

COMPOSITION DE L'HUILE ESSENTIELLE ET DES EXTRAITS ALCOOLIQUES DE L'ESPECE SAHARO-ENDEMIQUE *Myrtus nivellei* Batt et Trab (MYRTACEAE)

TOUAIBIA M.¹ et CHAOUCH F.Z.²

1. Département des sciences biologiques. Université SAAD DAHLEB, Algérie.
2. Département des sciences agronomiques. Université SAAD DAHLEB, Algérie.

Résumé: Notre étude est fondée sur la valorisation d'une plante endémique du Sahara Algérien: *Myrtus nivellei* Batt et Trab de la famille des *Myrtaceae*. L'extraction de sa fraction aromatique volatile et de ses composés polaires offre de nouvelles perspectives sur ses éventuelles propriétés pharmacologiques. Des coupes histologiques ont révélé la présence de poches sécrétrices sub-épidermiques. L'huile essentielle, extraite par entraînement à la vapeur, a donné un rendement de 0,291%. L'analyse de la composition chimique de cette dernière par CG/SM a révélé la présence de 48 composés, caractérisée par la présence d'une forte proportion en sesquiterpènes hydrocarbonés (δ -elemene: 15,69% Azulène 6,18% et α patcouène: 2,87), en alcools (1,2-benzenediol: 5,36% et octadiénol: 2,42%), en monoterpènes oxygénés (1,8 cinéole: 12,06%) et en alcools monoterpéniques (α -terpinéol: 13,01%). L'analyse de l'extrait ethanolic 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 $\mu\text{g eq/mg ES}$). Le taux des flavonols dans l'extrait flavonoïdique est estimé à 706,25 $\mu\text{g eq/mg ES}$.

Mots clés: *Myrtus nivellei*, coupes histologiques, huile essentielle, extraits alcooliques, CG/SM.

THE COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL AND ALCOHOLIC EXTRACTS OF THE SAHARO-ENDEMIC SPECIES *Myrtus nivellei* Batt AND Trab (MYRTACEAE)

Abstract: Our study aimed the valorization of endemic plant of the Algerian Sahara: *Myrtus nivellei* Batt and Trab of Myrtaceae family. The extraction of the volatile fraction and polar compounds offered new perspective on its possible pharmacological properties. Histological sections revealed the presence of subepidermal secretory glands. The essential oil was extracted by steam distillation, gave a 0,291% of yield. The analysis of the chemical composition by GC/MS revealed the presence of 48 compounds, characterized by the presence of a high proportion of sesquiterpen hydrocarbons (δ -elemene: 15,69% azulene: 6,18% and α -patcouène: 2,87%), alcohols (1,2-benzenediol: 5,36% and octadienol: 2,42%), in oxygenated monoterpenes (1.8 cineole: 12,06%) and monoterpene alcohols (α -terpineol: 13,01%). The analysis of the ethanolic extract showed its high amount of total polyphenols (734 mg eq/mg ES), flavonoids (181,1 mg eq/mg ES), flavonols (711,75 mg eq/mg ES) anthocyanins (25,5 mg eq/mg ES) and total sugars (17,26 mg eq/mg ES), while the methanolic extract presented lower levels but it is remarkably rich in tannins (155,27 mg eq/mg ES). The rate of flavonols in the flavonoidic extract is estimated as 706,25 mg eq/mg ES.

Keywords: *Myrtus nivellei*, histological sections, essential oil, alcoholic extracts, GC/MS.

Introduction

Myrtus nivellei Batt et Trab. est un arbuste de 0,5 à 2 mètres de hauteur, il s'adapte très bien à la sécheresse. Cette plante est une espèce saharo-endémique, 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 [1]. Elle

apparaît au delà de 1400 à 2000 mètres d'altitude [2].

Ce travail apporte une contribution à l'investigation de cette plante. 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.

1. Matériels et méthodes

Tableau 1: Coordonnées géographiques du site de récolte.

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

Une partie des rameaux fraîchement récoltés a servi pour l'extraction de l'huile essentielle, le reste a été séché à l'air libre pendant deux semaines, à l'abri du soleil, puis broyé en poudre fine qui est soigneusement conservée pour l'extraction de la fraction polaire.

1.2. Coupes histologiques

La plante est soumise à un examen microscopique en réalisant des coupes histologiques au niveau des feuilles, qui sont traitées par la technique de double coloration [3].

1.3. Caractérisation physico-chimique

La plante est soumise à de nombreux tests afin d'évaluer le pH [4], la teneur en eau [5], la teneur des substances extractibles [6, 7] et le taux des cendres totales [8].

1.4. Extraction de l'huile essentielle

Les rameaux feuillés récoltés sont soumis à une extraction par entraînement à la vapeur (montage de type *Clevenger*), l'essence est recueillie par simple décantation du distillat. L'extraction dure environ trois heures.

1.5. Conditions de l'analyse de l'huile essentielle

L'analyse chromatographique de l'HE a été effectuée avec un chromatographe en phase gazeuse type

1.1. Matériel végétal

Les rameaux feuillés de *M nivellei* 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, durant le mois de Mai, correspondant à la période de pleine floraison (tableau1).

Hewlett-Packard (6890) couplé à un spectromètre de masse (HP 5973).

La fragmentation est effectuée à 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm). La température de la colonne est de 60 à 250°C (2°C/min). Le gaz vecteur est l'hélium (1,5 ml/min).

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse *NIST 2002* et piloté par un logiciel "*HP ChemStation*" pour suivre l'évolution de l'analyse. 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.

1.6. Préparation des extraits alcooliques

Elle est réalisée par épuisements de la poudre végétale à l'aide d'un solvant, à froid par macération dans l'éthanol [7] et à chaud par Soxhlet avec le méthanol [9], afin de libérer les composés non volatils présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion.

1.7. Extraction des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont extraits selon le protocole décrit par Guignard [10]. L'extrait butanolique obtenu est évaporé

sous vide afin d'obtenir un résidu sec des flavonoïdes.

1.8. Quantification des composés phénoliques et des sucres totaux

Les extraits obtenus ont été soumis à une série de dosages spectrophotométriques, afin de quantifier leur teneur en polyphénols totaux [11], en flavonoïdes totaux [12], en flavonols [13], en tanins [14], en anthocyanes [15] et en sucre totaux [16].

2. Résultats et discussion

2.1. Nature et localisation des sites sécréteurs

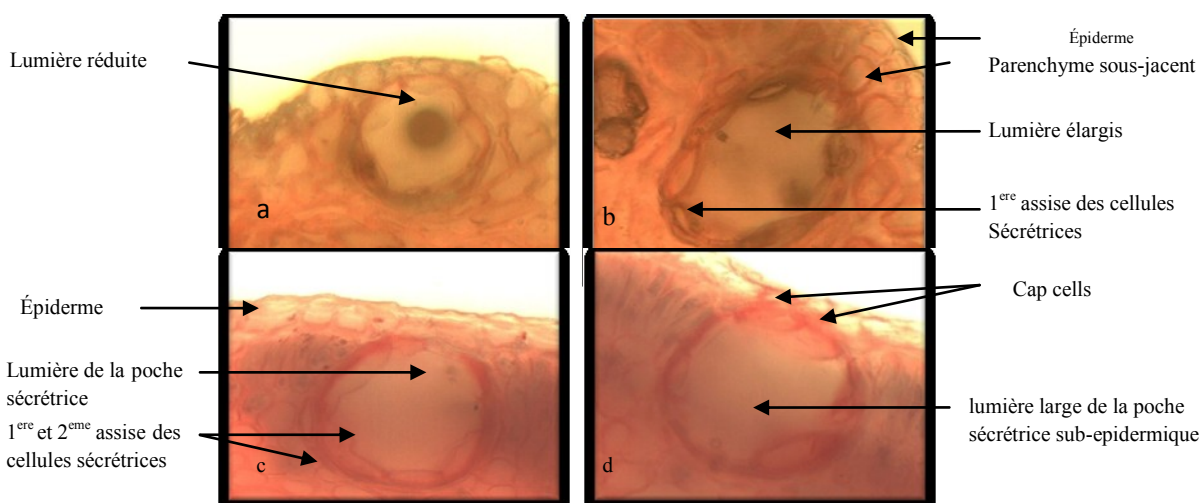


Figure 1: Observations microscopiques des différentes phases de développement des poches sécrétrices à localisation foliaire: (a) Début de formation de la poche sécrétrice par écartement des cellules parenchymateuses; (b) Elargissement de la lumière de la poche sécrétrice délimitée par une assise de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

Ces structures sécrétrices sont enfoncées dans le parenchyme cortical et étroitement accolées à l'épiderme par deux petites cellules appelées "cellules chapeau" ou "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.

Les coupes histologiques ont permis de révéler la présence de plusieurs poches sécrétrices qui sont le siège de synthèse de l'huile essentielle.

Ces poches sécrétrices sont inégalement distribuées sur les deux faces de la feuille. Elles se présentent forme de cavités subépidermiques délimitées par deux rangées de cellules (figure 1), 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].

2.2. Résultats de la caractérisation physico-chimique

Les propriétés physico-chimiques des rameaux feuillés de *M nivellei*, utilisés lors cette étude, sont rapportées dans le tableau2.

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'ethanol(%)*	11,12±0,43
Taux de cendres (%)*	6,11 ±0,08

* Valeur calculée à partir de la matière végétale séchée

2.3. Etude analytique de l'huile essentielle

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques 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 verdâtre, avec une odeur prononcée rappelant celle des feuilles.

L'huile essentielle de *M nivellei* présente un rendement égale à 0,291%. Il semblerait que le biotope aride de cette plante influe sur sa richesse en essences. Bouzabata et al. [18] a rapporté que le rendement de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* récoltée dans la région du tassili

n'Ajjer (1,4-2%, w/w) s'est avéré deux fois plus important que celui des la plante récoltée dans les montagnes du Hoggar (0,5-1,9%, w/w).

Dans ce même contexte, Belaiche [19] 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 (tableau3).

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

Les résultats de l'analyse par *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 à un pourcentage de reconnaissance de l'ordre de 90,5% par rapport à l'ensemble des constituants isolés, 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 aussi la présence de l'azulène à un taux de 6,18%, du 1,2-benzendiol (5,36%) et de

l' α -patcoulène (2,87%). D'après ces résultats, on peut déduire que cette huile essentielle appartient au chémotype δ -elemene/ α -Terpinéol 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. Cependant, nous remarquons la

présence de certains composés (cinéol, alpha terpinéol, octadiénol et alpha patcoulène) mais avec des proportions variables. L'effet combiné de ces composés est responsable de

l'odeur caractéristique de l'huile essentielle de chaque plante.

Tableau 4: Composés majoritaires de l'huile essentielle étudiée par CG/SM.

N°	Composé identifié	Pourcentage (%)
1	1,8 cinéol	12,06
2	1,6 octadien-3-ol,3,7-dimethyl	2,42
3	Alpha 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	Alpha patcoulène	2,87
Classes biochimiques des composés identifiés dans l'huile essentielle		
	Monoterpènes	28,453
	Esters terpéniques	01,921
	Sesquiterpènes	42,658
	Cétones	00,777
	Oxydes terpéniques	02,459
	Alcools terpéniques	03,048
	Aldéhydes terpéniques	11,184
	TOTAL	90,500
	Chémotype étudié	<i>δ elemene/ Alpha Terpinéol</i>

L'alpha terpinéol est responsable de l'odeur florale sucrée exhalée par le végétal [20]. 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.

L'extrait méthanolique (MeOH) sont quantitativement plus important avec un rendement estimé à 59,15%, par rapport à l'extrait éthanolique (EtOH). il parait ainsi que le choix du solvant et de la technique d'extraction influent considérablement sur le rendement en extrait sec (tableau 5).

2.4. Résultats de l'étude analytique des extraits et des dosages spectrophotométriques

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

Nature de l'extrait	Rendement de l'extrait (%)	Aspect de l'extrait sec (ES)	Couleur de l'extrait ses (ES)
Extrait méthanolique MeOH	59,15	Collant pâteux	Marron foncé
Extrait éthanolique EtOH	12,45	Friable	Vert claire

D'après les résultats des dosages réalisés sur les extraits par spectrophotométrie UV-visible rapportés dans le tableau 6, on constate que l'extrait obtenu par macération est plus riche en polyphénols que celui obtenu par extraction à chaud avec du méthanol, soit 734 $\mu\text{g eq/mg ES}$ (microgramme équivalent par milligramme d'extrait sec) pour l'extrait EtOH et 348 $\mu\text{g eq/mg ES}$ pour l'extrait MeOH. Selon Gardeli et *al.* [21], la teneur de l'extrait MeOH en polyphénols chez *M communis* varie entre 352 et 373 $\mu\text{g eq gal/mg ES}$ et atteint un maximum durant la période de pleine floraison. Il paraît clairement que les extraits EtOH et

flavonoïdique fournissent respectivement les taux les plus élevés en flavonols, qui dépassent 700 $\mu\text{g eq/mg ES}$. La concentration en flavonols dans l'extrait MeOH est moins importante avec 438,5 $\mu\text{g eq/mg ES}$. Cependant, les extraits MeOH et EtOH de cette espèce saharo-endémique présentent des taux en sucres estimés respectivement à 2,28 et 17,26 $\mu\text{g eq /mg ES}$. L'analyse quantitative des flavonoïdes chez *M nivellei* montre un taux de 181,1 $\mu\text{g eq /mg ES}$ dans l'extrait EtOH, alors l'extrait MeOH présente un taux moindre de l'ordre de 152,25 $\mu\text{g eq /mg ES}$.

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

Paramètre	Etalon sélectionné	Longueur d'onde (nm)	Taux ($\mu\text{g eq/mg ES}$)		
			Extrait MeOH*	Extrait EtOH**	Extrait flav***
Polyphénols	Acide gallique	760	348	734	-
Flavonoïdes	Quercetine	415	152,25	181,1	-
Flavonols	Rutine	440	438,5	711,75	706,25
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 éthanolique, *** extrait flavonoïdique

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 $\mu\text{g eq/mg ES}$. Les extraits EtOH renferment des concentrations moins importantes que la précédente, ne dépassant pas le seuil de 110 $\mu\text{g eq/mg ES}$. Ceci est probablement dû à la difficulté de l'extraction des tanins par simple macération.

La teneur en anthocyanes dans l'extrait éthanolique est estimée à 25,5 μg . L'extrait méthanolique a fourni de faibles teneurs, avec un taux de 17,2 $\mu\text{g eq/mg ES}$.

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.* [22], les différentes réactions qui provoquent la diminution des anthocyanes sont :

Les réactions de condensation des anthocyanes avec d'autres molécules inférieures

La combinaison des anthocyanes avec les tanins pour donner des polymères, qui possèdent des propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes.

Conclusion

Dans cette étude, certaines caractéristiques des extraits et de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* ont été recherchées et valorisées. L'utilisation de la technique de *CG/SM* nous a permis d'attribuer le chémotype δ -elemene/ α -terpinéol à l'huile essentielle de la plante étudiée. Toutefois, l'huile essentielle possède des propriétés organoleptiques très appréciées en cosmétologie. En revanche, ses potentialités thérapeutiques étant encore limitées à la pratique de la médecine traditionnelle, ouvrent ainsi 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 suggérer l'extraction douce par macération, ce qui permet de préserver les métabolites dans une situation aussi proche de la normale, contrairement à l'extraction par Soxhlet où la chaleur est susceptible de dégrader certains composés chimiques thermosensibles, bien que son rendement est 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.

Références bibliographiques

- [1].- Ozenda P. 1977- *Flore du Sahara*. Edition CNRS. Paris. 623 p.
- [2].- Maka M. 2004 - Fleurs du Sahara, arbres et arbustes au cœur de leurs usages avec les touareg du Tassili. *Phytotherapia*. 2:191-197.
- [3].- Prat R. 2007 - *Expérimentation en biologie et physiologie végétale: 300 manipulations* Edition QUAE. Paris. 56p.
- [4].- Dowson A., Aten M. 1963 - *Composition et maturation, récolte et conditionnement des dattes*. Collection FAO. Rome. 167p.
- [5].- Zerrad W., Hillali S., Mataoui A., El antris BS., Hmeyan A. 2006 - Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. *Bull. Lab. de biochimie d'environnement*. Maroc. 7 :10-14.
- [6].- Togola A. 2002 - *Etude de la phytochimie et de l'activité antipaludique de *Alchornea cordifolia**. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 100 p.
- [7].- Diarra MN. 2003- *Etude phytochimique d'une plante anti-paludique: *Spilanthes oleracea**. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 78p.
- [8].- Conseil de l'Europe 2002 - *Pharmacopée européenne*. 4^{ème} édition.. Conseil de l'Europe. Strasbourg 2060 p.
- [9].- William BJ. 2007 - The original of the soxhlet extractor. *J.chemical education*. 84:1913-1915.
- [10].- Guignard JL. 2000 - *Biochimie végétale*. Edition Masson. Paris. 281p.
- [11].- Slinkard K., Singleton VL. 1977 - Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American journal of viticulture*. 28:49-55.
- [12].- Park YK. et al. 1997 - Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Brazilian archives of biology and technology*. 40:97-106.
- [13].- Yermakov AI., Arasimov VV., Yarosh NP. 1987- Methods of biochemical analysis of plants. *Agropromizdat. Leningrad*. In: Miliauskasa G., Venskutonis PR., Van Beek

- TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *J.Food chemistry*. 2004; **85**:231-237.
- [14].- Joslyn MA. 1970 - A serie of monography. *Food. Sci. Techn.* In: Bessas A., Benmoussa L., Kerarma M. *Dosage biochimique des polyphenols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien*. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas. 2008. 137p
- [15].- Jur P. 1967. In: Bessas A., Benmoussa L., Kerarma M. *Dosage biochimique des polyphenols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien*. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas. 2008. 137p.
- [16].- Duboi M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith S. 1956 - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal chemistry*. 28:350-356.
- [17].- Ciccarelli D., Garbari F., Pagni AM. 2008 - The flower of *M communis*: Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora*. 203:85-93.
- [18].- Bouzabata A., Bazzali O., Cabral C., Gonçalves M.J., Cruz M.T., Bighelli A., Cavaleiro C., Casanova J., Salgueiro L. et Tomi F. 2013 - New compounds, chemical composition antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt & Trab., an endemic species of Central Sahara. *J of Ethnopharmacology*. 149:613-620
- [19].- Belaïche P. 1979 - *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome I. Edition Maloine. Paris. 204 p.
- [20].- Lawrence BM. 1993 - Progress in essential oils: Myrtle oil. *Perfumer & flavorist*. 18:52-55.
- [21].- Gardeli C., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris A., Komaltis M. 2008- Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis*, evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *J. Food chemistry*. 107:1120-1130.
- [22].- Bakker J., Bridle P., Honda T., Kuwano H., Saito N., Terahara N., Timberlake CF. 1997 - Identification of anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry*.4:145-148