (Ed.), Paris.
- [91] Kamoun. (2011). *Plans d'expériences et traitements de surface-Etude quantitative des effets et interactions*. Editions TI.
- [92] Louvet, F., Delplanque, L. (2006). *Design of experiments : the French touch/ Les plans d'expériences : une approche pragmatique et illustrée*. Témoignage de l'association Expérimentique.
- [93] Halhal, Y., Hadroug, S., *Optimisation par le plan d'expérience Box-Behnken de la production d'une pectinase à partir des écorces d'agrumes*. Mémoire de Master, Université A. Mira-Bejaia, 2017.
- [94] Goupy, J., *Les plans d'expériences*. Revue MODULARD, 2006.
- [95] Rguig, M., *Méthodologie des surfaces de réponse pour l'analyse en fiabilité des plateformes pétrolières offshore fissurées*. Thèse de Doctorat, Ecole doctorale : 'Mécanique, Thermique et Génie Civil' Université de Nantes, 2005
- [96] Rabier, François. *Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire*. 239p. Thèse de doctorat: Génie Mécanique: Toulouse, INP: 2007.

- [97] Montgomery, Douglas C. Design and Analysis of Experiments, 8th ed.; John Wiley & Sons: Arizona State University. 2013. 757p.
- [98] Thuy, K., Lim, K. Response Surface Methodological Approach to Optimize the Coagulation-Flocculation Process in Drinking Water Treatment. 2011. Chem. Eng. Res. Des., 89(7): 1126-1135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2010.12.004>
- [99] Goupy, J., Les plans d'expériences. Revue MODULARD, 2006.
- [1] Amami, E. & Kallali, Sirine & Mahouachi, Wifek & Besombes, Colette & Hamrouni, Lamia. (2017). Optimisation de l'extraction assistée à l'ultrason et étude des activités biologiques des extraits bruts de *Myrtus communis* L..
- [2] Rhayour, K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.
- [3] NFT 60 212 (AFNOR, 1984). Détermination de l'indice de réfraction. Association Française de Normalisation, Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérivés. Ed. AFNOR, 1984. Paris.
- [4] Baaziz C., Baghail N., Guffens N., Greerts J., Stenotte V., Satassin M. et Theys A. (2005). Les matières grasses. Université catholique de Louvain, 23p.
- [5] AFNOR (1981). Recueil des normes françaises. Graine oléagineuse, produits dérivés, Paris, 438p.
- [6] LAOUFI, R., BOUDJEMA, K., LEFKIR, S., BENHABYLES, N., BOUCHENAK, O., & YAHIAOUI, K. Composés bioactifs.
- [7] NFT 60 206 (AFNOR, 1981). Détermination de l'indice de saponification. Association Française de Normalisation, Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuse, produits dérivés. Ed. AFNOR, 1981. Paris.
- [8] Masumbuko, M. (1996). Screening phytochimique de *Achillea Millefolium* l et *Bridelia Brideliifolia* et tests d'activité biologique sur *Escherichia Coli*, *Salmonella Polyvalento* et *Shigella Flexneri* par la méthode de tests antibiogrammes. Institut supérieur pédagogique de Bukavu.
- [9] Bouchenak, O., Yahiaoui, K., Benhabyles, N., Laoufi, R., Toubal, S., El Haddad, D., ... & Arab, K. (2020). Criblage phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles de *myrtus communis* l. et *rhamnus alaternus* L.
- [10] Boussahel, S. Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie, 2011. These en Biologie et Physiologie végétale.
- [11] Boussahel, S. Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie, 2011. These en Biologie et Physiologie végétale.
- [12] Ganfon, H., Houvohessou, J. P., Assanhou, A. G., Bankole, H. S., & Gbenou, J. (2019). Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique et des fractions de *Anogeissus leiocarpa* (DC) Guill. Et Perr. (Combretaceae). International Journal of Biological and Chemical Sciences, 13(2), 643-651.
- [13] Majhenic L., Kerget M.S., et Knez Z. (2007) Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry. 104, 1258–1268.
- [14] Eddy, D. R., Nursyamsiah, D., Permana, M. D., Solihudin, Noviyanti, A. R., & Rahayu, I. (2022). Green production of zero-valent iron (ZVI) using tea-leaf extracts for fenton degradation of mixed rhodamine B and methyl orange dyes. Materials, 15(1), 332.
- [15] Lagnika, L. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. France/Bénin: Université Louis Pasteur Strasbourg/Université d'Abomey Calavi, 280.
- [16] Hebi, M., & Eddouks, M. (2016). Évaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana*. Phytothérapie, 14(1), 17-22.
- [17] Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of agricultural and food chemistry, 43(1), 27-32.
- [18] Mezouar, D., Lahfa, F. B., Djaziri, R., & Boucherit-Otmani, Z. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante de *Berberis vulgaris* L. Phytothérapie, 12(5), 297-301.

- [19] Dieng, S. I. M., Fall, A. D., Diatta-Badji, K., Sarr, A., Sene, M., Sene, M., ... & Bassene, E. (2017). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(2), 768-776.
- [20] Ghosh Susmita, Saha Kalyani, Dasgupta Subir Chandra, Gomes Antony. In vitro and in vivo anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Bungarus fasciatus* venom. *Journal of toxins*. 2015; 2 (1): 5.
- [21] Ghosh Susmita, Saha Kalyani, Dasgupta Subir Chandra, Gomes Antony. In vitro and in vivo anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Bungarus fasciatus* venom. *Journal of toxins*. 2015; 2 (1): 5.
- [22] Haddouchi F., Chaouche T.M. & Halla N. 2016. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, Pp: 1-9.
- [23] De Billerbeck, V.-G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5: 249–253.
- [24] Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L. & Vergnes, M.-F. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6: 160–164.
- [25] Choi, W., Lee, C., & Park, H. (2006). Development of biodegradable hot-melt adhesive based on poly-[epsilon]-caprolactone and soy protein isolate for food packaging system. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 591e597.
- [26] Celikel, N., Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J Food Sci*, 26:74-81.
- [27] Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharma Analysis* 6:71–9
- [28] Benslimani, A. (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.
- [1] Ramanoelina O., (1992). Chemical composition of niaouli essential oil from madagascar. *Journal of essential oil research*, 4 (6) : 657-658.
- [2] Ramanoelina O., (1992). Chemical composition of niaouli essential oil from madagascar. *Journal of essential oil research*, 4 (6) : 657-658.
- [3] Bouaoudia-Madi, Nadia; Boulekbache-Makhlouf, Lila; Madani, Khodir; Silva, Artur M.S.; Dairi, Sofiane; Oukhmanou-Bensidhoum, Sonia; Cardoso, Susana M. (2019). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus communis* L. Pericarp. *Antioxidants*, 8(7), 205–. doi:10.3390/antiox8070205
- [4] Haj Ammar, A. ; Zagrouba, F. ; Romdhane, M. ; Abderrabba, M. (2010). EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE MYRTE (*MYRTUS COMMUNIS* L.) PROVENANT DE LA TUNISIE PAR HYDRODISTILLATION. *Acta Horticulturae*, (853), 241-250. est ce que je:10.17660/actahortic.2010.853.28
- [5] Mathieu, D., Nony, J., Phan-tan-luu R Nemrodw software. (2007). LPRAI, Marseille.
- May, C.D. (1990). *Industrial Pectins : Sources, Productions and applications*. *Carbohydrate Polymens*. 12, 79 - 99.
- [6] Pétrier, C., N. Gondrexon, and P. Boldo, *Ultrasons et sonochimie. Techniques de l'ingénieur. Sciences fondamentales*, 2008(AF6310).
- [7] Haj Ammar, A., Zagrouba, F., Romdhane, M., & Abderrabba, M. (2009, March). Extraction de l'Huile Essentielle de Myrte (*Myrtus communis* L.) Provenant de la Tunisie par Hydrodistillation. In *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009* 853 (pp. 241-250).
- [8] Goupy, J., *Les plans d'expériences. Revue MODULARD*, 2006.
- [9] Berkane, Nabila & Smail, Meziane & Aziri, Sabrina. (2019). Optimization of Congo red removal from aqueous solution using Taguchi experimental design. *Separation Science and Technology*. 55. 1-11. 10.1080/01496395.2019.1577442.

- [10] Zerrad, W., Maataoui, B. S., Hilali, S., El Antri, S., & Hmyene, A. (2008). Etude comparative des mécanismes biochimiques de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. *Lebanese Science Journal*, 9(2), 27-36.
- [11] MILLA, A., DAOUDI-HACINI, S., VOISIN, J. F., & DOUMANDJI, S. (2011). Caractéristiques biochimiques de quelques espèces de fruits charnus communes dans le Sahel algérois recherchées par les oiseaux frugivores. *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 1(1), 10-10.
- [12] Paris R., Moyes H., (1967). Matière médicale. Tome II. Edition Masson, 438p.
- [13] Leforestier, R. (2021). État hydrique des tissus végétaux mesuré par IRM (Doctoral dissertation, Rennes 1).
- [14] Dellaoui, H. (2021). Contribution à l'étude des effets de la plante médicinale *Myrtus communis* contre la toxicité du Cadmium chez le rat Wistar. Etudes biochimique et histologique (Doctoral dissertation, Université Dr Moulay Tahar de Saïda (Algérie)).
- [15] Diaz, A.M.; Abeger, A. Contribution to the study of phenolic compounds of *Myrtus communis* L. seeds flavonols, phenolic acids. *Plantes Med. Phyto.* 1987, 21, 317–322.
- [16] Djahra, A. B., Benkaddour, M., Benkherara, S., & Ouahiba, B. (2020). Antioxidant and hepatoprotective potential of *Coriandrum sativum* L. against hepatic injury by lambda-cyhalothrin insecticide. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(3-s), 182-188.
- [17] Kanoun K ; 2011. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire de magister. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
- [18] Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K. & Komaitis M., 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* 107 - 1120–1130
- [19] Kouamé, T. K., Siaka, S., Kassi, A. B. B., & Soro, Y. (2021). Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de *Piliostigma thonningii* (Caesalpiniaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(1), 97-105.
- [20] Henna, A., Miguel, M. G., & Nemmiche, S. (2018). Antioxidant activity of *myrtus communis* l. and *myrtus nivellei* batt. & trab. extracts: a brief review. *Medicines*, 5(3), 89.
- [21] Galanakis, C.M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G.A., Gekas, V., 2013. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int. J. Food Prop.* 16 (2), 382–396.
- [22] Okafor, J.N., Rautenbauch, F., Meyer, M., Le Roes-Hill, M., Harris, T., Jideani, V.A., 2021. Phenolic content, antioxidant, cytotoxic and antiproliferative effects of fractions of *Vigna subterraenea* (L.) verde from Mpumalanga, South Africa. *Heliyon* 7 (11), e08397.
- [23] Alemohammad F., Zand B. et Karamian R., 2011. Evaluation of total phenol and flavonoïde contents, antioxidant and anti bacterial activities of *Myrtus communis* L. *Biochimie clinique*, 44, 347.
- [24] Brahmia Amina Chenichene Asma, K. Z. (2017). Etude phytochimique et l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro de certains extraits d'une plante médicinale: *Myrtus communis* L.
- [25] Lapornik, B., Prošek, M., & Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71(2), 214-222.
- [26] Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselfela, H., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.
- [27] Karaoui, R., & Tisemlal, N. (2021). Contribution a la caractérisation des huiles essentielles et des hydrolats de myrte et de carotte sauvage (Doctoral dissertation, M'hamed Bougara faculté des sciences).
- [28] Chua, L.Y. ; Chong, C.H. ; Chua, B.L. ; & Figiel, A. (2019). Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: a review. *Food and Bioprocess Technology.*, 12(3): 450-476. doi:10.1007/s11947-018- 2227-x.

- [29] Karaoui, R., & Tisemlal, N. (2021). Contribution a la caractérisation des huiles essentielles et des hydrolats de myrte et de carotte sauvage (Doctoral dissertation, M'hamed Bougara faculté des sciences).
- [30] Zheng, Y., Fang, D., Lv, Y., Deng, B., Li, X., Luo, Y., ... & Chen, D. (2024). Current Analytical Strategies for the Determination of Phytosterols in Vegetable Oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106279.
- [31] Cliff P., et Harerimana P.C., (2013). Extraction de l'huile essentielle complète des fleurs de *Canaga odorata* de la plaine de l'Imbo : vers la vulgarisation d'une nouvelle filière de plantes industrielles au Burundi. *Revue de l'université de burundi, série sciences exactes*, 28 : 1-17p.
- [32] Etude de certaines activités biologiques du Myrte (*Myrtus communis* L.) récolté dans la région de Tipaza, Otsmane, Aicha.
- [33] Hagos, Z., Mulugeta, A., Gopalakrishnan, V. K., Chaithanya, K. K., & Nagaraju, B. (2017). Chemical composition and physicochemical properties of essential oil from *Myrtus communis*. *Int. J. Pharm. Clin. Res*, 9(6), 439-443.
- [34] Novidzro, K. M., Wokpor, K., Fagla, B. A., Koudouvo, K., Dotse, K., Osseyi, E., & Koumaglo, K. H. (2019). Etude de quelques paramètres physicochimiques et analyse des éléments minéraux, des pigments chlorophylliens et caroténoïdes de l'huile de graines de *Griffonia simplicifolia*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(4), 2360-2373.
- [35] Hagos, Z., Mulugeta, A., Gopalakrishnan, V. K., Chaithanya, K. K., & Nagaraju, B. (2017). Chemical composition and physicochemical properties of essential oil from *Myrtus communis*. *Int. J. Pharm. Clin. Res*, 9(6), 439-443.
- [36] Hagos, Z., Mulugeta, A., Gopalakrishnan, V. K., Chaithanya, K. K., & Nagaraju, B. (2017). Chemical composition and physicochemical properties of essential oil from *Myrtus communis*. *Int. J. Pharm. Clin. Res*, 9(6), 439-443.
- [37] Hilan, C., Sfeir, R., Jawish, D., & Aitour, S. (2006). Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae. *Lebanese Science Journal*, 7(2), 13-22.
- [38] Djousse, B. M. K., Ngoune, N. F., Djoukeng, H. G., Nono, L. W., Sogang, H. S., & Tangka, J. K. (2022). Extraction et caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques cultivées à l'Ouest-Cameroun: *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* et *Cymbopogon citratus*. *Cameroon J Biological and Biochemical Sciences*, 30(2), 121-133.
- [39] Dellaoui, H. (2021). Contribution à l'étude des effets de la plante médicinale *Myrtus communis* contre la toxicité du Cadmium chez le rat Wistar. *Etudes biochimique et histologique* (Doctoral dissertation, Université Dr Moulay Tahar de Saïda (Algérie)).
- [40] Benchikh, F., Amira, S., & Benabdallah, H. (2018). The evaluation of antioxidant capacity of different fractions of *Myrtus communis* L. leaves. *Annual Research & Review in Biology*, 22(5), 1-14.
- [41] S. Burda et W. Oleszek. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Food chemistry*. 49(2001):2774-2779.
- [42] C. Gardeli, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris et M. Komaltis. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*. 107(2008):1120-1130
- [43] Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12), 1249-1255.
- [44] Mnayer, D. (2014, December). Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Avignon.
- [45] Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F., 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology* 41, 385-390.
- [46] Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, F. F., & Franconi, F. (2004). Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free radical research*, 38(1), 97-103.
- [47] Ferreira, M. V., Alencastro, A. C., & Hermes-Lima, M. (2003). Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Canadian journal of zoology*, 81(7), 1239-1248.

- [48] Sivapalan, S.; Dharmalingam, S.; Venkatesan, V.; Angappan, M.; Ashokkumar, V. Phytochemical analysis, anti-inflammatory, antioxidant activity of *Calotropis gigantea* and its therapeutic applications. *J. Ethnopharmacol.* 2023, 303, 115963.
- [49] Belahcene, S., Kebsa, W., Omoboyowa, D. A., Alshihri, A. A., Alelyani, M., Bakkour, Y., & Leghouchi, E. (2023). Unveiling the Chemical Profiling Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Algerian *Myrtus communis* L. Essential Oils, and Exploring Molecular Docking to Predict the Inhibitory Compounds against Cyclooxygenase-2. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1343.
- [50] Belahcene, S., Kebsa, W., Omoboyowa, D. A., Alshihri, A. A., Alelyani, M., Bakkour, Y., & Leghouchi, E. (2023). Unveiling the Chemical Profiling Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Algerian *Myrtus communis* L. Essential Oils, and Exploring Molecular Docking to Predict the Inhibitory Compounds against Cyclooxygenase-2. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1343.
- [51] Tichati, L. Chemical characterization with GC-MS and evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of Algerian essential oil from *Myrtus communis*. *South. Asian J.* 2022, 12, 267–274.
- [52] Akbar, A.; Gul, Z.; Chein, S.H.; Sadiq, M.B. Investigation of Anti-Inflammatory Properties, Phytochemical Constituents, Antioxidant, and Antimicrobial Potentials of the Whole Plant Ethanolic Extract of *Achillea santolinoides* subsp. *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter of Balochistan. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2023, 23, 2567333
- [53] Brahmia Amina Chenichene Asma, K. Z. (2017). Etude phytochimique et l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro de certains extraits d'une plante médicinale: *Myrtus communis* L.
- [54] Satrani, B., Farah, A., & Talbi, M. (2006). Effet de la distillation fractionnée sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis* L.) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 153(2), 235-242.
- [55] Belhadji, K. A., Bouzouina, M., & Addou, A. (2022). Étude de l'activité antibactérienne et identification des substances bioactives de différents extraits de *Myrtus communis*. *Phytothérapie*, 20(6), 288.
- [56] Chabaibi A., Marouf Z., Lahazi F., Filali M., Fahim A., Ed-Dra .2016 Evaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc
- [57] Rossi P.G., Berti L., Panighi J., Luciani A., Maury J., Muselli A., Serra D. de R., Gonny M., Bolla J.-M., 2007. Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research* 19, 176–182.
- [58] Paul Franceschini. *Myrtus communis* L. en Corse et en Méditerranée : de sa composition chimique jusqu'à ses utilisations thérapeutiques. *Sciences pharmaceutiques*. 2016. ffdumas-01315207f.
- [59] C. Messaoud, A. Laabidi, M. Boussaid. *Myrtus communis* L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Food Science*, 77(9), 2012, p941-947
- [60] Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 47:565–73
- [61] Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Complementary Medicine Research*. 16(2): 79-90.
- [62] Amensour, M. Sendra, E. Abrini, J. Bouhdid, S. Pérez-Alvarez, J. A. Fernández-López, J. (2009). Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Natural Product Communications*. 4(6): 819-424.



Annexes

Annexe 01

Tableau II.2 : Modes opératoires du criblage phytochimique.

<i>Tests</i>	<i>Mode opératoire</i>
<i>Alcaloïdes</i>	<ul style="list-style-type: none"> Tests réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner. Prendre 1 ml de l'extrait à analyser dans deux tubes à essai et ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes de réactif de Wagner dans le second tube, l'apparition d'un précipité blanc, brun, respectivement, relève la présence d'alcaloïdes.
<i>Flavonoïdes</i>	<ul style="list-style-type: none"> Quelques gouttes de solution d'aluminium (AlCl₃) à 1% ont été ajoutées à une portion du filtrat. Une coloration jaune indique la présence de flavonoïdes.
<i>Tanins</i>	<ul style="list-style-type: none"> Pour détecter la présence des tanins, on ajoute à 5 ml de l'extrait 1 ml de FeCl₃ à 1%. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques.
<i>Saponines</i>	<ul style="list-style-type: none"> Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire respectivement 1, 2, 3...10ml de la solution à analyser. Ajuster le volume de chaque tube à 10ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer 15 min et mesurer la hauteur de la mousse produite dans chaque tube. <p>L'indice de mousse (I) est calculée par la formule suivante :</p> $I = 1000 / N$ <p>N est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm.</p>
<i>Stérols et triterpènes</i>	<ul style="list-style-type: none"> Les stérols et les terpènes ont été recherchés par la réaction de Liebermann Buchard Introduit 10ml de la solution à analyser dans un bécher, ajouter 5ml d'anhydride acétique puis 5ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1ml de H₂SO₄ concentré sur la paroi du bécher sans agiter. Laisser reposer 30 min. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence de stérols et triterpènes.
<i>Dérivés anthracéniques libres</i>	<ul style="list-style-type: none"> Les Anthracéniques libres ont été détectées par l'ajout dans un tube à essai d'un 1ml d'extrait chloroformique et 1 ml de NH₄OH dilué. Après agitation, une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.
<i>Composés réducteurs</i>	<ul style="list-style-type: none"> Leur détection consiste à introduire 2ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai, puis 2ml de la liqueur de Fehling sont ajoutés. Ensuite, l'ensemble est porté au bain-marie bouillant durant 8 min. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

<i>Glycosides cardiaques</i>	▪ Deux ml de chloroforme est ajouté à 1 ml de l'extrait, l'apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de H ₂ SO ₄ indique la présence des glycosides cardiaques.
<i>Quinones libres</i>	▪ Un gramme de matériel végétal sec broyé est placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés et concentrés au rotavapor. La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.
<i>Coumarines</i>	▪ Dans une capsule, 5 ml d'extrait éthérique est évaporé, puis 2 ml d'eau chaude est ajouté au résidu. La solution est partagée entre 2 tubes à essais. Au contenu de l'un des tubes, 0,5 ml est ajouté de NH ₄ OH à 25%. La fluorescence est observée sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

Annexe 02

Tableau III.5 : Matrice d'expériences et plan d'expérimentation.

N° _{Exp}	Répétitions	Variables codées			Variables réelles		
		X1	X2	X3	X1	X2	X3
1	1	1	1	-1	90	70	1/10
2	2	1	1	-1	90	70	1/10
3	1	-1	1	1	45	70	1/8
4	2	-1	1	1	45	70	1/8
5	1	1	-1	1	90	60	1/8
6	2	1	-1	1	90	60	1/8
7	1	-1	-1	-1	45	60	1/10
8	2	-1	-1	-1	45	60	1/10

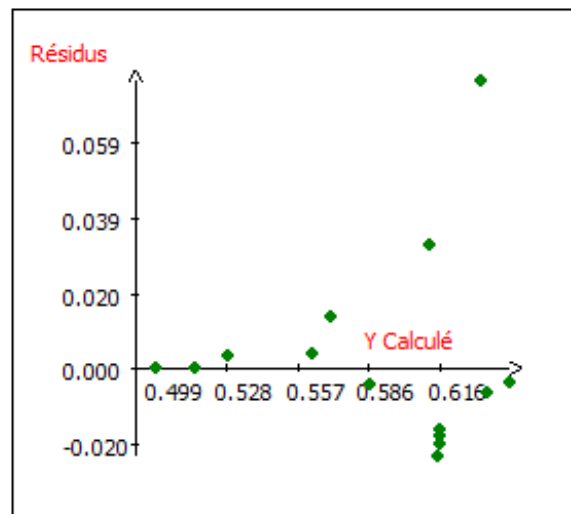
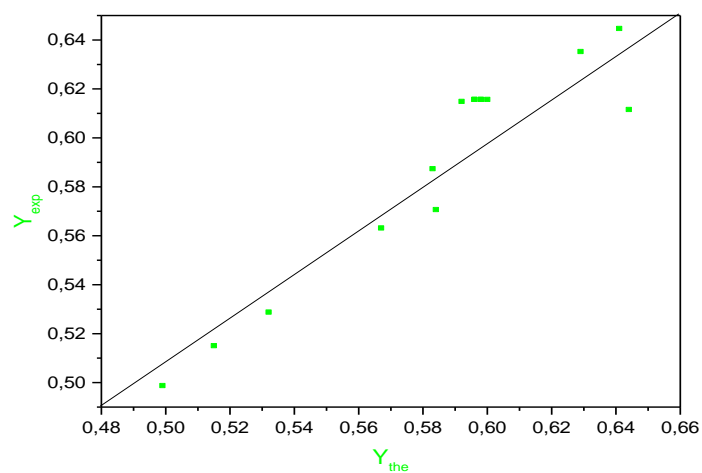
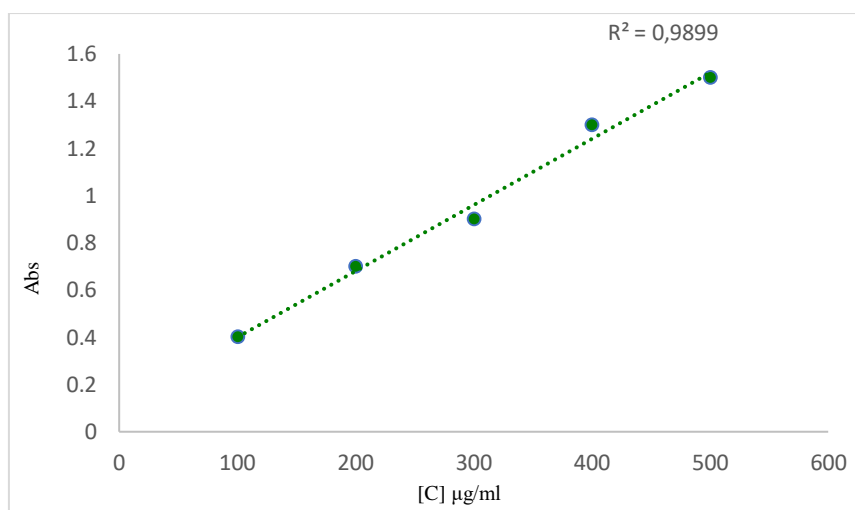
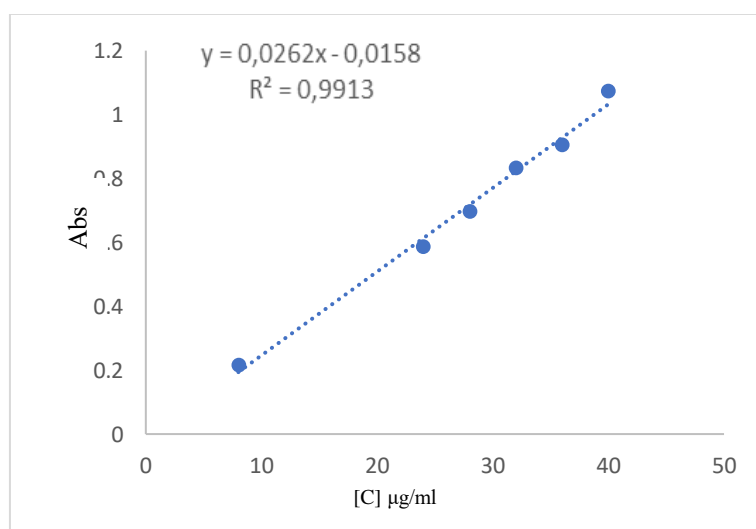


Figure III.4 : Tracé des résidus.

Figure III.5 : Tracé de Y_{calc} en fonction de Y_{exp} .

Annexe 03

**Figure III.8** : courbe étalonnage de l'acide gallique**Figure III.10** : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

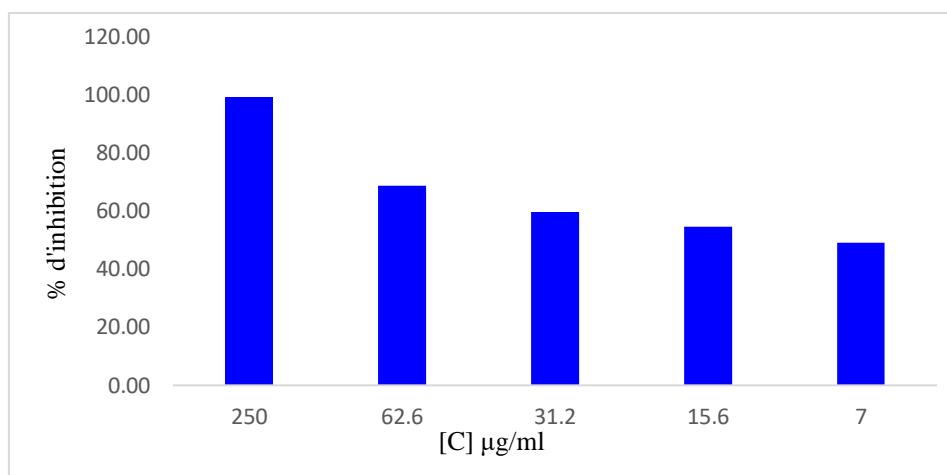


Figure III.13 : Inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

Les données de la figure III.10 montre que le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique avoisine les 96%, un maximum de réduction pour une concentration de 500 µg/ml. On constate que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration.