

Type of the Paper: Original paper.

Caractérisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae)

Meriem TOUAIBIA ¹, Fatma Zohra CHAOUCH ², Cherifa CHAOUIA ², Hamida CHERIF ¹

¹ Département des sciences Biologiques, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie.

² Département des sciences Agronomiques, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie
e-mail: biomeriem@hotmail.com

Received: 11/04/2014

/Accepted: 11/05/2014

Résumé: Cette étude est basée sur la valorisation d'une plante endémique du Sahara Algérien: l'espèce *Myrtus nivellei* Batt & Trab. L'extraction de sa fraction aromatique volatile et de ses composés polaires offre de nouvelles perspectives sur ses éventuelles propriétés pharmacologiques. L'huile essentielle, extraite par entraînement à la vapeur, a donné un rendement de 2,91%. L'analyse de sa composition chimique par CG/SM a révélé la présence d'une forte proportion en sesquiterpènes hydrocarbonés (δ -elemene 15,69% et Azulène 6,18%), en monoterpènes oxygénés (1,8 cinéole 12,06%) et en alcools monoterpéniques (α -terpinéol 13,01%). L'analyse de l'extrait éthanolique a révélé sa richesse en polyphénols totaux (734 $\mu\text{g eq/mg ES}$), en flavonoïdes (181,1 $\mu\text{g eq/mg ES}$), en flavonols (711,75 $\mu\text{g eq/mg ES}$), en anthocyanes (25,5 $\mu\text{g eq/mg ES}$) et en sucres totaux (17,26 $\mu\text{g eq/mg ES}$), alors que l'extrait méthanolique a présenté des teneurs moindres mais s'est montré remarquablement riche en tanins (155,27 $\mu\text{g eq/mg ES}$).

Mots clés: *Myrtus nivellei* Batt & Trab.; huile essentielle; extraits; polyphénols.

I. Introduction

Myrtus nivellei Batt & Trab. est une espèce arbustive saharo-endémique, de 0,5 à 2 mètres de hauteur, qui s'adapte très bien à la sécheresse [1]. Elle restreinte aux montagnes du Tassili n'Ajjer, Tassili n'Immidir, Tefedest et des massifs de l'Ahaggar algérien ainsi que les montagnes du Tibesti tchadien, où elle couvre des zones très réduites [2]. Elle apparait au delà de 1400 à 2000 mètres d'altitude [3].

Ce travail apporte une première contribution à l'investigation de cette plante en Algérie. Ainsi, deux ordres de préoccupation se rencontrent dans cette étude et lui donnent sa substance. Le premier vise l'extraction de l'huile essentielle et la révélation de sa composition chimique. L'autre objectif assigné à ce travail est l'investigation approfondie de sa fraction polaire via la détermination de sa richesse en composés phénoliques. Cette étude s'intègre également dans le contexte plus global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques algériennes, ainsi que dans le cadre de la préservation des espèces endémiques en voie de disparition du Sahara central.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal:

Les rameaux feuillés de la plante ont été récoltés sur des pieds adultes, à 146 km du chef lieu de la wilaya de Djanet, cette station est située à 94,8 km au sud de *Ihrir*, faisant partie du parc national du Tassili (tableau1).

Une partie des rameaux fraîchement récoltés a servi pour l'extraction de l'huile essentielle, le reste a été séché à température ambiante pendant 2 semaines, à l'abri du soleil, puis réduit en poudre fine qui est soigneusement conservée. Des échantillons frais ont fait l'objet d'une étude histologique.

Tableau 1. Coordonnées géographiques du site de récolte.

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Tassili n'Ajjer	2018 m	24°59' Nord	8°07' Ouest	Aride à hiver frais (Sahara central)

II.2. Coupes histologiques

La plante a été soumise à un examen macroscopique complété par un examen microscopique en réalisant des coupes histologiques au niveau des tiges [4], dans le but de localiser les sites sécréteurs des essences végétales.

II.3. Caractérisation physico-chimique

La plante est soumise à de nombreux tests afin d'évaluer le pH [5], la teneur en eau [6], la teneur des substances extractibles [7,8] ainsi que le taux des cendres [9].

II.4. Extraction de l'huile essentielle

Les rameaux feuillés récoltés sont soumis à une extraction par entraînement à la vapeur, l'essence est recueillie par simple décantation du distillat. L'extraction a duré environs trois heures. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement.

II.5. Conditions de l'analyse CG/SM

L'analyse chromatographique de l'HE a été effectuée avec un chromatographe en phase gazeuse (*Hewlett-Packard 6890*) couplé à un spectromètre de masse (*HP 5973*). La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70eV, en utilisant une colonne capillaire *HP-5MS* (30mx0,25 mm x 0,25µm). La température de la colonne est programmée de 60 à 250°C à raison de 2°C.min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml.min⁻¹. L'injection est établis en mode split (rapport de fuite:1/50).

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse *NIST 2002* et piloté par un logiciel « *HP ChemStation* » permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. L'identification des constituants a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée (*NIST 2002*).

II.6. Préparation des extraits alcooliques (Fraction polaire)

Des extraits alcooliques sont préparés par épuisements de la poudre végétale à l'aide d'un solvant chimique : à froid par macération dans l'éthanol [8] et à chaud par Soxhlet avec le méthanol [10], afin

de libérer les composés non volatils présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion.

II.7. Quantification des composés phénoliques et des sucres totaux

Le taux des polyphénols totaux a été obtenu par dosage spectrophotométrique selon la méthode Folin Ciocalteu [11]. La mesure des flavonoïdes totaux est inspirée de la méthode décrite par Park et al. [12]. La teneur en flavonols est déterminée par la méthode de Yermakov et al. [13]. Les tanins sont dosés selon la méthode colorimétrique Folin Denis, décrite par Joslyn [14]. Les anthocyanes sont déterminés par le protocole de décoloration proposé par Jur [15], alors que les sucres solubles sont dosés par la méthode Phénol-Acide sulfurique [16].

III. Resultants et Discussion

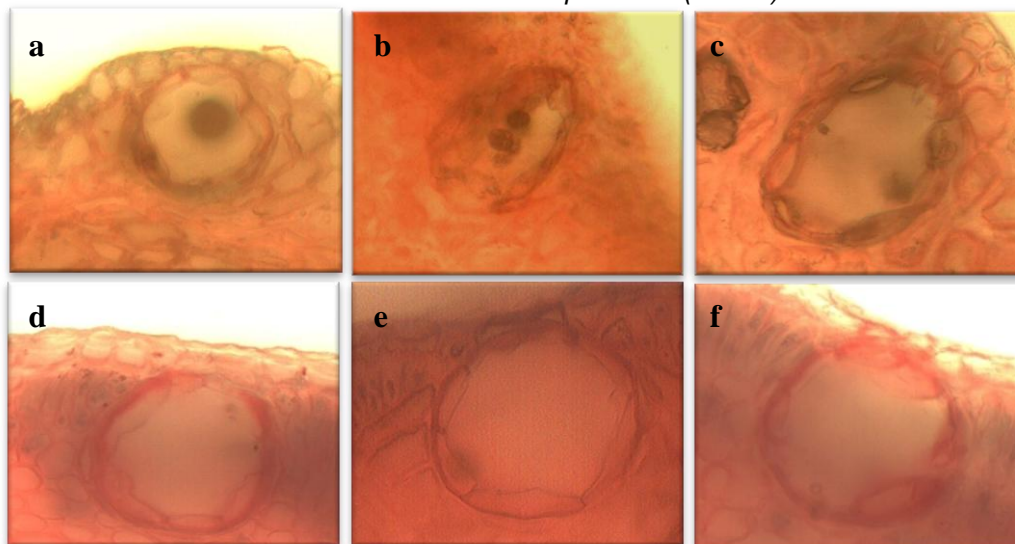
III.1. Nature et localisation des structures sécrétrices

L'observation macroscopique, sous loupe binoculaire, a révélé la présence de poils protecteurs peu nombreux dans la partie caulinnaire (tige et rameaux jeunes) de la plante, ayant tendance à disparaître complètement lorsque les tiges commencent à se lignifier.

Les coupes histologiques ont permis de révéler la présence de plusieurs poches sécrétrices qui sont le siège de synthèse de l'huile essentielle, caractéristique commune pour toutes les espèces appartenant à la famille des *Myrtaceae*. Ces structures sécrétrices sont inégalement distribuées sur tous les organes aériens et sont localisées à proximité de l'épiderme (figure 1). Il s'agit de poches sécrétrices sous forme de cavités sub-épidermiques sphériques ou oblongues, délimitées par deux rangées de cellules, la rangée la plus interne est formée par des cellules aplaties à paroi très fine, ces cellules sécrétrices dégénèrent à maturité, la deuxième rangée est formée par des cellules parenchymateuses à parois épaisses.

D'après Cicarelli et al [17], ces structures sécrétrices sont enfoncées dans le parenchyme cortical et étroitement accolées à l'épiderme par deux petites cellules appelées "cap cells". L'ontogénie de ces cavités montre qu'elles semblent suivre un développement schyzolysogène, issu d'une lyse et d'un écartement des cellules parenchymateuses

Figure 1. (a) Observations microscopiques des différentes phases de développement des poches sécrétrices à localisation foliaire: (a) Début de formation de la poche sécrétrice par écartement des cellules parenchymateuses; (b) (c) Elargissement de la lumière de la poche sécrétrice délimitée par une assise de cellules sécrétrices; (d) Mise en place de la deuxième assise de cellules parenchymateuses délimitant les cellules sécrétrices, (e) (f) Formation de deux cellules chapeau ou cap cells correspondant au point de fusion de la cavité sécrétrice et de l'épiderme. (Gx400)



III.2. Résultats de la caractérisation physico-chimique

Les propriétés physico-chimiques des rameaux feuillés de *Myrtus nivellei* Batt & Trab. sont résumés dans le tableau 2. Le fruit est une baie bleue violacée, portée par un long pédoncule légèrement poilu, elle comporte approximativement de 8 graines/baie, ces graines mesurent en moyenne 3 x 2 mm.

Tableau 2. Propriétés physico-chimiques des rameaux feuillés.

Propriétés	Valeurs obtenues
pH	5,66
Teneur en eau (%) [*]	36,91±0,21
Teneur des substances extractibles par l'eau(%) [*]	3,41±0,36
Teneur des substances extractibles par l'éthanol(%) [*]	11,12±0,43
Taux de cendres (%) [*]	6,11 ±0,08
Nombre des graines ^{**}	8,34 ±1,2
Taille des graines(mm) ^{**}	3 x 2
Dimensions des baies(mm) ^{**}	4-6 x 5-8

^{*} Ces résultats sont obtenus avec une fréquence de 3 répétitions par test)

^{**} Ces résultats sont obtenus avec un effectif de 1000 baie

III.3. Etude analytique de l'huile essentielle

Les propriétés organoleptiques et physicochimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. A l'issue de l'extraction pratiqué, l'essence obtenue est de couleur jaune claire, avec une odeur prononcée rappelant celle des feuilles. Ses propriétés physico-chimiques sont consignées dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractères physico-chimiques de l'huile essentielle.

Caractères physico-chimiques	Valeurs obtenues
Rendement (%)	0,2911±0,5503
Densité relative	0,8501±0,1471

L'huile essentielle de *M nivellei* Batt & Trab. présente un rendement égale à 2,91%. Il semblerait que le biotope aride de cette plante influe sur sa richesse en essences. Ce rendement se montre meilleur que celui rapporté par Bouzabata et al [1] estimé entre 1,4% et 2,0%. Dans ce même contexte, Belaiche [18] rapporte que les huiles essentielles conservent l'humidité des plantes poussant dans les climats arides, comme c'est le cas pour notre espèce saharo-endémique. Les mesures de la densité de cette huile essentielle effectuée à 20°C, montrent qu'elle avoisine 0,85. Cette valeur s'intègre parfaitement dans l'intervalle décrit par la pharmacopée européenne qui s'étale de 0,80 à 0,95.

III.3.1. Composition chimique de l'huile essentielle

Les résultats de l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) de la composition chimique de l'huile essentielle sont présentés dans le tableau 4. Au total, 48 composés ont été identifiés ce qui correspond a un pourcentage de reconnaissance de l'ordre de 90,5% par rapport à l'ensemble des constituants isolés.

Le profil chromatographique est caractérisé par 6 pics majoritaires, avec une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés, dont on cite: le δ -elemene (15,69%), l' α -terpineol (13,01%), le 1,8 cinéole (12,06%) et le citral (11,66%). On note la présence d'un sesquiterpène hydrocarboné très

intéressant: il s'agit de l'azulène avec une teneur de 6,18%. Un autre composé majoritaire appartient à la famille des alcools, il s'agit du 1,2-benzendiol avec un taux de 5,36%. L' α -patcouène présente un taux égale à 2,87%. Les autres composés non identifiés représentent un taux inférieur à 10%. D'après ces résultats, on peut déduire que cette huile essentielle appartient au chémotype δ -elemene/ α -Terpineol avec une présence non négligeable du cinéol et du citral.

Cette huile essentielle se montre très riche en monoterpènes et en sesquiterpènes, qui représentent les deux principaux groupes de terpènes. En revanche certains aldéhydes et alcools identifiés occupent une position secondaire. Les esters et les cétones sont minoritaires, dont certains sont sous forme de traces. L'effet combiné de ces composés est responsable de l'odeur caractéristique de l'huile essentielle de chaque plante. L' α -terpinéol est responsable de l'odeur florale sucrée exhalée par le végétal [19]. Néanmoins l'azulène, présent dans cette huile essentielle à un taux non négligeable de l'ordre de 6,18%, est un composé très utilisé en cosmétologie et en pharmacologie en raison de ses propriétés anti-inflammatoires.

Tableau 4. Composés majoritaires de l'huile essentielle étudiée.

N°	Composé identifié	Pourcentage (%)
1	1,8 cinéol	12,06
2	1,6 octadien-3-ol,3,7-diméthyl	2,42
3	α-Terpinéol	13,01
4	δ-elemene	15,69
5	Citral	11,66
6	1,2-benzenediol,3,5-bis	5,36
7	Azulène	6,18
8	α -patcouène	2,87
Chémotype étudié		δ-elemene/ α-Terpinéol
Classes biochimiques des composés identifiés dans l'huile essentielle		
	Monoterpenes	28.453
	Esters therpeniques	01.921
	Sesquiterpenes	42.658
	Cetones	00.777
	Oxydes terpeniques	02.459
	Alcools terpeniques	03.048
	Aldehydes terpeniques	11.184
	TOTAL	90.500

3.4. Résultats de l'étude analytique de la fraction polaire et des dosages spectrophotométriques

Les extraits méthanoliques (MeOH) sont quantitativement les plus importants avec un rendement estimé à 59,15%. Il paraît ainsi que le choix du solvant et de la technique d'extraction influent considérablement sur le rendement en extrait sec (tableau 5).

Tableau 5. Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.

	Nature de l'extrait	Rendement de l'extrait (%)	Aspect de l'extrait	Couleur de l'extrait
<i>M nivellei</i>	Extrait MeOH	59,15	Collant pâteux	Marron foncé
	Extrait EtOH	12,45	Friable	Vert claire

Les résultats du dosage des composés phénoliques et des sucres dans les extraits par spectrophotométrie UV-visible est rapportée dans le tableau 6.

Tableau 6. Dosage des composés phénoliques dans les extraits de *M nivellei* Batt & Trab.

Paramètre	Etalon sélectionné	Longueur d'onde (nm)	Taux (µg eq/mg ES)	
			Extrait MeOH*	Extrait EtOH**
Polyphenols	Acide gallique	760	348	734
Flavonoïdes	Quercetine	415	152,25	181,1
Flavonols	Rutine	440	438,5	711,75
Tanins	Acide tannique	760	155,27	139,24
Anthocyanes	Cyanidine	520	17,2	25,5
Sucres totaux	Glucose	488	2,28	17,26

* extrait méthanolique

** extrait ethanologique

On constate que les extraits obtenus par macération sont plus riches en polyphenols que ceux obtenus par extraction à chaud avec du méthanol, soit 734 µg eq ac gal/mg ES pour l'extrait EtOH et 348 µg eq ac gal/mg ES pour l'extrait MeOH. Selon Gardeli et al. [20], la teneur des extraits MeOH en polyphenols chez l'espèce *Myrtus communis* L. varie entre 352 et 373 µg eq ac gal/mg ES et atteint un maximum durant la période de pleine floraison.

L'analyse quantitative des flavonoïdes chez *M nivellei* Batt et Trab., montre un taux de 181,1 µg eq quer/mg ES dans l'extrait EtOH, alors l'extrait MeOH présente un taux moindre de l'ordre de 152,25 µg eq quer/mg ES.

Ainsi, on déduit que le taux des flavonoïdes dans les extraits EtOH demeure plus important, que celui des extraits MeOH. Il paraît clairement que l'extrait EtOH fournit le taux le plus élevé en flavonols, qui dépassent 700 µg eq rut/mg ES. La concentration en flavonols dans l'extrait MeOH est moins importante avec 438,5 µg eq/mg ES. Cependant, les extraits MeOH et EtOH de cette espèce saharo-endémique présentent des taux en sucres estimés respectivement à 2,28 et 17,26 µg eq glu/mg ES.

Après extrapolation des résultats de l'absorbance mesurée au spectrophotomètre, sur la courbe d'étalonnage de l'acide tannique, nous avons constaté une forte présence de tanins dans l'extrait MeOH avec une concentration de 135,02 µg eq ac tan/mg ES. Les extraits EtOH renferment des concentrations moins importantes que la précédente, ne dépassant pas le seuil de 110 µg eq ac tan/mg ES. Ceci est probablement dû à la difficulté de l'extraction des tanins par simple macération.

La teneur en anthocyanes dans l'extrait EtOH est estimée à 25,5 µg. L'extrait MeOH a fourni de faibles teneurs, avec un taux de 17,2 µg eq cyan/mg ES. Il est important de signaler que les anthocyanes, sur le plan théorique augmentent avec la maturation des fruits, atteignant un maximum puis diminuent. Par ailleurs, d'après Bakker et al. [21], les différentes réactions qui provoquent la diminution des anthocyanes sont :

- Les réactions de condensation des anthocyanes avec d'autres molécules inférieures (Acide puracique, Acide glycoxylique).
- La combinaison des anthocyanes avec les tanins pour donner des polymères, qui possèdent des propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes.

IV. Conclusion

Dans cette étude, certaines caractéristiques des extraits et de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* Batt & Trab. ont été recherchées et valorisées pour la première fois. L'utilisation de la technique de CG/SM nous a permis de lui attribuer le chémotype δ-elemene/α-terpinéol à l'huile essentielle de la plante étudiée.

Toutefois, vu la richesse de cette huile essentielle en composés très appréciés en cosmétologie, comme l'azulène ainsi que ces propriétés organoleptiques, cette première contribution ouvre de larges perspectives de recherche pour les années à venir.

Grâce aux dosages spectrophotométriques, nous avons constaté que les extraits éthanoliques sont plus riches en polyphénols que les extraits méthanoliques, ceci nous laisse supposer que l'extraction douce par macération permet de préserver les métabolites ainsi que leur structure, contrairement à l'extraction par Soxhlet où la chaleur est susceptible de dégrader certains composés chimiques thermosensibles, bien que son rendement soit meilleur.

Il est impératif à présent de trouver des alternatives nouvelles basées sur une meilleure utilisation de la biodiversité végétale et capables de promouvoir de nouveaux substrats naturels via les pratiques de biotechnologies.

V. Références

- [1] Bouzabata A, Bazzali O, Cabral C, Gonçalves M.J, Cruz M.T, Bighelli A, Cavaleiro C, Casanova J, Salgueiro L and Tomi F. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab., an endemic species of Central Sahara. *Journal of Ethnopharmacology*. 149 (2013) 613–620
- [2] Ozenda, P. Flore du Sahara. Edition CNRS. Paris. (1977). 623p.
- [3] Maka, M. Fleurs du Sahara, arbres et arbustes au cœur de leurs usages avec les touareg du Tassili. *Phytotherapia*. 12 (2004) 191-197.
- [4] Prat.R. Expérimentation en biologie et physiologie végétale: 300 manipulations. Edition QUAE. Paris. (2007). 56.
- [5] Dowson A et Aten M. Composition et maturation, récolte et conditionnement des dattes. Collection F.A.O. Rome. (1963). 167.
- [6] Zerrad W, Hillali S, Mataoui B.S et Hmeyan A. Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. *Bull. Laboratoire de biochimie d'environnement*. 7 (2006) 10-14.
- [7] Togola A. Etude de la phytochimie et de l'activité antipaludique de *Alchornea cordifolia* Schmach. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. (2002) 100.
- [8] Diarra M.N. Etude phytochimique d'une plante antipaludique: *Spilanthes oleracea*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. (2003) 78.
- [9] Pharmacopée européenne. 4^{ème} édition. Conseil de l'Europe. Strasbourg. (2002). 2060.
- [10] William B.J. The original of the soxhlet extractor . *J. chemical education*. 84 (2007) 1913-1915.
- [11] Slinkard K et Singleton V.L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American journal of viticulture*. 28 (1977) 49-55.
- [12] Park Y.K, Koo M.H, Ikegaki M et Contado J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Brazilian archives of biology and technology*. 40 (1997) 97-106.
- [13] Yermakov A.I, Arasimov V.V. et Yarosh N.P. Methods of biochemical analysis of plants. Agropromizdat. Leningrad. (1987). In: Miliauskasa G, Venskutonis P.R et Van Beek T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *J. Food chemistry*. 85 (2004) 231-237.
- [14] Joslyn M.A. A serie of monography. *Food. Sci. techn.* (1970). In: Bessas A, Benmoussa L et Kerarma M. Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas. (2008). 137.
- [15] Jur A. Dosage des polyphénols. (1967). In: Bessas A, Benmoussa L et Kerarma M. Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas. (2008). 137.
- [16] Duboi M, Gilles K.A, Hamilton J.K, Rebers P.A et Smith S. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.chem.* 28 (1956) 350-356.
- [17] Ciccarelli D, Garbari F, Pagni A.M. The flower of *M. communis*: Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora*. 203 (2008) 85-93.
- [18] Belaïche P. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome I. Edition Maloine. Paris. (1979). 204.
- [19] Lawrence B.M. Progress in essential oils: Myrtle oil. *Perfumer & flavorist*. 18 (1993) 52-55.
- [20] Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T et Komaltis M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis*: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *J. Food chemistry*. 107 (2008) 1120-1130.

- [21] Bakker J , Bridle P, Honda T, Kuwano H, Saito N, Terahara N et Timberlake C.F. Identification of anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry*, 4 (1997) 145-148.

Please cite this Article as:

Meriem TOUAIBIA, Fatma Zohra CHAOUCH, Cherifa CHAOUIA, Hamida CHERIF, Caracterisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae), ***Algerian J. Nat. Products***, 2 (2014) 27-34.

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

© 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved.