

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi-Tébessa-  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département : Sciences de la matière

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la matière

Filière: Chimie

Option : Chimie organique et matériaux organiques

### THÈME :

*Étude Comparative de Différentes  
Sous-espèces de "Juniperus"*

Présenté par :

**MESSAOUDI Saifeddine**

Devant le jury :

<b>M. Benahmed</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Larbi Tébessi</b>	<b>Président</b>
<b>B. Harkati</b>	<b>MCA</b>	<b>U. Larbi Tébessi</b>	<b>Examineur</b>
<b>S. Boudiba</b>	<b>MCB</b>	<b>U. Larbi Tébessi</b>	<b>Encadreur</b>

Tébessa le : 23/ 05/ 2017



This modest work summarize a comparative study of phytochemical composition, antioxidant activity and antibacterial activity between two sub-species of the genus “*Juniperus*” growing spontaneously in Tébessa region.

In this context, some screening phytochemical tests were carried out on the extracts of leaves and fruits of the two investigated plants, which allowed the detection of different families of active compounds contained in these plants.

An extraction of phenolic compounds using solvents with different polarities was carried out to extract the maximum of these compounds. The methanol extracts fractionations gave up twenty other extracts.

The study of the antioxidant power of the various extracts by the trapping of DPPH and the FRAP’s method allowed us to deduce that all the fractions of “*Juniperus oxycedrus*” possessed a considerable antioxidant activity in comparison with those measured for “*Juniperus phenicea*”.

The study of the antibacterial power of the two subspecies extracts showed that the two bacterial strains tested exhibited a medium sensitivity towards the leaves extracts of “*Juniperus phenicea*”, however they presented a higher sensitivity in relation to their fruit extracts.

In the case of “*Juniperus oxycedrus*” no sensitivity was detected for the two bacterial strains except in the case of “*Escherichia coli*” which exhibited a medium sensitivity to ethyl acetate leaves extract.

**Key words:** phytochemical tests, *Juniperus*, antioxidant activity, antibacterial activity.

يلخص هذا العمل المتواضع دراسة لمقارنة التكوين الكيميائي النباتي والنشاط المضادة للأوكسدة وكذا النشاط المضاد للجراثيم بين سلالتين من جنس "العرعر" و التي تنمو تلقائيا في منطقة تبسة.

في هذا السياق، تم إجراء اختبارات الفحص الكيميائي النباتي على مستخلصات من أوراق وثمار النباتين و التي سمحت بالكشف عن احتوائهما لعائلات مختلفة من المركبات النشطة. تم استخراج المركبات الفينولية باستخدام مذيبات ذات قطبية مختلفة للحصول على الحد الأقصى من هذه المركبات ، كما أسفرت تجزئة المستخلصات الميثانولية عن عشرين مستخلصا آخر.

سمحت لنا دراسة القدرة المضادة للأوكسدة لمختلف المستخلصات المتحصل عليها من خلال إيقاف فعالية الجذر الحر DPPH وطريقة FRAP باستنتاج نشاط مضاد للأوكسدة معتبر لكل أجزاء سلالة " *Juniperus oxycedrus* " مقارنة بالسلالة الثانية " *Juniperus phenicea* " .

كما أظهرت دراسة هذه المستخلصات للفعالية المضادة للبكتيريا للسلالتين أن البكتيريا المختبرة أبدت حساسية متوسطة تجاه مستخلصات أوراق " *Juniperus phenicea* " ، إلا أنها أبدت حساسية أعلى تجاه مستخلصات فاكهتها ، أما بالنسبة لمستخلصات " *Juniperus oxycedrus* " فلا توجد حساسية إلا للايشيريشيا كولي التي أظهرت حساسية متوسطة تجاه مستخلص أوراق خلات الإيثيل.

**كلمات البحث:** الاختبارات الكيميائية النباتية، العرعر، النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

Ce modeste travail résume une étude comparative de la composition phytochimique, l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne entre deux sous-espèces du genre “*Juniperus*” poussant de façon spontanée au niveau de la région de Tébessa.

Dans ce contexte, des tests phytochimiques de dépistages ont été effectués sur les extraits des feuilles et des fruits des deux plantes investiguées, ce qui a permis la détection des différentes familles de principes actifs contenus dans ces plantes.

Une extraction des composés phénoliques, on utilisant des solvants de polarités différente a été réalisée pour extraire le maximum de ces composés. Le fractionnement des extraits méthanolique a permis d'obtenir vingt autres extraits.

L'étude du pouvoir antioxydant des différents extraits par le piégeage de DPPH, et la méthode de FRAP nous a permis de déduire que toutes les fractions du “*Juniperus oxycedrus*” possèdent une activité antioxydante considérables en comparaison avec celles du “*Juniperus phenicea*”.

L'étude du pouvoir antibactérien des extraits des deux sous-espèces a montrée que les deux souches bactériennes testées ont présentées une sensibilité moyenne vis-à-vis des extraits des feuilles du “*Juniperus phenicea*”, cependant elles ont présentées une sensibilité plus élevé vis-à-vis leurs extraits de fruits. En ce qui concerne le “*Juniperus oxycedrus*” aucune sensibilité pour les deux souches bactérienne n'a été révélée, sauf dans le cas de “l'Escherichia coli” qui a présentée une sensibilité moyenne vis-à-vis l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles.

**Mots clés :** tests phytochimiques, *Juniperus*, activité antioxydante, activité antibactérien.

## REMERCIEMENTS

Avant tous, je remercie **Dieu** tous puissant qui m'a aidé pour achever ce travail de Mémoire de Master effectué au laboratoire de pédagogie du département de science de la matière et au laboratoire des Matériaux Organiques et Hétérochimie de l'Universitaire de Tébessa.

Nombreuses sont les personnes que je souhaite remercier pour m'avoir aidée et soutenue durant mon parcours.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur **Dr. Sameh Boudiba**, pour son apport scientifique, ces recommandations mesurées tout le temps et sa disponibilité pour répondre à mes questions m'on beaucoup aidé à mener ce travail dans les meilleures conditions.

Je voudrais remercier les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail :

- ◆ Professeur **Merzoug Benahmed**, de l'Université de Tébessa, qui m'a honoré en acceptant d'être président de jury. Je tiens à lui témoigner ici ma respectueuse reconnaissance et ma considération.
- ◆ Docteur **Brahim Harkati**, de l'Université de Tébessa, à qui j'exprime ma gratitude d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et de faire partie des membres du jury, sans oublier ses précieux conseils ainsi que les discussions que nous avons eues, qui m'on guidé dans ce domaine.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Docteur **Sorray Hioun** pour la réalisation de l'identification botanique des plantes étudiées.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à Docteur **Assia Zghib**, Docteur **Mabrouka Belhadj**, Docteur **Bousefin Samira** et Professeur **Djabri Belgacem** du département de biologie à l'université de Tébessa qui ont contribué à la réalisation de ce travail en nous accueillant chaleureusement dans leur laboratoire et en nous tendant scientifiquement et matériellement leur précieuse aide.

Qu'ils reçoivent ici l'expression de notre plus vive reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes remerciements à tous mes **Enseignants** qui m'ont enrichi avec leurs connaissances précieuses tout le long de mon parcours d'étude.

Enfin, mes remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. A tous ceux qui de près ou de loin ont, avec moi, fait un bout du chemin, tous ceux qui m'ont soutenu, guidé, conseillé, orienté, aidé.



Merci à vous tous

# *Dédicace*

*A la pensée de mon Père*

*A ma très chers Mère*

*A ma sœur*

*A tous les membres de ma famille*

*A tous mes amis*



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- DPPH** : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazil
- UV** : Ultraviolet
- AcEt** : acétate d'éthyle
- AQ** : aqueuse
- BR** : Brut
- But** : butanol
- %** : Pourcentage
- °C** : Degré CELSIUS
- µg** : Microgramme
- Abs** : absorbance
- PI** : Pourcentage d'inhibition
- ml**: milli litre
- MH** : Mueller Hinton
- pH**: potentiel d'hydrogène
- FRAP**: Pouvoir antioxydant par réduction du fer
- EP**: phase étherique
- CF**: phase chloroformique
- OF**: feuilles de *l'oxycedrus*
- Ph F EP**: phase d'éther de pétrole des feuilles du *phoenicea*
- Ph F CLO**: phase chloroformique des feuilles du *phoenicea*
- Ph F AcEt**: phase d'acétate d'éthyle des feuilles du *phoenicea*
- Ph F But**: phase butanolique des feuilles du *phoenicea*
- Ph F AQ**: phase aqueuse des feuilles du *phoenicea*
- Ph F EP**: phase d'éther de pétrole des fruits du *phoenicea*
- Ph F CLO**: phase chloroformique des fruits du *phoenicea*
- Ph F AcEt**: phase d'acétate d'éthyle des fruits du *phoenicea*
- Ph F But**: phase butanolique des fruits du *phoenicea*
- Ph F AQ**: phase aqueuse des fruits du *phoenicea*
- O F EP**: phase d'éther de pétrole des feuilles de *l'oxycedrus*
- O F CLO**: phase chloroformique des feuilles de *l'oxycedrus*
- O F AcEt**: phase d'acétate d'éthyle des feuilles de *l'oxycedrus*
- O F But**: phase butanolique des feuilles de *l'oxycedrus*



**O F AQ:** phase aqueuse des feuilles de *l'oxycedrus*  
**O F EP:** phase d'éther de pétrole des fruits de *l'oxycedrus*  
**O F CLO:** phase chloroformique des fruits de *l'oxycedrus*  
**O F AcEt:** phase d'acétate d'éthyle des fruits de *l'oxycedrus*  
**O F But:** phase butanolique des fruits de *l'oxycedrus*  
**O F AQ:** phase aqueuse des fruits de *l'oxycedrus*  
**DMSO :** diméthylsulfoxyde  
**nm :** Nanomètre  
**μL :** micro litre  
**Cytc :** Cytochrome c (enzyme)  
**DZI :** diamètre de zone d'inhibition  
**BN :** bouillon nutritif  
**Staph :** staphylococcus aureus

N°	Figure	Page
01	Exemple de quelques glucides	6
02	Exemple de molécule d'acide gras	7
03	Exemple d'amidon	7
04	Exemples de quelques flavonoïdes	8
05	Exemple d'éléments de tanins	9
06	Quelques exemples de coumarines	10
07	Exemples de stéroïdes	10
08	Quelques exemples de terpénoïdes	11
09	Quelques exemples des saponosides	11
10	Quelques exemples d'alcaloïdes	12
11	Photo de l'arbre " <i>Juniperus phoenicea L.</i> " (2 mètre de hauteur)	14
12	Photo des feuilles et des fruits du " <i>Juniperus phoenicea L.</i> "	15
13	Carte chronologique pour la distribution de " <i>Juniperus phoenicea L.</i> "	15
14	Photo de l'arbre " <i>Juniperus oxycedrus L.</i> "	16
15	Photo des feuilles et des fruits du " <i>Juniperus oxycedrus L.</i> "	17
16	Carte chronologique pour la distribution de " <i>Juniperus oxycedrus L.</i> " au parc national de Theniet el Had	17
17	Carte géographique de la zone de récolte	21
18	Courbe d'étalonnage de la teneur en flavonoïdes de la Tamarixetine	28
19	Histogramme représentatif de la teneur en flavonoïdes des feuilles du " <i>J. oxycedrus</i> "	39
20	Histogramme représentatif de la teneur en flavonoïdes des feuilles du " <i>J. phoenicea</i> "	39
21	Histogramme représentatif de la teneur en flavonoïdes des fruits du " <i>J. oxycedrus</i> "	39
22	Histogramme représentatif de la teneur en flavonoïdes des fruits du " <i>J. phoenicea</i> "	40
23	Pouvoir réducteur des extraits des feuilles du " <i>Juniperus oxycedrus</i> " en comparaison avec celui de l'acide ascorbique	40
24	Pouvoir réducteur des extraits des feuilles du " <i>Juniperus phoenicea</i> " en comparaison avec celui de l'acide ascorbique	41
25	Pouvoir réducteur des extraits des fruits du " <i>Juniperus oxycedrus</i> " en comparaison avec celui de l'acide ascorbique	41
26	Pouvoir réducteur des extraits des fruits du " <i>Juniperus phoenicea</i> " en comparaison avec	42

	celui de l'acide ascorbique	
27	Forme libre et réduite de la molécule DPPH	43
28	Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH par les extraits des feuilles du " <i>J. oxycedrus</i> "	43
29	Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH par les extraits des feuilles du " <i>J. phoenicea</i> "	44
30	Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH par les extraits des fruits du " <i>J. oxycedrus</i> "	44
31	Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH par les extraits des fruits du " <i>J. phoenicea</i> "	45
32	Effet du DMSO sur les deux bactéries testées	45
33	Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du " <i>Juniperus oxycedrus</i> " sur l' <i>Escherichia coli</i> et le <i>Staphylococcus aureus</i> .	45

N°	Schéma	Page
01	Formation d'un acide aminé	6
02	Les étapes de fractionnement des polyphénols	21
03	Exemple d'étapes du métabolisme oxydatif	27
04	Principe de piégeage des radicaux libres de DPPH	29

N°	Titre	Page
1	taxonomie du “ <i>Juniperus oxycedrus L.</i> ” et du “ <i>Juniperus phoenicea L.</i> ”	18
2	Quelques maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués	19
3	Sensibilité et degré d’activité selon le diamètre d’inhibition	31
4	Résultat des tests phytochimiques effectués sur les extrais de fruits du “ <i>Juniperus Phoenicea</i> ”	32
5	Résultat des tests phytochimiques effectués sur les extrais de feuilles de “ <i>Juniperus oxycedrus</i> ”	33
6	Résultat des tests phytochimiques effectués sur les extrais des fruits de “ <i>Juniperus oxycedrus</i> ”	35
7	Résultat des tests phytochimiques effectués sur les extrais des fruits du “ <i>Juniperus oxycedrus</i> ”	36
8	Résultats estimés en termes de diamètres des zones d’inhibition (mm) du <i>Staphylococcus aureus</i> et de l’ <i>Escherichia coli</i> , autour des puits et des disques contenant les extraits des deux plantes étudiées.	48

Abstract	I
ملخص	II
Résumé	III
Remerciements	IV
Dédicace	V
Liste des abréviations	VI
Liste des figures	VII
Liste des schémas	VIII
Liste des tableaux	IX
Table des matières	X
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	1
<b>CHAPITRE I : Généralités Sur Les Produits Naturels</b>	
<b>I. HISTORIQUE</b>	3
<b>II. COMPOSITION CHIMIQUE DES PLANTES</b>	5
<b>II. 1. Les métabolites primaires</b>	5
<b>II. 2. Les métabolites secondaires</b>	7
<b>III. UTILISATION DES PLANTES MEDICINALE</b>	12
<b>IV. ORIENTATION DES RECHERCHES ACTUELLES</b>	13
<b>V. PRÉSENTATION DES OBJECTIFS</b>	13
<b>VI. RÉSENTATIONS DES PLANTES</b>	14
<b>VI. 1. Le “<i>Juniperus phoenicea L.</i>”</b>	14
<b>VI. 2. Le “<i>Juniperus oxycedrus L.</i>”</b>	15
<b>VI. 3. Taxonomie</b>	18
<b>VII. DÉTERMINATION DE L’ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE</b>	18
<b>CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	
<b>I. MATERIELS</b>	20
<b>I. 1. Matériel végétal</b>	20
<b>I. 2. Souches bactériennes testées</b>	20
<b>II. EXTRACTION DES POLYPHÉNOLS</b>	22
<b>III. TESTS PHYTOCHIMIQUES</b>	23
<b>III. 1. Macération à l’eau distillée</b>	22
<b>III. 2. Macération à l’éthanol</b>	22

<b>III. 3. Macération à l'éther diéthylique</b>	25
<b>IV. DOSAGE DES FLAVONOÏDES</b>	27
<b>V. REDUCTION DU FER PAR LA METHODE DE FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER)</b>	28
<b>VI. PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH (2,2-DIPHENYLE-1-PICRYLHYDRAZYL)</b>	28
<b>VII. DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES (DIFFUSION EN MILIEU MULLER HINTON)</b>	30
<b>VII. 1. Principe</b>	30
<b>VII. 2. Préparation des inoculums</b>	31
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>I. EXTRACTION</b>	32
<b>II. RÉVÉLATION PHYTOCHIMIQUE (SCREENING)</b>	33
<b>III. ÉVALUATION QUANTITATIVE DES FLAVONOÏDES DANS LES EXTRAITS</b>	38
<b>IV. RÉSULTATS D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES</b>	40
<b>IV.1. Réduction de fer (FRAP)</b>	40
<b>IV. 2. Piégeage du radical libre DPPH</b>	43
<b>V. RÉSULTATS D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNE</b>	46
<b>CONCLUSION</b>	49

# Introduction

# Généralie





Sans aucun doute, la diversité des plantes nous émerveille, des couleurs étincelantes ou ténébreuses des fleurs, des parfums qui réveille les sens, des formes infinies des feuilles, des lieux si divers où nous pouvons les trouver.

Cet émerveillement est renforcé dès que l'on cherche à comprendre leur structure particulière et leurs intérêt pour la vie sur terre.

De toute éternité, ces créatures vivantes ont occupées une place éminente dans la vie de l'homme. Depuis plus de 480 millions d'années, le jaillissement des plantes s'est produit constituant un événement précieux dans l'histoire de la vie à la surface de notre planète. Sans aucune ambiguïté, grâce à ces créatures terrestres la vie continu.

Cette importance apparait clairement dans le rôle majeur qu'elles jouent dans l'écosystème terrestre, dans la mesure où elles constituent une part essentielle de la biosphère. Elles sont à l'origine de la production d'oxygène (O<sub>2</sub>) en transformant le (CO<sub>2</sub>) contenu dans l'atmosphère, on les retrouve à la base des réseaux trophiques en constituent ainsi la nourriture de plusieurs unités d'espèces vivantes, elles favorisent la lutte contre l'érosion comme elles produisent des composés importants.

A travers l'évolution des civilisations, leur richesse en ces produits importants qu'elles enveloppent a permis à l'homme de les utiliser comme remèdes naturels sans chercher à savoir pourquoi ou comment elles agissent. En effet il est enthousiasmant qu'une racine, une feuille, une fleur ou un fruit puisse guérir ou alléger un état maladif, un malaise, une peine, ou des troubles organiques <sup>[1]</sup>. L'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupés une place importante en médecine, en parfumerie et en gastronomie.

Actuellement, se soignent avec des thérapies traditionnels originaires des plantes est devenu un issu pour les gens à travers le monde, particulièrement dans les pays en voie de développement. Par ailleurs, même l'industrie pharmaceutique les considèrent de plus en plus comme source de matières premières essentielle pour la découverte de nouvelles molécules fondamentales à la mise au point de futurs médicaments <sup>[2]</sup>, en raison de leurs propriétés biologiques originales qui font preuve de grandes efficacités tels que les antibiotiques.

Ce don auguste du grand Dieu est très généreux, car seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimiques et pharmacologiques, sans oublier que chaque espèce peut contenir des milliers de composants différents <sup>[3]</sup>.

Dans ce contexte la recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une considérable importance du fait qu'elle a conduit à l'invention de nouveaux traitements thérapeutiques.

Le présent travail constitue une partie de l'effort fournis par notre équipe dans le cadre de la valorisation de la flore locale, et ce par l'étude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique (activités antioxydante et antibactérienne) des extraits de deux sous espèces du genre "*Juniperus*" appartenant à la famille des "*Cupressacées*" collectées dans la région de Tébessa.

La recherche bibliographique que nous avons menée sur ce genre de plante a montré que seule une étude antérieure des activités antioxydantes (par la méthode de DPPH) a été faite au niveau de la région de Tébessa sur les extraits des feuilles d'une seule sous-espèce "*Juniperus phoenica L.*" [4] et une deuxième effectuée sur la même sous-espèce élaborée par notre équipe l'année passé (2015/2016) [5].

Les résultats prometteurs de l'étude effectuée précédemment par notre équipe nous ont encouragé à continuer dans cet axe et d'exploiter une autre sous-espèce du même genre appelée "*Juniperus oxycedrus L.*", pour une étude comparative avec la sous-espèce "*Juniperus phoenica L.*" sur les plans phytochimique et biologique des différents extraits obtenu à partir des deux parties aériennes (feuilles et fruits).

Pour cela, notre étude a été réalisée en trois volets :

- Dans un premier chapitre et après une introduction générale, nous avons exposé une étude bibliographique qui comporte des généralités sur les produits naturels, leurs compositions chimiques, leurs domaines d'utilisations pour terminer avec la présentation des objectifs de ce mémoire.
- Le deuxième chapitre est dédié à une introduction aux plantes étudiées, leur répartition botanique et la partie expérimentale de notre travail, où on décrit la méthode d'obtention des différents extraits, l'analyse de leurs compositions chimiques par des testes de dépistages, l'étude de leur activité antioxydante par deux méthodes et de leur activité bactériologique.
- Une discussion des résultats obtenus lors de cette étude a été établie au dernier volet suivie par une conclusion générale et une présentation des perspectives.

- [1] P. Schauenberg, P. Ferdinand. "Guide to medicinal plants", *Lutterworth Press, ISBN 13, 2001*, p.115.
- [2] N. Maurice, "De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI<sup>e</sup> siècle", *Lavoisier, Paris, France, 1997*, p.12-14.
- [3] K. Hostettmann, O. Potterat, J. L. Wolfender, "The potential of Higher Plants as a Source of New Drugs", *Chimia, 1998*. 52, p.10-17.
- [4] D. Messadia, "Évaluation de l'activité antioxydante de *Juniperus phoenicea*", Mémoire de Master, *Université de Larbi-Tébessi, Tébessa-Algérie, 2015*.
- [5] H. Beddiar, "Étude de *Juniperus Phoenicea L.* de la région de Tébessa : Composition chimique, Activités antioxydantes, et Activités microbiologiques, Mémoire de Master, *Université de Larbi-Tébessi Tébessa-Algérie, 2016*.

# Généralités sur les Produits Naturels



Depuis les temps les plus reculés, l'homme a appris l'importance des plantes pour sa propre survie et l'art de les cultiver. Il est fort possible que les premières découvertes des propriétés curatives des végétaux furent fortuites car en voulant se nourrir, l'homme primitif trouva leur faculté médicinale, et il fut certainement aidé dans cela par l'observation des animaux, qui instinctivement savaient s'en servir.

Se soigner par des remèdes issus de ces êtres vivants a marqué presque toutes les civilisations connues. Les plantes médicinales ont été pendant longtemps la principale source de principes actifs utilisés pour la production de médicaments destinés au traitement des maladies humaines, animales.

Donc revenant en arrière à travers le temps passé pour accompagner l'histoire de l'emploi de ces plantes.

## I. HISTORIQUE :

L'histoire de l'usage des plantes dans différents domaines tel que la parfumerie, la gastronomie et surtout la médecine se perd dans les nuits des temps et s'associe à chaque culture.

En feuilletant l'histoire à partir des anciennes civilisations, on s'aperçoit que les égyptiens furent parmi les premiers hommes qui ont enregistré sur leurs papyrus, datant du 3<sup>ème</sup> millénaire leurs connaissances sur les vertus des plantes médicinales, ils citaient le ricin, l'anis, le blé, le lotus, et ils faisaient appel à quelques 400 drogues dont la majorité était d'origine végétale.

Les babyloniens eux, nous ont laissé des tablettes d'argiles cuites portant des listes de drogues soigneusement établies, les substances utilisées entre le Tigre et l'Euphrate, étaient presque les mêmes que celles des égyptiens, et les habitants de Babylone utilisaient plus de 64 espèces de plantes médicinales qu'ils cultivaient.

En plus des égyptiens et des babyloniens, certains historiens racontent que les mésopotamiens connaissaient environ 250 drogues d'origine végétale, et ces produits ont été intégralement repris par le monde antique, surtout par les grecs et les herboristes du moyen âge.

L'emploi des plantes pour éliminer les peines a été marqué par les chinois vers 2800 avant JC. Le premier livre de matière médicale a été rédigé par Chen-Nong (ou Chennong) <sup>[2]</sup>.

De siècle en siècle, Théophraste, Aristote puis Plin l'ancien et Dioscoride approfondirent la connaissance des plantes et de leurs propriétés. L'ouvrage de Dioscoride "materia-medica" (1<sup>er</sup> siècle avant J.C) décrit plus de cinq cents plantes et leurs utilisations. Ce livre restera une référence jusqu'au 18<sup>ème</sup> siècle, il en sera de même pour les travaux de Galien, médecin de Marc-Aurèle considéré comme le fondateur de la pharmacie <sup>[3]</sup>.

A l'époque du roi Hammourabi qui a régné la région Mésopotamie (environ 1700 avant JC), environ 250 plantes médicinales ont été employées <sup>[4,5]</sup>.

Après l'effondrement des empires romains et perses, les musulmans héritèrent des sciences rassemblées dans l'extrême orient et dans la méditerranée. Durant cette période beaucoup de livres ont été traduits du grec, du latin et du perse. Parmi ces traducteurs musulmans qui ont traduits environ 230 manuscrits on peut citer Abou Bakr El Razi (865-925), parmi ses écrits les plus importants sons livre "El haoui" qui fut un récapitulatif de toutes les connaissances depuis Hippocrate. Puis viens le plus célèbre des médecins musulmans Avicenne de son vrai nom Abu Ali Ibn Sina (980-1037) qui dès l'âge de 17 ans s'adonna à la médecine, il écrivit son célèbre livre "El kanoun fi tib", traduit partout dans le monde et utilisé comme référence jusqu'à nos jours<sup>[1]</sup>.

Au 16<sup>ème</sup> siècle, Paracelse (médecin suisse) a énoncé la théorie dite "signatures" : un certain nombre de plantes nous donnent des indications sur les affections à traiter par la forme des feuilles par exemple : celles en forme de cœur, du fruit (la noix qui fait penser au cerveau), la couleur de certaines plantes (proche de la couleur du sang, ou de celle de la bile) <sup>[4, 6]</sup>.

Nous citerons parmi les derniers médecins arabes du 17<sup>ème</sup> siècle, AbdeRazak Ibn Haadouche El Djazairi (1695-1785) qui écrivit son livre "Liste des plantes médicinales" qui fut traduit durant la période coloniale en français <sup>[1]</sup>.

Entre le 18<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> siècle et suite aux progrès évidents de la botanique (Carl Von Linné, Jussieu, et autres), les plantes sont aussitôt analysées chimiquement et ne sont plus considérés comme de simples breuvages. Ces derniers deviennent des thériaques, leurs formules fut améliorées et variées au cours du temps pour donner les remèdes. Les thériaques pouvaient être composées de 50 à 100 substances animales, végétales, ou minérales <sup>[7]</sup>. En 1818, la première édition de la pharmacopée française parvint ainsi que le règne des chimistes qui isolèrent une série impressionnante de molécules comme : la morphine (1817), la codéine (1832), l'acide salicylique et dans la seconde moitié du 19<sup>ème</sup> siècle : la quinine, la strychnine, la colchicine, la cocaïne et l'ésérine <sup>[8, 9]</sup>.

Actuellement, l'élargissement des recherches et des études botaniques, permet de sélectionner des substances qui pour certaines deviennent des médicaments révélant des mécanismes d'actions originaux, et en conséquence ouvrent de nouvelles voies de synthèses. Parallèlement, l'exploration de la connaissance des plantes d'usage traditionnel, tout comme l'amélioration des techniques de productions, l'évaluation clinique de leurs effets permet de mieux cerner ce qu'elles peuvent apporter aux moyens thérapeutiques <sup>[10]</sup>.

## II. COMPOSITION CHIMIQUE DES PLANTES :

Lorsqu'on observe bien la plantes on distingue qu'elle possède une faculté que l'homme n'a pas; grâce à ses racines elle réussit à puiser dans le sol les éléments nutritifs et à les transformer par ses facultés de photosynthèse.

De part le code génétique de cette créature, la croissance et les éléments constitutifs de la plante vont être très variables. Pour une même espèce végétale, nous allons retrouver certaines constantes dans la composition de cette plante; néanmoins, des variations vont avoir lieu à cause des différences de l'environnement.

Si les conditions idéales sont réunies la plante va être pleine d'énergie vitale et de santé sinon, comme l'homme, elle peut souffrir de carences, d'excès et de maladies de toute nature.

La connaissance de la composition chimique des plantes est indispensable pour la compréhension de leurs activités biologique ou pharmacologique.

Ces richesses naturelles se divises en deux grands métabolismes :

- Les métabolites primaires,
- Les métabolites secondaires.

### II. 1. Les métabolites primaires :

#### II. 1. 1. Les glucides :

Les glucides sont des molécules organiques forment 1 à 2 % de la masse cellulaire, elles contiennent du carbone (**C**), de l'hydrogène (**H**) et de l'oxygène (**O**). Ces deux derniers atomes sont présents dans le même rapport 2:1 que dans l'eau, c'est pourquoi les glucides sont parfois appelés des hydrates de carbone. Ces molécules sont caractérisées par la présence de chaînes carbonées porteuses de groupements hydroxyles, et de fonctions aldéhydes ou cétoniques. En fonction de leurs volumes et de leurs solubilités les glucides sont classés en monosaccharides ou oses (1 sucre), en disaccharides ou osides (2 sucres) et en polysaccharides ou polyosides (plusieurs sucres). La figure 1 représente un exemple de quelques glucides.

Les monosaccharides sont les unités de base de tous les autres glucides. En règle générale, plus la molécule de glucide est grosse, moins elle est soluble dans l'eau <sup>[11]</sup>.

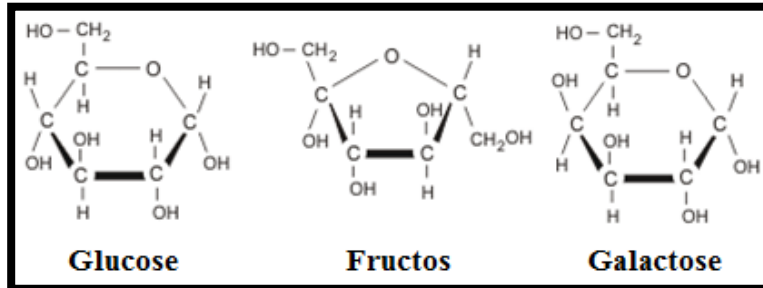


Figure 1 : Exemple de quelques glucides.

### II. 1. 2. Les peptides :

Un peptide est un composé formé d'enchaînement d'acides  $\alpha$ -aminés. Lorsqu'un grand nombre (plus d'une dizaine) d'acide  $\alpha$ -aminés sont reliés entre eux, la macromolécule est appelée protéine. Les acides aminés sont reliés entre eux par une liaison peptide comme illustré sur le schéma 1, il s'agit d'une liaison amide obtenue par réaction d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction amine libérant une molécule d'eau. Les quatre atomes (C, N, O et H) sont dans un même plan et les liaisons sont coplanaires <sup>[9]</sup>.

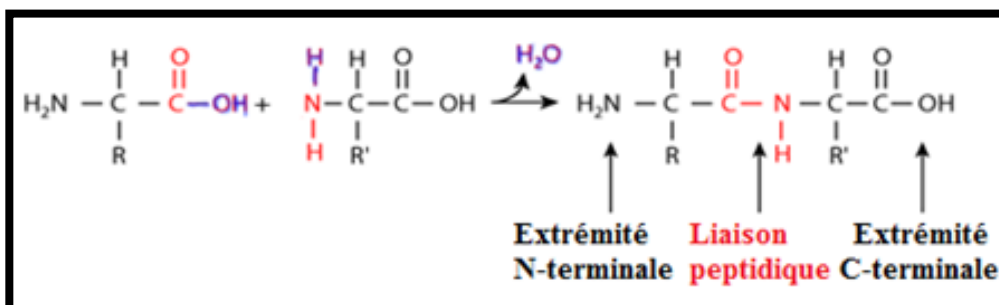


Schéma 1 : Formation d'un acide aminé.

### II. 1. 3. Les lipides :

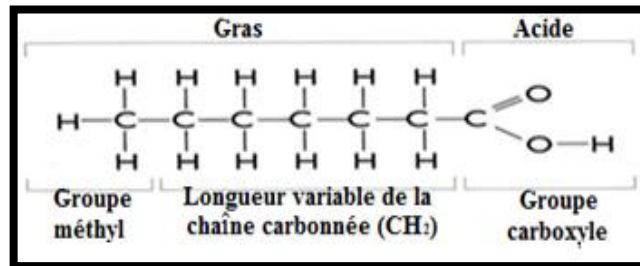
Les lipides sont des molécules organiques qui peuvent être simples ou complexes, qui forment les corps gras. Ces composés sont solubles dans différents solvants organiques apolaires mais insolubles ou très peu solubles dans l'eau. Ils représentent une source importante d'énergie présente dans les aliments et dans l'organisme vivant. Comme pour les glucides, tous les lipides contiennent du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène, dans certains lipides complexes on trouve du phosphore (P). Les lipides sont utilisés pour le stockage d'énergie d'une part, essentiellement sous forme d'esters, de triacylglycérol et d'esters de stéroïdes <sup>[12]</sup> et d'autre part ceux qui sont polaires



(constitué d'une partie hydrophobe et d'une autre hydrophile) forment la matrice des membranes cellulaires.

En plus de la fonction de barrière, les lipides fournissent des membranes de destructions et de fusions (caractéristiques essentielles pour la division cellulaire) [13].

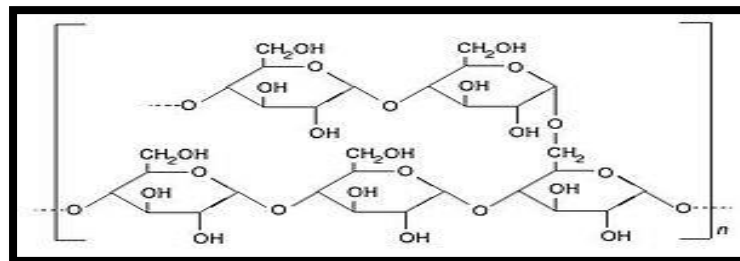
La figure 2 représente un exemple d'acide gras.



**Figure 2 :** Exemple de molécule d'acide gras.

#### II. 1. 4. Les amidons :

L'amidon est la principale forme de réserve glucidique des végétaux. Il est présent dans toutes les parties de la plante et existe sous la forme d'une structure organisée correspondante à un homopolymère presque pur de D-glucose. La figure 3 illustre un exemple d'amidon.



**Figure 3 :** Exemple d'amidon.

### II. 2. Les métabolites secondaires:

Cette deuxième famille est formée de composés phénoliques, de composés azotés "Alcaloïdes", de terpénoïdes et de stéroïdes.

#### II. 2. 1. Les composés phénoliques :

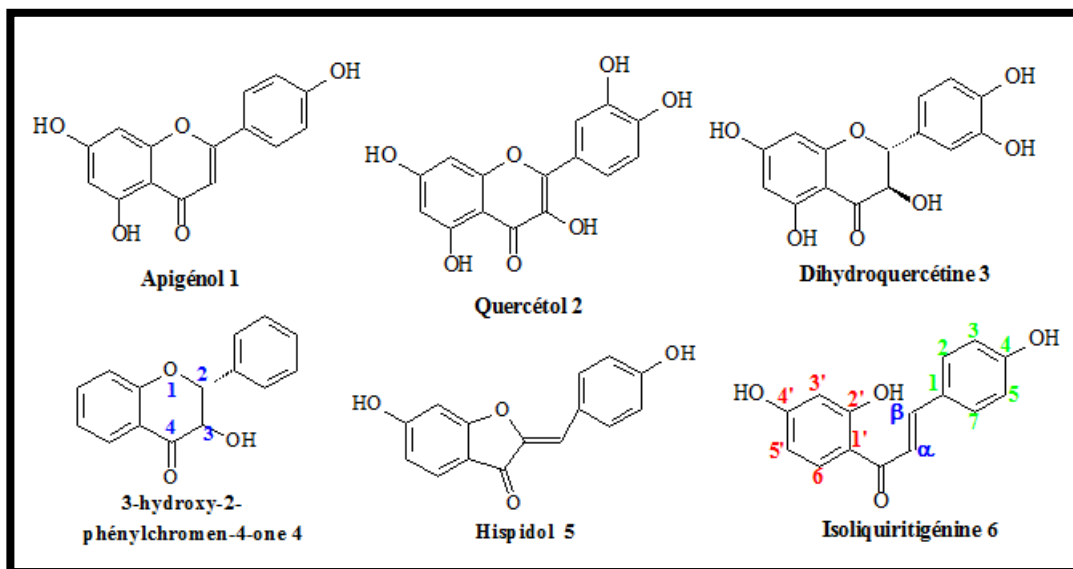
Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal, ils regroupent : les phénols, les coumarines, les flavonoïdes, les tanins, et les quinones.

### II. 2. 1. 1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des produits assez distribués dans le règne végétal. Ils représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons comme le thé. Ce sont des pigments végétaux simples ou glycosylés formant une sous-classe des polyphénols, garantissant la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques reliés par une chaîne en 3 carbones. Le pont à C<sub>3</sub> entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle appelé pyrone.

Ces molécules sont capables d'articuler l'activité de certaines enzymes et de changer le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, et même antitumorales significatives [14].

La distinction des sous-classes des flavonoïdes se fait sur la conformation de leur structure. On peut distinguer notamment des molécules illustrant différentes propriétés comme : les flavones (flavone apigénol **1**), les flavonols (quercétol **2**), les flavanonols ou dihydroflavonol (dihydroquercétol **3**), les flavanones (2,3-dihydro-2-phenylchromen-4-one **4**), les aurones (hispidol **5**), les chalcones (l'isoliquiritigénine **6**) (figure 4) [15].



**Figure 4 :** Exemples de quelques flavonoïdes.

### II. 2. 1. 2. Les tanins :

Les tanins du châtaignier (*Castaneasp.*), ont longtemps été utilisés pour rendre la peau animale fraîche et résistante à l'eau et à la chaleur. Ces propriétés sont dues à l'aptitude de ces composés à

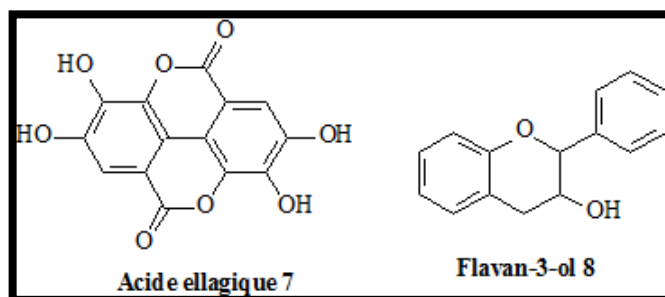
se combiner aux macromolécules (et donc aux fibres de collagène de la peau). Ceci explique la précipitation des protéines, de la cellulose et des pectines par les tanins. En 1962, les tanins sont définis comme des composés phénoliques hydrosolubles, ayant la propriété de précipiter la gélatine et d'autres protéines et de se colorer par les sels ferriques.

Aujourd'hui, on distingue :

**a) Les tanins hydrolysables** : esters d'un sucre (généralement le glucose) et de l'acide gallique ou de l'acide ellagique **7** (figure 5).

**b) Les tanins condensés ou proanthocyanidols** : non hydrolysables résultant de la polymérisation d'unités flavan-3-ols **8** (figure 5). Ils forment dans les vacuoles des solutions pseudo colloïdales et peuvent aussi se fixer au niveau des lignines, renforçant encore l'imputrescibilité du bois.

Il est noté que les tanins disparaissent lorsque les fruits atteignent leurs maturations ce qui montre que comme d'autres composés phénoliques, ils peuvent être réutilisés par la plante <sup>[15]</sup>.



**Figure 5** : Exemple d'éléments de tanins.

### II. 2. 1. 3. Les coumarines :

Historiquement le nom de coumarine vient de "Cumaru" qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka "Fabaceae" dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine. Ce sont des substances naturelles aromatiques, dotées d'odeur qui se rapproche de la vanilline largement employées en parfumerie.

Les plus simples de cette famille se trouvent dans différentes essences de plantes comme la lavande, la cannelle de Chine ... etc., comme on peut les trouver dans le miel et le thé vert. Cependant les plus complexes sont cités chez les "Apiaceae" et les "Rutaceae". D'un point de vue médical ces composés étaient utilisés comme anti-œdémateux.

La figure 6 illustre quelques exemples de ces composés <sup>[16]</sup>.

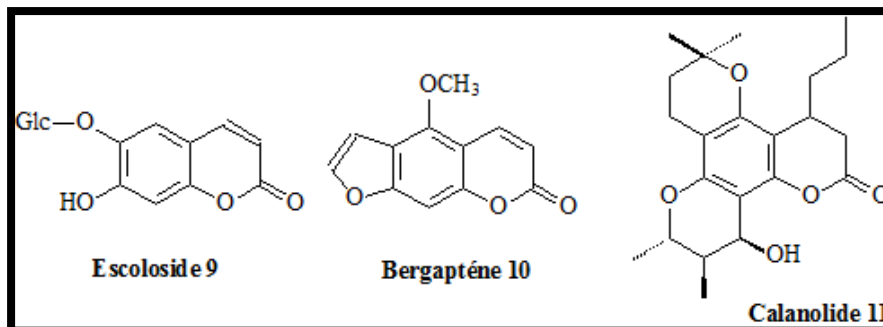


Figure 6 : Quelques exemples de coumarines.

## II. 2. 2. Les composés terpéniques :

### II. 2. 2. 1. Les stéroïdes :

Le terme stéroïde tire son origine du mot grec "Stéréos" signifiant "Solide" désignant toutes les molécules comportant un squelette de base tétra-cyclique (stérane : cyclopentanophénantrène **12**) comme illustré sur la figure 7 <sup>[17]</sup>.

Ces produits représentent un ensemble de molécules dérivées du cholestérol ou de ses homologues particulièrement abondants chez les végétaux et les animaux. Cette classe de substances naturelles représente une sous-classe des tri-terpènes et formant ainsi tout un groupe d'alcools solides. Sur la même figure (7) on retrouve autres exemples de stéroïdes comme le stérol (cholestérol **13**) et le glucocorticoïde (cortisol **14**) <sup>[18]</sup>.

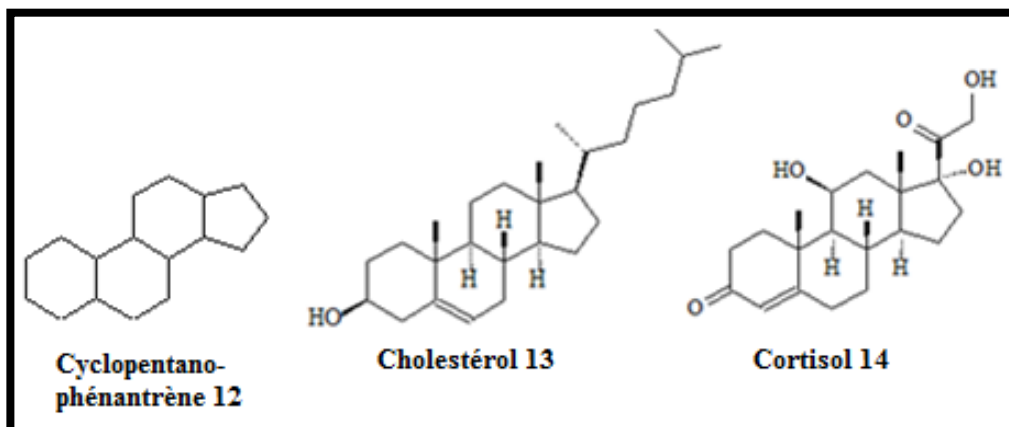
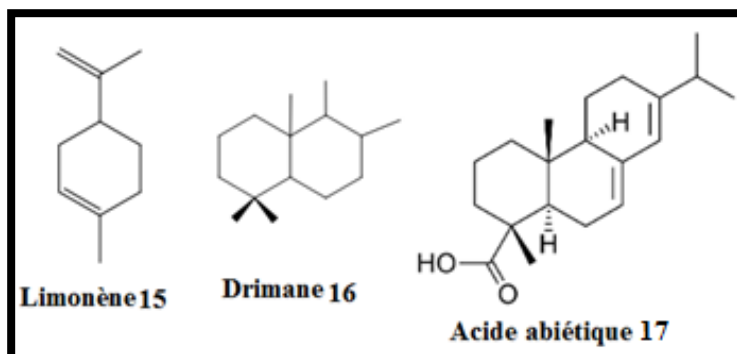


Figure 7 : Exemples de stéroïdes.

### II. 2. 2. 2. Terpénoides :

Les terpénoides appelés parfois isoprénoides forment une classe large et diverse de composés organiques que l'on rencontre dans la nature, similaires aux terpènes, dérivant d'unités isoprène à cinq carbones assemblées et modifiées de milliers de façons. Ces lipides peuvent être trouvés dans

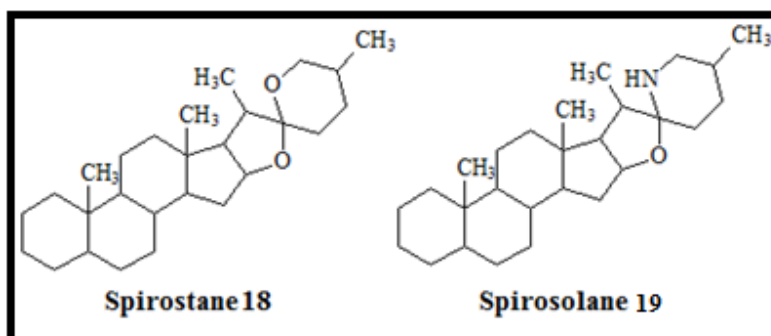
toutes les classes de créatures vivantes, et constituent le plus large groupe de produits naturels. Sur la figure 8 on retrouve quelques terpénoïdes <sup>[19]</sup>.



**Figure 8 :** Quelques exemples de terpénoïdes.

### II. 2. 2. 3. Les saponosides :

On entend par saponosides le mot latin "Sapon", savon; "Saponaire", (l'herbe à savon), des hétérosides à aglycones de structure stéroïde ou tri-terpénique qui tiennent une grande place parmi les substances d'origine végétale <sup>[20]</sup>. Ils sont classés en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être soit tri-terpénique, soit stéroïdique. La figure 9 illustre quelques exemples de ces composés <sup>[21]</sup>.



**Figure 9 :** Quelques exemples des saponosides.

### **II. 2. 3. Les composés azotés "Alcaloïdes" :**

Les alcaloïdes sont des molécules azotées et alcalines, ils précipitent généralement avec des réactifs iodométalliques (réactif de Dragendorff) et sont souvent biologiquement actifs.

Ces composés regroupent de nombreuses molécules comme la quinine, la cocaïne, des anticancéreux (la vincristine et le taxol), et des stimulants (caféine). La plupart des alcaloïdes naturels sont d'origine végétale (il existe des exceptions dans le monde animal). Ils sont connus pour leurs effets biologiques intéressants et cela les classifie au sommet d'interactions de

protections contre les pressions biotiques (herbivores, microorganismes). Ces molécules sont caractérisées par l'amertume (une caractéristique anti-nutritionnelle) d'une part, et d'autre part par leurs volatilités à l'exception de la coniine qui est à l'origine de l'odeur des souris dégagée par le froissement de feuilles de cigüe [22]. On distingue généralement trois classes d'alcaloïdes représentées dans la figure 10 :

**a) Les alcaloïdes vrais :** qui sont du point de vue biosynthétique dérivés d'acides aminés, présentant au moins un hétérocycle (exemple : la strychnine **20**; dérivée du tryptophane).

**b) Les proto-alcaloïdes :** qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine **21**).

**c) Les pseudo-alcaloïdes :** comme la caféine **22**.

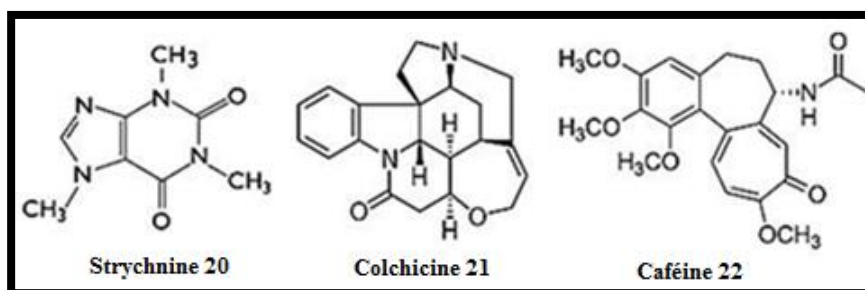


Figure 10 : Quelques exemples d'alcaloïdes

Cependant apart leurs utilisations dans le domaine médicale, quelques alcaloïdes sont employés dans l'agronomie [23].

### III. UTILISATION DES PLANTES MÉDICINALE :

Le praticien traditionnel de santé récoltait ou faisait récolter les plantes médicinales pour traiter les gens malades. Chaque traitement était en fonction de la raison pour laquelle le patient se plein avec des rituels bien précis, en respectant la quantité limite de la plante fraîchement employée.

Cette pratique était belle et bien de la phytothérapie, ce terme grec qui signifie "se soigner par les plantes". Cette science reposait en partie sur une pratique traditionnelle, fondée sur l'utilisation ancestrale et locale des plantes.

Depuis plusieurs années, de nombreux produits de phytothérapie sont mis sur le marché, et sous différentes galéniques : solide en comprimés ou gélules, liquide dans des ampoules ou des flacons, etc. La qualité de la plante utilisée (fraîche ou sèche), son origine (développée à l'état spontané ou issue d'agriculture) conditionne sa teneur et sa richesse en principes actifs.

De plus, un produit à base de plante, doit, pour avoir une efficacité optimale, restituant toute la complexité moléculaire du végétal qui est à l'origine de son activité thérapeutique.

#### IV. ORIENTATION DES RECHERCHES ACTUELLES :

Dû aux nombreux principes actifs que renferment ces plantes médicinales qui ont des activités thérapeutiques synergiques ou complémentaires, une attention particulière et croissante a été portée aux procédés utilisés pour l'extraction, l'étude et l'exploitation de ces principes contenus dans ces créatures pour les reproduire synthétiquement et les utilisés de nos jours dans divers produits de consommation.

En effet, leur utilisation est encouragée car les produits équivalents issus de synthèses chimiques ont, à tort ou à raison, mauvaise presse parmi le grand public. Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels...) [24].

#### V. PRÉSENTATION DES OBJECTIFS :

Ce modeste travail a pour ambition scientifique la recherche de nouveaux principes actifs, et ce par l'étude comparative sur les plans phytochimique et biologique de deux sous-espèces d'une plante du genre "*Juniperus*" appelé aussi poivre du pauvre ou "araar عرعار" en Algérie, d'origine américaine, asiatique, africaine et européenne, une plante qui a démontré son effet bénéfique sur les coliques et autre gastrites en médecine traditionnelle.

La première sous-espèce est la "*Juniperus phoenicea L.*" et la deuxième est la "*Juniperus oxycedrus L.*", poussant à l'état spontané dans la région de Tébessa (Nord-est de l'Algérie).

Des tests phytochimiques à réaliser lors de cette étude visent la détection des différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles et les fruits des plantes étudiées.

Une extraction conventionnelle solide-liquide, suivie d'une extraction par solvants de polarité différente est envisagée, l'étude du pouvoir antioxydant des extraits par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et par la réduction du ferre FRAP, le dosage des flavonoïdes ainsi qu'une étude de l'activité antibactérienne ferons l'objectif de ce travail de mémoire de master en chimie organique.

## VI. PRÉSENTATIONS DES PLANTES :

### VI.1. Le “*Juniperus phoenicea L.*” :

#### VI. 1. 1. Description botanique:

L’aire de répartition du genévrier rouge “**Genévrier de Phénicie**” appartenant à la famille des “**Cupressaceae**” classé comme deuxième genre le plus diversifié des conifères, avec 67 espèces et 34 variétés (toutes les variétés sont limitées à l’hémisphère Nord) <sup>[26]</sup>, s’intercale entre les formations steppiques de basse altitude et les formations forestières et pré-forestières à chêne vert. Cette position attribue au “*J. phoenicea L.*” un rôle écologique considérable du fait qu’il se comporte comme un élément de forte résistance à l’érosion éolienne et à la pression anthropique.

Comme le montre la figure 11, on distingue cet arbuste qui se trouve dans les populations irrégulières et souvent isolées sur l’ensemble de la région méditerranéenne adapté au climat aride des autres genévriers par la couleur rouge de ses fruits, par son port ramifié et moins puissant, par l’aspect touffu de ses rameaux cylindriques et enfin, par son absence de la haute montagne aux altitudes supérieures à 2400 mètres <sup>[25]</sup>.



**Figure 11** : Photo de l’arbre “*Juniperus phoenicea L.*” ( 2 mètre hauteur ) .

Ses feuilles persistantes opposées (rarement verticillées par trois), se présentent en deux formes :

- ✓ Feuilles en aiguilles, piquantes avec deux lignes blanches dessus et dessous qui se trouvent uniquement sur les individus très jeunes.
- ✓ Feuilles en petites écailles, ovales et bombées sur le dos, étroitement appliquées sur les rameaux, bordées d'une marge d'aspect cartilagineux.

Ses fruits sont globuleux, assez gros (8 à 10 mm), noirâtres quand ils sont jeunes, puis verts et enfin rouges sombres et luisants, à maturité ils renferment 7 à 9 fruits (figure 12)

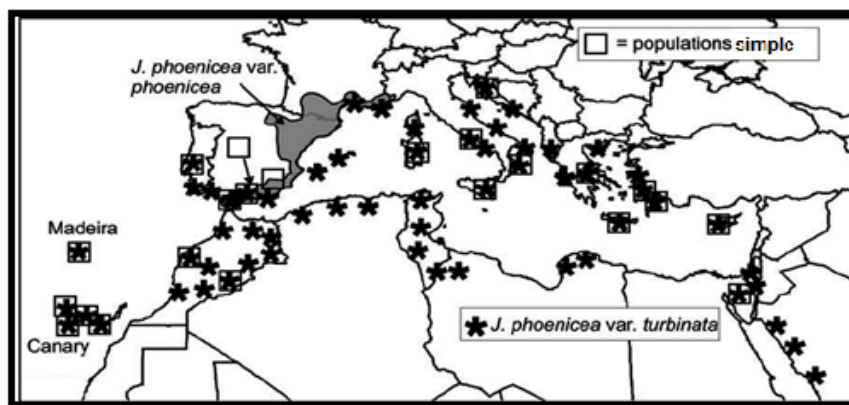




**Figure 12 :** Photo des feuilles et des fruits du “*Juniperus phoenicea L.*”.

### VI. 1. 2. Distribution géographique :

Le “*J. phoenicea L.*” est distribué dans toute la région méditerranéenne où il pousse dans les endroits rocailleux : Algérie, Tunisie, Maroc, Libye, France, Italie, Espagne, Turquie, Grèce, Albanie, Égypte (Sinai), Chypre, et au Liban. Il pousse également en Roumanie, Portugal, Allemagne, Andorre, Bulgarie, Bosnie, Croatie, Jordanie, Arabie Saoudite (le long de la mer Rouge), et au Macaronésie (Iles Canaries et de Madère Arquipelago) comme le montre la figure 13 [27].



**Figure 13 :** Carte chronologique pour la distribution de *Juniperus phoenicea L.*

## VI.2 . Le “*Juniperus oxycedrus L.*” :

### VI. 2. 1. Description botanique:

Le genévrier oxycède ou genévrier cade “*Juniperus oxycedrus.L*” est l'une des espèces les plus répandues du genre, ce petit arbre qui peut néanmoins atteindre 1 à 8 mètres de hauteur est peu exigeant pour le sol.

Comme le montre la figure 14, son aspect rappelle le genévrier commun mais il s'en distingue facilement par ses fruits brun rougeâtres et non bleuâtres.

Comme le genévrier de Phénicie, il colonise également les dunes littorales où il est représenté par un type particulier à gros fruits <sup>[28]</sup>.

C'est un arbrisseau ou arbuste dressé, à bourgeons écailleux, à ramules obtusément triangulaires. Ses feuilles sont très étalées, verticillées par 3 et disposées sur 6 rangs, toutes linéaires en alêne à pointe fine et piquante, articulées, non décurrentes, marquées de 2 sillons blanchâtres séparées par la nervure médiane en dessus, à carène obtuse et non sillonnées en dessous.

Ses fleurs dioïques et ses fruits sont rouges et luisants à la maturité, sub-globuleux, assez gros (8-10 mm), dépassés ou égalés par les feuilles variant à des fruits plus gros, ovoïdes (figure 15) <sup>[25]</sup>.



**Figure 14** : Photo de l'arbre “*Juniperus oxycedrus L.*”.

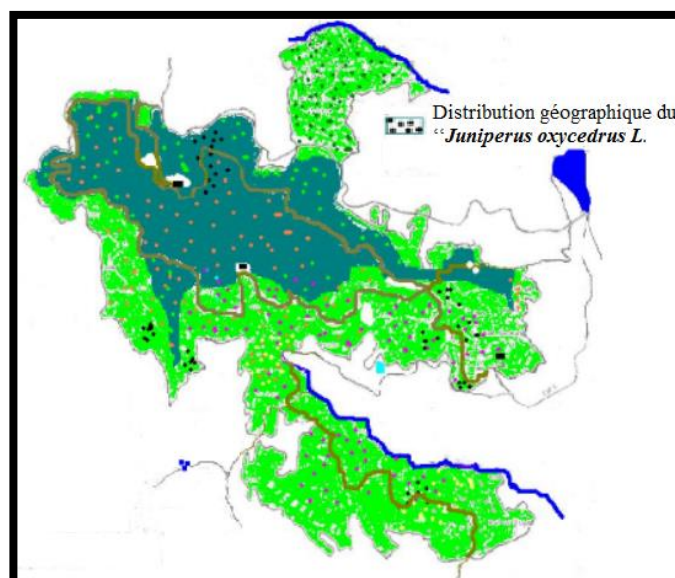


**Figure 15 :** Photo des feuilles et des fruits du “*Juniperus oxycedrus L.*”.

### VI. 2. 2. Distribution géographique :

C’est une espèce typique commune en Afrique du nord, depuis le bord de la mer jusque vers 2000-2200 m d’altitude. Caractéristique de la région méditerranéenne où il représente un élément pionnier très dynamique, surtout en milieu forestier dégradé. On peut le rencontrer dans le Tell associé essentiellement au chêne vert, au chêne liège, voire au Pin d’Alep, et sur les massifs montagneux où il est partout présent et souvent abondant dans les chênaies.

Il s’observe surtout sur calcaires, aux étages méso et supra-méditerranéens, en bioclimat sur-humide, localement en bioclimat semi-aride où il arrive parfois à former des peuplements presque purs, notamment dans les vallées internes du Haut Atlas.



**Figure 16 :** Carte chronologique pour la distribution de *Juniperus oxycedrus L.* au parc national de Theniet el Had <sup>[29]</sup>.

### VI. 3 .Taxonomie :

Le tableau 1 regroupe la taxonomie des deux plantes étudiées : (Identification botanique faite par **Dr. S. Hioun**)

**Tableau 1 :** taxonomie du *Juniperus oxycedrus L.* et du *phoenicea L.*

<i>Juniperus Oxycedrus</i>		<i>Juniperus Phoenicea</i>	
Catégorie	Classement	Catégorie	Classement
Règne	Plantae	Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta	Sous règne	Trachiobionta
Devisions	Pinophyta	Devisions	Pinophyta
Classe	Pinopsida	Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales	Ordre	Pinales
Famille	Cupressaceae	Famille	Curpressaceae
Genre	<i>Juniperus</i>	Genre	<i>Juniperus</i>
Espèce	<i>Juniperus.Oxycedrus</i>	Espèce	<i>Juniperus.Phoenicea</i>
Sous-espèce	<i>Oxycedrus (lycea)</i>	Sous-espèce	<i>Phoenicea L.(lycea)</i>

### **VII. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE :**

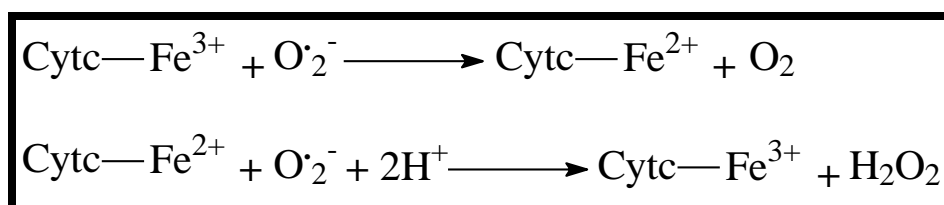
Les radicaux libres sont formés en permanence lors de la respiration et de certaines étapes du métabolisme oxydatif. Les recherches menées ces dernières années montrent qu'ils sont impliqués dans la majorité des maladies de notre époque : cancer, maladies cardio-vasculaires, dégénérescence neuronale... et dans le vieillissement.

Dans le tableau 2, on trouve quelques exemples de maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués.

**Tableau 2 :** Quelques maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués.

Organe	Pathologie
Tous	Cancer Tous désordres inflammatoires Vieillessement Maladies auto-immunes
Cerveau	Dégénérescences : maladie de Parkinson, sclérose amyotrophique latérale, maladie d'Alzheimer,
Yeux	Cataracte, dommages dégénératifs de la rétine
Fois	Alcoolisme. cirrhose
Système Circulatoire	Athérosclérose infarctus Cardiotoxicité de médicaments quinoniques Défauts des globules rouges (anémie de Fanconi, <i>malaria</i> ...

Sur le schéma 3 on illustre un exemple de certaines étapes du métabolisme oxydatif donnant la forme réduite de l'enzyme cytochrome c oxydase (Cyt c-Fe<sup>2+</sup>) de la chaîne respiratoire.

**Schème 2 :** Exemple d'étapes du métabolisme oxydatif.

Un deuxième exemple de métabolisme oxydatif qui est le stress oxydant. Lorsque les radicaux libres sont formés par une cellule, le potentiel redox intracellulaire augmente: c'est le stress oxydant du à la formation de radicaux OH et O<sub>2</sub>, du peroxyde d'hydrogène et du peroxyde nitrite la cellule possède des défenses contre ces entités car le stress oxydant est une réaction naturelle [30].

En raison des dangers multiples causés par ces radicaux libres, nous allons utiliser deux méthodes d'évaluation du pouvoir réducteur ou capteur de ces radicaux libres issu des différents extraits de nos plantes étudiées .

- [1] Azititou “HISTOIRE DES PLANTES MEDICINALES”, *wordpress, Santé & bien-être*, **2009**.
- [2] P. U. Unschuld, “Medecine chinois”, *Ed. Indigene, Montpellier*, **2001**, p.132.
- [3] M. Wichtl, R. Anton, “Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique”, 2<sup>ème</sup> éd., *M., XCVI*, **2003**, p.692.
- [4] P. Larousse, “Encyclopédie des plantes médicinales”, **2007**.
- [5] E. Laïs, “l’ABC d’aire des plantes aromatiques et médicinales”, *Edition Flammarion*, **2001**, p.119.
- [6] J.M. Pelt, “Les vertus des plantes”, *édition du Chêne Rodemack, France*, **2004**.
- [7] P. Delaveau, “Histoire et renouveau des plantes médicinales”, *Albin Michel, Paris*, **1982**, ISBN 2-276-01629-5, p.383.
- [8] L. Girre, “Nouveau guide des vieux remèdes naturels”, *Ouest-France, Rennes*, **1985**, ISBN 285882-860, p.314.
- [9] S. Berrada, “biochimie appliquée dans les filieressbssa”, *Les glucides Montpellier*, **2009**.
- [10] H. Beddiar, “Etude de *Juniperus Phoenicea L.* de la région de Tébessa : Composition chimique, Activités antioxydantes, et Activités microbiologiques, Mémoire de Master, *Université de Larbi-Tébessi Tébessa-Algérie*, **2016**.
- [11] G. Camus, “les acides aminés”, <http://planet-vie.ens.fr/content/les-acides-amines>, **2006**.
- [12] G. V. Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, “Membrane lipidiques”, *Nat Rev. Mol. Cell. Biol.*, 9(2):112-12, **2008**.
- [13] B. Marongiu, A. P. S. Porcedda, R. Casu, P. Pierucci, “Chemical composition of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Schinus molle L.*”, *Flavour and Fragrance Journal*, 19, **2004**, p.554–558.
- [14] K. Ghedira, “*Phytotherapy*”, *Volume 3, Issue 4*, **2005**, p.162-169.
- [15] S. Krief, “Métabolites secondaires des plantes et comportement animal”, *MNHN PARIS*, **2003**, p. 348.
- [16] S. Hamimed, “Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d’*Anacyclus pyrethrum L.*”, Mémoire de Magister, *Université de Mentouri-Constantine-Algérie*, **2009**.
- [17] J. C. Gagnautl, D. Bidet, M. Gaillard, J. Perronnet, “Stérols et stéroïdes”, *Paris*, **1997**, p.1-31.
- [18] P. Benveniste, “The Arabidopsis Book”, *American Society of Plant Biologists, Rockville*, vol. 1, **2002**, p.4.

- [19] K. Dehak, Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles "Terpénoïdes", Doctorat de chimie en analyse physicochimique et réactivité des espèces moléculaire, *Université KASDI Merbah-Ouargla*, **2013**.
- [20] T.W. Goodwin, *Biochem*, *123*, **1971**, p.293-329.
- [21] W. S. Judd, C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P. F. Stevens, "Botanique systématique : une perspective phylogénétique", *Iéreed, Boeck Université, Paris*, **2002**, p.383.
- [22] T. N. Kaipnazarov, K. K. Uteniyazov, Z. Saatov, *Institute of soil science and plant cultivation*, **2004**, p.82.
- [23] B. Naima, "Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de source thermale). Selection des souches et étude caractéristique des enzymes", Thèse de Doctorat, *Université de Constantine 1*, **2013**.
- [24] P. I. Penchev, "Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions", Thèse de Doctorat, *Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse*, **2010**.
- [25] N. Mansouri, B. Satrani, M. Ghanmi, L. ElGhadraoui, A. Aafi, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, *15(3)*, **2011**, p.415-424 .
- [26] K. Mazari, N. Bendinerad, C. Benkhechi, X. Fernandez, *Medicinal Plants Research*, *4(10)*, 2010, p.959-964.
- [27] H. J. Dorman, S. G. Deans, *J Appl Microbiol.*, *88(2)*, **2000**, p.308-316.
- [28] P. Quezel, M. Gast, "Genévrier", *Gabriel Camps dir., 20/Gauda-Girrei, Aix-en-Provence, Edi. sud*, (20), **1998**
- [29] T. Guetouache, A. Foudil, H. Manseur, "Mise à jour et inventaire du peuplement mammalien du Parc National de Theniet El Had", Mémoire d'ingénieur d'état en sciences biologiques, *Université Ibn-Khaldoun de Tiaret Algérie*, **2012**.
- [30] C. H-Levin, J. Bergès, C. S-Roselli "Chimie et biochimie radicalaire", *Broché*, **2005** .

# Matériels

et

# méthodes





Le genre botanique des genévriers du nom scientifique “*Juniperus*” de la famille des “*Cupressacées*”, d’origine africaine, asiatique, américaine et européenne, comporte un grand nombre d’espèces (approximativement 60) avec des variétés rigides et des variétés souples. Les feuilles persistantes, étroites, linéaires, épineuses ressemblant à des aiguilles et les fleurs donnent des fruits improprement qualifiés de bais, globuleux et charnus<sup>[1]</sup>.

Les feuilles et les fruits de plusieurs espèces de ce genre sont utilisés en médecine traditionnelle et leurs composés chimiques sont incorporés dans des préparations pharmaceutiques d’usage particulièrement antiseptique attribué à la présence d’huiles essentielles<sup>[2]</sup>.

Cet arbre ou arbrisseau peut atteindre généralement 4 à 15 m de hauteur dans la nature, et même 25 à 30 m pour certaines espèces. Il croit à l’état sauvage sur des terres arides, pierreuses sablonneuses exposées à la sécheresse supportant les sols pauvres (il est souvent associé aux coteaux calcaires en France). Certaines espèces de genévrier peuvent vivre plus de 1000 ans<sup>[1]</sup>.

Dans le contexte de recherche de nouveaux principes antimicrobiens et antioxydants naturels surtout que les oxydants quelques soit leurs origines constituent un très grave problème non seulement au niveau de la santé publique mais aussi au niveau de l’industrie agro-alimentaire, et en raison de la diversité des espèces de cette plante, son importance en médecine traditionnelle, en préparation pharmaceutique, sa robustesse, nous nous sommes intéressés à évaluer quelques propriétés de deux sous-espèces végétales à savoir :

- ✓ Le “*Juniperus phoenica Lycea*” noté : “*Juniperus phoenica L.*”,
- ✓ Le “*Juniperus oxycedrus Lycea*” noté : “*Juniperus oxycedrus L.*”.

Donc dans ce chapitre, deux axes ont été envisagés :

Le premier concerne l’extraction des composés phénoliques par différents solvants de polarité différente suivi par la quantification des teneurs de ces composés en flavonoïdes.

Pour le deuxième axe, nous nous sommes intéressés en premier lieu au pouvoir antioxydant des extraits des parties aériennes (feuilles et fruits) des plantes étudiées par deux méthodes à savoir :

- ✓ La méthode de réduction de fer qui présente une technique indicatrice de la présence des effets réductives de l’anion hexacyanoférate (III)  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  à l’anion hexacyanoférate (II)  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ <sup>[3]</sup>.
- ✓ La méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil). Le DPPH est largement employé pour évaluer le balayage de divers produits naturels et considéré

comme un composé modèle pour les radicaux libres produits dans la peroxydation lipidique [4].

En deuxième lieu, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne tenant compte de la toxicité des polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [5].

## I. MATÉRIELS :

### I. 1. Matériel végétal :

La collecte des plantes a été effectuée pendant sa période de floraison au mois d'Octobre 2016 pour le *Juniperus phoenicea L.* et en Avril 2017 pour le *Juniperus oxycedrus L.*, à une altitude de 1000 m au niveau de la wilaya de Tébessa (en face de la société NAFTAL-CLP sur la route nationale N°16-la route stratégique, comme illustré sur la figure 17).

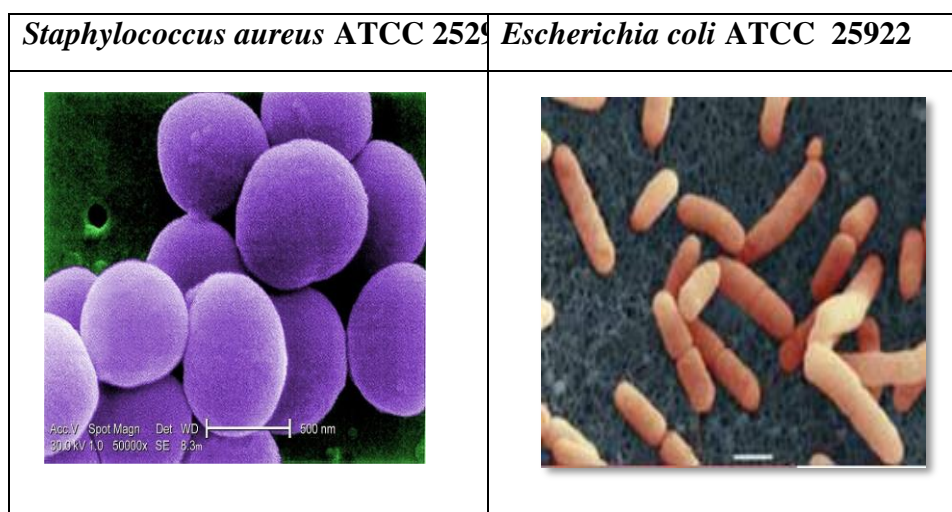
La récolte de la partie aérienne de la plante (fruits et feuilles) a été effectuée durant la matinée, puis séchée à l'ombre à température ambiante pendant 1 mois.



**Figure 17 :** Carte géographique de la zone de récolte.

### I. 2. Souches bactériennes testées :

Les souches bactériennes testées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne nous ont été fournies par M<sup>e</sup> M. Belhadj, enseignante à l'université Larbi Tébessi-Tébessa, ils ont été conservés à 4 °C dans des tubes à vis inclinée contenant de la gélose nutritive, leur pureté a été confirmée par la coloration de Gram.



## II. EXTRACTION DES POLYPHÉNOLS :

Après la détermination des différentes familles de composés présentés dans la plante étudiée, nous avons ciblés les familles qui sont prépondérantes dans cette dernière. Par conséquent, une extraction des deux sous-espèces de “*Juniperus*” selon des méthodes d’extractions sélectives a été élaborée, suivie par des analyses quantitatives et qualitatives des extraits.

L’extraction des polyphénols a été effectuée par macération à froid dans 500 mL d’un mélange méthanol-eau (70:30) pendant 24 heures, 100 g de la poudre de la matière végétale broyée. Les filtrats obtenus ont été évaporés à pression réduite à 50 °C. Le schéma 2 illustre le protocole opératoire ainsi que les différents solvants employés pour l’obtention des différents extraits recherchés.

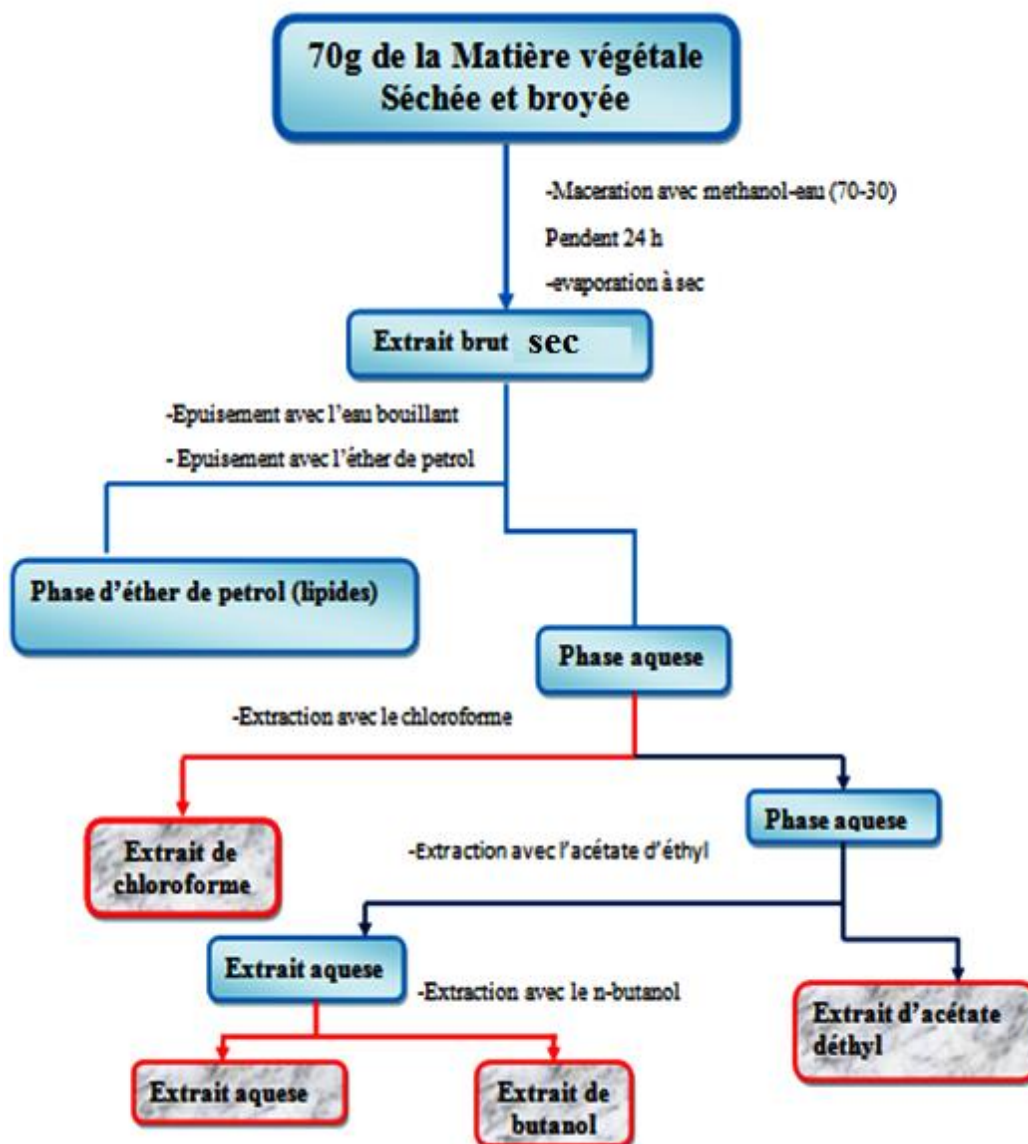


Schéma 3 : Les étapes de fractionnement des polyphénols <sup>[6]</sup>.

### III. TESTS PHYTOCHIMIQUES :

La révélation ou le “screening” des différentes classes de composés chimiques existants dans la plante est l'un des objectifs indispensables de l'examen phytochimique. Ceci constitue la première étape dans la recherche de molécules actives dans les plantes étudiées.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration, de précipitation et par des révélations en utilisant la lumière ultraviolette.

Dans notre travail et suivant la littérature <sup>[7]</sup>, nous avons exposé le matériel végétal aux différents voies de macérations. Les extraits utilisés pour les tests ont été obtenus après une ébullition à reflux pendant une heure, de 50 g du matériel végétal dans 300 mL de solvant, suivie d'une filtration du mélange.

### **III. 1. Macération à l'eau distillée :**

#### **III. 1. 1. Recherche d'amidons :**

Le test effectué consiste à chauffer 5 mL de l'extrait aqueux avec 10 mL d'une solution saturée de NaCl dans un bain-marie jusqu'à ébullition, puis y ajouter le réactif d'amidon.

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

#### **III. 1. 2. Recherche des saponosides :**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant 1,5 mL d'eau distillé à 2 mL de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Après 20 minutes la teneur en saponosides est évaluée.

- ✓ Pas de mousse = test négatif,
- ✓ Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif,
- ✓ Mousse de 1-2 cm = test positif,
- ✓ Mousse plus de 2 cm = test très positif.

#### **III. 1. 3. Recherche des tanins galliques :**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 mL de l'extrait aqueux 1 mL d'eau distillée et 1 à 2 gouttes de solution diluée de  $FeCl_3$ .

- ✓ L'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence des tanins galliques.

### **III. 2. Macération à l'éthanol :**

#### **III 2. 1. Recherche d'alcaloïdes (sels) :**

La détection de ces composés consiste à :

- ✓ Evaporer à sec 20 mL d'extrait éthanolique, puis ajouter 5 mL d'HCl (10 %) au résidu obtenu pour le chauffer ensuite dans un bain marie à 60 °C,
- ✓ Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de  $NH_4OH$  (10 %) jusqu'à attendre un pH = 9,
- ✓ Faire une extraction de la solution avec l'éther diéthylique, puis concentrer à sec.
- ✓ Dissoudre le résidu dans du HCl (2 %),
- ✓ Tester la présence des alcaloïdes par les réactifs de Mayer et de Wagner,
- ✓ La formation d'un précipité blanc et d'un précipité brun respectivement avec ces réactifs indique la présence des alcaloïdes.

### **III. 2. 2. Recherche des flavonoïdes :**

La recherche des flavonoïdes est effectuée par un traitement de 5 mL d'extrait éthanolique avec 1 mL d'HCl concentré et de 0,5 g de tournures de magnésium.

- ✓ La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes.

### **III. 2. 3. Recherche des tanins cathéchiqes :**

La présence des tanins est effectuée en ajoutant à 1 mL d'extrait éthanolique 2 mL d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution diluée de FeCl<sub>3</sub>. (1%)

- ✓ Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration verte ou bleu-vert.

### **III. 2. 4. Recherche des composés réducteurs :**

Leurs détections consistent à traiter 1 mL d'extrait éthanolique avec 2 mL d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling, puis chauffer le tous.

- ✓ Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.

### **III. 2. 5. Recherche des coumarines, anthracénosides et anthocyanosides :**

Pour évaluer l'existence de ces composés, il faudra suivre les étapes suivantes :

- ✓ Ajouter 15 mL d'HCl (10 %) à 25 mL d'extrait éthanolique,
- ✓ Porter l'ensemble à reflux pendant 30 minutes,
- ✓ Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 mL d'éther.

Les coumarines, les anthracénosides et les anthocyanosides seront détectées séparément :

#### **a) Les coumarines :**

Leur détection consiste à évaporer à sec 5 mL de la solution éthérique extraite, dissoudre le résidu obtenu dans 1 mL d'eau chaude, puis diviser le volume en deux parties. Prendre la moitié du volume comme témoin et ajouter à l'autre 0,5 mL de NH<sub>4</sub>OH (10 %), ensuite mettre deux tâches sur un papier filtre et les examiner sous la lumière UV.

- ✓ La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense.

#### **b) Les anthracénosides :**

La détection des anthracénosides est réalisée par le réactif de Borntrager, en traitant 8 mL de la solution extractive éthérique par ce dernier.

- ✓ Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangé-rouge au violet-pourpre.

**c) Les anthocyanosides :**

Le test effectué consiste à doser la solution aqueuse acide avec une solution de NaOH. S'il y a un virage de couleur en fonction du pH, la présence des anthocyanosides est confirmé.

- ✓ Si le  $\text{pH} < 3$ , la solution prend une coloration rouge,
- ✓ Si  $4 < \text{pH} < 6$ , la solution prend une coloration bleue.

**III. 2. 6. Recherche des stérols et stéroïdes :**

La révélation de ces composés suit le protocole opératoire si dessous :

- ✓ Evaporer à sec 10 mL d'extrait éthanolique,
- ✓ Traiter le résidu obtenu avec 10 mL de chloroforme anhydre puis filtrer le mélange,
- ✓ Mélanger 5 mL de la solution chloroformique avec 5 mL d'anhydride acétique,
- ✓ Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, agiter, puis laisser la solution reposer.
- ✓ Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée temporaire virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21 °C).

**III. 2. 7. Recherche d'hétérosides :**

La détection des hétérosides se fait comme suite :

- ✓ Evaporer 10 mL d'extrait éthanolique à sec,
- ✓ Dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 mL d'anhydride acétique et 0,5 mL de chloroforme, puis filtrer,
- ✓ Traiter le filtrat par la réaction de Liebermann-Burchardt.
- ✓ Si cette réaction donne une coloration verte bleue cela signifie la présence d'hétérosides stéroïdiques.
- ✓ Si cette réaction donne une coloration verte violette : présence d'hétérosides triterpéniques.

**III. 3. Macération à l'éther diéthylique :****III. 3. 1. Recherche des huiles volatiles :**

La détection des huiles volatiles consiste à évaporer à sec 20 mL de l'extrait éthérique, dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool puis concentrer à sec la solution alcoolique obtenue.

- ✓ Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu aromatique.

### III. 3. 2. Recherche d'acides gras :

L'essai effectué à la recherche des acides gras est le même que celui utilisé pour la recherche des huiles volatiles, seulement la solution alcoolique obtenu subiras un traitement avec une solution basique de soude ou de potasse, suivie d'un ajout de 2 mL d'eau distillé. Extraire la solution avec l'éther diéthylique et la concentrer à sec.

- ✓ Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

### III. 3. 3. Recherche d'alcaloïdes :

Le test effectué pour voir la présence des alcaloïdes consiste à évaporer à sec 10 mL de l'extrait éthérique, dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 mL d'HCl (2 %) puis ajouter 1 à 2 gouttes de réactif de Mayer.

La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes.

### III. 3. 4. Recherche des emodols :

La détection des émodols consiste à évaporer à sec 3 mL de l'extrait éthérique, dissoudre le résidu obtenu dans 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , concentré puis traiter la solution avec le réactif de Borntrâger.

- ✓ Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangé-rouge au violet pourpre.

## IV. DOSAGE DES FLAVONOÏDES :

Pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits obtenus de la plante on a utilisé la méthode colorimétrique décrite par (Djeridane *et al.*, 2006) et (Boudiaf, 2006). Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans les différents extraits <sup>[11]</sup>.

Cette méthode se résume dans le protocole opératoire ci-dessous :

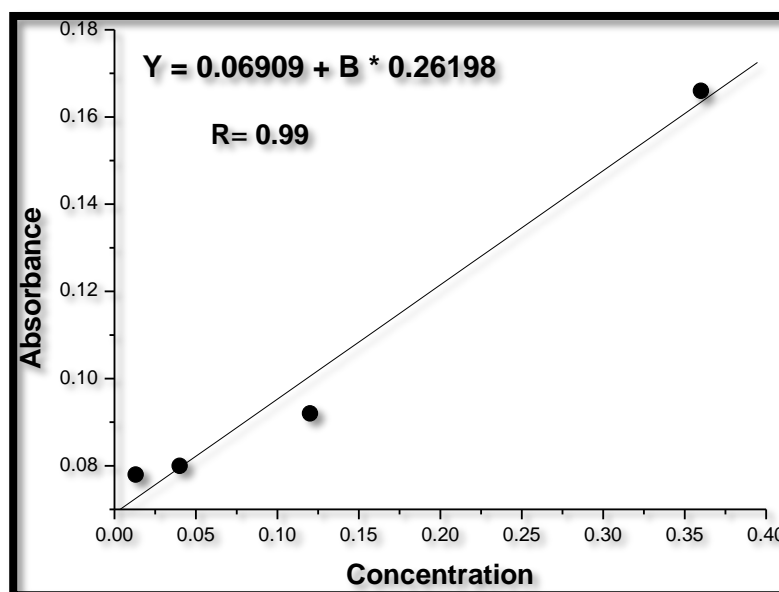
- ✓ A 1mL de chaque extrait (dissous dans le méthanol), avec différentes dilutions des phases convenables (la phase d'éther d'éthylique 0.16 mg/ml, phase d'acétate d'éthyle 0.06 mg/ml phase butanolique 0.02 mg/mL et la phase aqueuse 0.2 mg/mL),
- ✓ On ajoute un volume égal (1mL) d'une solution d' $\text{AlCl}_3$  2 % (dans le méthanol),
- ✓ Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 4.30 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.



**Courbe d'étalonnage :**

la Tamarixetine, considérée comme contrôle positif, a permis de réaliser une courbe d'étalonnage (figure 18) établie séparément avec une série de solution à différentes concentration (0,4 - 0,025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des plantes est exprimée en milligramme (mg) équivalents de Tamarixetine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g).



**Figure 18 :** Courbe d'étalonnage de la teneur en flavonoïdes de la Tamarixetine.

**V. Réduction du fer par la méthode de FRAP (ferric reducing antioxidant power) :**

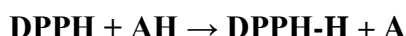
Cette méthode est basée sur la réaction de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en  $\text{Fe}^{2+}$ , la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en couleur bleu verte du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie UV-Vis une longueur d'onde de 700 nm.

Le protocole expérimental utilisé est celui de YILDIRIM, MAVI, et KARA [9] où : 0,5 mL de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 1,25 mL d'une solution tampon de phosphate à 0.2 M (pH = 6,6) et de 1,25 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. Le tout est incubé à 50° C pendant 20 min, puis refroidi à température ambiante. 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction, et les tubes sont centrifugés à 3000 pendant 10 min. 1,25 mL du surnageant sont ajoutés à 1,25 mL d'eau distillée et 250  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure de fer [ $\text{FeCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$ ] à 0,1 %.

La lecture des absorbances se fait à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV contre un blanc préalablement préparé de la même manière sauf qu'on remplace l'extrait de plante par de l'eau distillée.

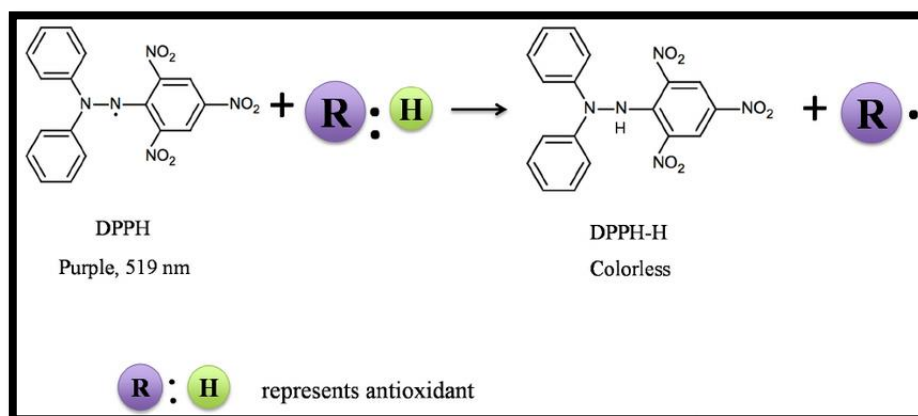
#### **VI. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :**

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits de plante <sup>[10]</sup>. Le DPPH initialement violet, se décolore lorsque l'électron libre s'apparie selon la réaction suivante :



où AH est un composé capable de donner un H<sup>+</sup> au radical DPPH (schème 4). Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres, loin de toutes activités enzymatiques.

Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante se transforme en DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm. Les réactions se passent en milieu méthanolique à température ambiante, cela permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé car il est rapide, facile et non couteux <sup>[11]</sup>.



**Schème 4.** Principe de piégeage des radicaux libres de DPPH.

Cette méthode est réalisée par un test anti-radicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre UV selon le protocole décrit dans la littérature. On introduit 3 mL d'une solution méthanolique de DPPH (0,037 mg/ml) dans un tube à essai sec et stérile. 100 µL de solutions des extraits sont ajoutés et le mélange est vigoureusement agité pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex. Après une incubation de 30 mn à température ambiante et à l'abri de la lumière,

les absorbances sont mesurées à 517 nm contre un blanc qui contient 100 µL de méthanol et 3 ml de solution DPPH [9].

### **VI. 1. Méthode de calcul :**

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left( \frac{\text{Abs 1} - \text{Abs 2}}{\text{Abs 1}} \right) \times 100$$

**Abs 1** : Absorbance du contrôle.

**Abs 2** : Absorbance de l'extrait.

Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs.

## **VII. DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES (DIFFUSION EN MILIEU MULLER HINTON) :**

### **VII. 1. Principe :**

Les diamètres des zones d'inhibitions de la prolifération bactérienne (**DZI**) ont été déterminés in vitro après des testes effectués sur deux bactéries, selon la méthode de diffusion en milieu solide à travers des disques de papier Wattman déposés sur la gélose de Mueller-Hinton (**MH**) et des puits creusés dans le même milieu gélose, suivant la description de la littérature [12].

### **VII. 2. Préparation des inoculums :**

#### **VII. 2. 1. Préparation de la suspension bactérienne :**

La préparation des suspensions pour les souches bactériennes ATCC a été faite comme suite : un enrichissement de 500 µL de bactéries contenues dans le bouillon nutritif (**BN**) et 5 mL d'eau physiologique stérile pendant 4 heures à température ambiante révèle une turbidité élevée de ces bactéries.

#### **VII. 2. 2. Enrichissement :**

Deux colonies bien séparées et uniformes des espèces bactériennes concernées ont été prélevés, à l'aide d'une anse en platine pour être homogénéisées avec 5 mL de **BN** (25 g de BN dans un litre d'eau distillée stérile).

#### **VII. 2. 3. Ensemencement test antibactérien :**

Mettre 13 mL de gélose MH dans chaque boîte de pétri (épaisseur de la couche 5 mm) stérilisé préalablement à l'aide d'un bec benzène et laisser sécher à température ambiante pendant 15 mn. A l'aide d'un écouvillon stérile, ensemençer sous forme de stries serrées la bactérie soumise

à l'étude (dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois).

Inonder la surface de la gélose avec 1 mL de la suspension bactérienne et laisser reposer 15 mn à température ambiante, puis éliminer l'excès de la suspension bactérienne (méthode d'écouvillonnage plus inondation). L'ensemencement peut être réalisé par écouvillonnage seulement.

Creuser trois puits (6 mm de diamètre) dans chaque boîte à l'aide d'une pipette pasteur stérile et déposer trois disques de papier Wattman dans la même boîte. Introduire 15 µL de la solution d'extrait étudié (préparé préalablement avec une concentration de 10 mg/mL) dans les puits et verser le même volume de la solution d'extrait sur les disques.

Mettre les boîtes de pétris à 4°C pendant deux heures pour la pré-diffusion et incuber dans l'étuve pendant 24-48 heures à 37° C.

**Remarque :**

La paillasse de travail ainsi que les mains du manipulateur doivent être nettoyées préalablement à l'alcool. Quant aux manipulations elles sont effectuées autour de la flamme du bec benzène.

**VII. 2. 4. Lecture :**

L'apparition d'une zone claire autour des puits et des disques (à l'intérieur desquels aucune croissance bactérienne n'est observée) indique l'action antibactérienne de l'extrait de la plante vis-à-vis la souche bactérienne testée.

Les diamètres de la zone claire sont mesurés à l'aide d'une règle graduée, et les résultats obtenus sont exprimés en millimètre.

Les bactéries seront classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des catégories suivantes : résistance, sensibilité limitée, sensibilité moyenne et très sensible comme le montre le tableau 3 <sup>[13]</sup>.

**Tableau 3 :** Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition.

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Degré de sensibilité des germes	Résultat
$X \leq 8 \text{ mm}$	Résistante	-
$8 \text{ mm} < X < 14 \text{ mm}$	Sensibilité limitée	+
$14 \text{ mm} < X < 20 \text{ mm}$	Sensibilité moyenne	++
$X \geq 20 \text{ mm}$	Très sensible	+++

- [1] N. Mansouri, B. Satrani, M. Ghanmi, L. ElGhadraoui, A. Aafi, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **15**(3), **2011**, p.415-424.
- [2] F. Djenadi, “Contribution à l’étude de l’activité antimicrobienne du genévrier «*Juniperus phoenicea*» : essai des huiles essentielles et composés phénoliques”, Mémoire de master, Université A Mira de Béjaia Algérie, **2011**.
- [3] I. C. F. R. Ferreira, P. Baptista, M. V. Boas, L. Barros, *Food Chemistry*, **100**, **2007**, p.1511-1516.
- [4] M. Sanchez, J. A. Larrauri, F. S. Calixto, *J. Sci. Food Agric.*, **76**, **1998**, p.270-276.
- [5] K. Mazari, N. Bendinerad, C. Benkhechi, X. Fernandez, *Medicinal Plants Research*, **4**(10), **2010**, p.959-964.
- [6] D. Messadia, “Evaluation de l'activité antioxydante de *Juniperus phoenicea*”, Mémoire de Master, *Université de Larbi-Tébessi Tébessa-Algérie*, **2015**.
- [7] K. Mazari, N. Bendinerad, C. Benkhechi, X. Fernandez, *Medicinal Plants Research*, **4**(10), **2010**, p.959-964.
- [8] N-E. Boukri, “Contribution à l’étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout”, Mémoire de Master, *Université KASDI MERBAH Ouargla- Algérie*, **2014**.
- [9] A. Yildirim, A. Mavi, A. A. Kara, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, **2001**, p.411-420.
- [10] C. Wu, M. Huang, Y. Lin, H. Ju, H. Ching, *Food Chem.*, **104**, **2007**, p.1464-1471.
- [11] Z. Hadbaoui, “Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, proteiques et phenoliques de sorgho et de mil locaux”, Thèse de Doctorat, *Université Kasdi Merbah Ouargla-Algérie*, **2012**.
- [12] M. M. Kechkar, “Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne”, Mémoire du Magister, *Universite Mentouri-Constantine*, **2008**.
- [13] C. Duraffourd, J. C. Lapraz, “Traité de phytothérapie clinique”, *Midecine et Endobioginie, Paris, Masson*, **2002**.

# RÉSULTATS

et

# DISCUSSION



## I. EXTRACTION :

Après épuisement des deux sous-espèces de “*Juniperus*”, l’extraction des feuilles et des fruits par des solvants de polarités croissantes a permis d’obtenir en plus de l’extrait brut cinq autres extraits différents : etherique (EP), chloroformique (CF), celui d’acétate d’éthyle (AcEt), butanolique (But), et l’extrait aqueux (AQ).

Ces extraits ont été obtenus suivant le schéma d’extraction décrit dans le chapitre II, pour effectuer les testes phytochimique, les testes désignés à la recherche des différents types de flavonoïdes (aglycones, triglycosides, glycosylés..) existant dans les deux plantes étudiés et pour l’évaluation de leurs activités antioxydantes et antibactériennes.

### ➤ Rendements des extraits phénoliques :

Les rendements des vingt quatre extraits obtenus sont exprimés en pourcentage de masse d’extrait par rapport à la masse de matière végétale sèche. Ces rendements sont regroupés dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Rendement d’extraction des extraits phénoliques.

Partie Phase	<i>Juniperus oxycedrus</i>		<i>Juniperus phoenicea</i>	
	Feuilles	Fruits	Feuilles	Fruits
<b>Brute</b>	14.22 %	9.11%	11.72%	7.55%
<b>Ether de pétrole</b>	0.73 %	0.26%	1.12%	0.48%
<b>Chloroforme</b>	0.66 %	1.87%	1.33%	0.46%
<b>Acétate d’éthyle</b>	4.31 %	0.53%	1.52%	0.32%
<b>n-butanol</b>	6.71 %	0.32%	0.64%	1.80%
<b>Aqueuse</b>	1.75 %	1.40%	2.59%	0.16%

Les rendements les plus élevés ont été observés avec l’extrait méthanolique pour les deux sous espèces étudiés avec 14.22 % (feuilles) et 9.11 % (fruits) pour le *J. phoenicea*, et 11.72 % (feuilles) et 7.55 % (fruits) pour le *J. oxycedrus*, alors que les autres phases extraites ont été obtenus avec des rendements modérés.

Notons bien que la quantité des polyphénols en extraits secs varie en fonction des paramètres d’extraction de ces composés, des solvants d’extraction utilisés, du coefficient de diffusion du solvant, des répétitions d’épuisement, comme elle varie d’une plante à une autre de la même famille.



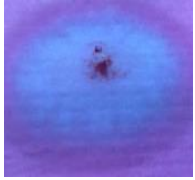
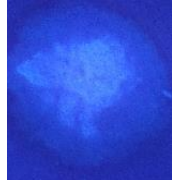
Cependant ce qu’on remarqué globalement c’est que les rendements d’extraits du *Juniperus oxycedrus* était plus élevés que ceux du *Juniperus phoenicea*.

## II. RÉVÉLATION PHYTOCHIMIQUE (SCREENING) :





L'étude phytochimique des deux plantes investigués "*Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus*" a été basée sur des tests effectués au laboratoire, ce qui nous a permis de faire une caractérisation primaire des différentes familles de composés chimiques contenues dans ces plantes.

Les résultats des essais réalisés sur les deux parties (feuille et fruits) de la sous-espèce "*Juniperus phoenicea*" sont regroupés dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** Résultat des tests phytochimiques effectués sur les extraits des feuilles et des fruits du "*Juniperus phoenicea*".

Famille des composés	Etat de test	Feuilles	Fruits	Résultat final
<b>Alcaloïdes bases</b>	-	/	/	<b>Absence</b>
<b>Alcaloïdes sels</b>	-	/	/	
<b>Amidons</b>	-	/	/	
<b>Anthracénosides</b>	-	/	/	
<b>Composés réducteurs</b>	-	/	/	
<b>Emodols</b>	-	/	/	
<b>Saponosides</b>	-	/	/	
<b>Acides gras</b>	+			<b>Présence</b>
<b>Coumarines</b>	+++			








<b>Flavonoïdes</b>	+++		
<b>Hétérosides terpéniques</b>	+		
<b>Huiles volatiles</b>	++	/	/
<b>Stérols et stéroïdes</b>	++		<b>Présence</b>
<b>Tanins</b>	+++		

Test négatif (-), test positif (+), test faiblement positif (++), test fortement positif (+++).

Les résultats des essais réalisés sur les deux parties (feuille et fruits) de la sous-espèce “*Juniperus oxycedrus*” sont regroupés dans les tableaux 6 et 7 respectivement.






**Tableau 6 :** Résultat des tests phytochimiques effectués sur les extrais des feuilles du “*Juniperus oxycedrus*”.




Famille des composés	Etat de test	Feuilles	Résultat final
<b>Alcaloïdes bases</b>	-	/	<b>Absence</b>
<b>Alcaloïdes sels</b>	-	/	
<b>Amidons</b>	-	/	
<b>Anthracénosides</b>	+	/	<b>Présence</b>
<b>Composés réducteurs</b>	+	/	
<b>Emodols</b>	-	/	<b>Absence</b>
<b>Saponosides</b>	-	/	
<b>Acides gras</b>	+		<b>Présence</b>
<b>Coumarines</b>	+++		
<b>Flavonoïdes</b>	+++		

<b>Hétérosides terpéniques</b>	+		<b>Présence</b>
<b>Huiles volatiles</b>	++	/	
<b>Stérols et stéroïdes</b>	++		
<b>Tanins</b>	+++		

**Tableau 7 :** Résultat des tests phytochimiques effectués sur les extraits des fruits du “*Juniperus oxycedrus*”.

Famille des composés	Etat de test	Fruits	Résultat final
<b>Alcaloïdes bases</b>	-	/	<b>Absence</b>
<b>Alcaloïdes sels</b>	-	/	
<b>Amidons</b>	+	/	<b>Présence</b>

<b>Anthracénosides</b>	+		<b>Présence</b>
<b>Composés réducteurs</b>	+		
<b>Emodols</b>	-	/	<b>Absence</b>
<b>Saponosides</b>	-	/	
<b>Acides gras</b>	+		
<b>Coumarines</b>	+++		<b>Présence</b>
<b>Flavonoïdes</b>	+++		

<b>Hétérosides terpéniques</b>	+		<b>Présence</b>
<b>Huiles volatiles</b>	++	/	
<b>Stérols et stéroïdes</b>	++		
<b>Tanins</b>	+++		

D'après ces testes primaires de dépistage, on distingue quelques différences entre les deux sous-espèces étudiées dans l'absence et la présence de quelques familles de composés.

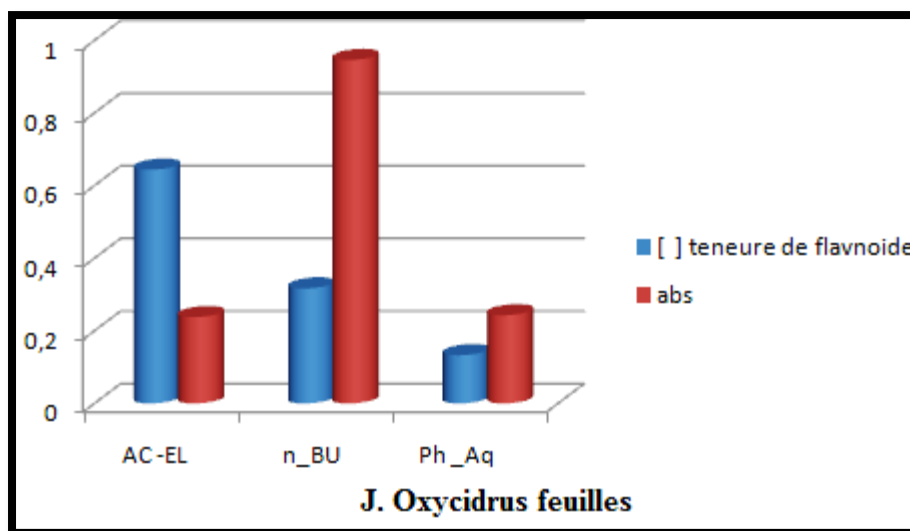
Par exemple : les anthracénosides existent dans les extraits des feuilles et des fruits du *Juniperus oxycedrus* tandis qu'ils sont absents dans les extraits des feuilles et des fruits du *Juniperus phoenicea*.

### III. ÉVALUATION QUANTITATIVE DES FLAVONOÏDES DANS LES EXTRAITS :

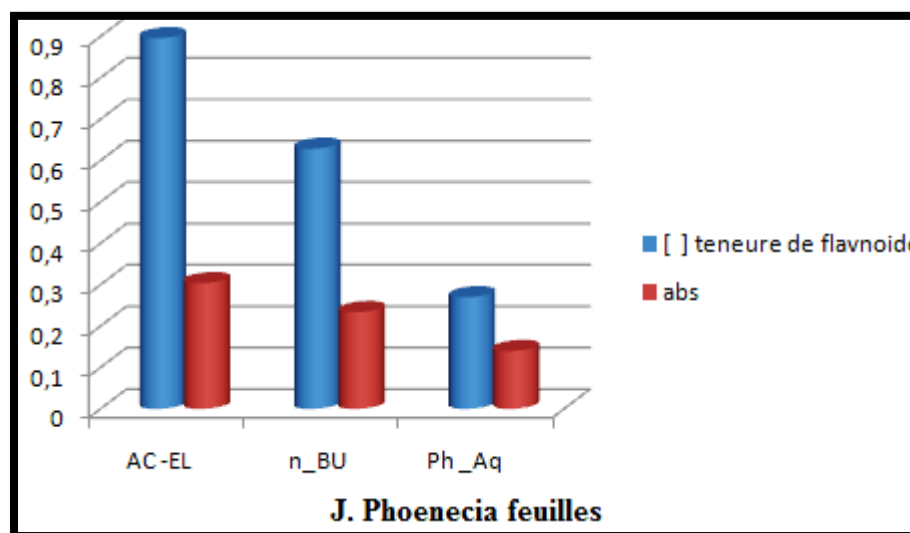
Les teneurs en composés flavonoïdes contenus dans les trois extraits : acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux des deux plantes étudiées, ont été appréciées grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec un extrait de référence (la Tamarixetine avec les mêmes concentrations utilisées pour les extraits étudiés).

Selon l'histogramme illustré sur la figure 19, présentant les résultats du dosage de flavonoïde des extraits des feuilles du *J. oxycedrus*, on distingue bien que la concentration en flavonoïde la plus élevée était dans l'extrait n-butanol avec 46 %, suivi de la phase d'acétate d'éthyle avec 35 % puis de la phase aqueuse avec 19 %.

Cependant, pour les extraits des feuilles de l'autre sous-espèce *J.phoenicea*, les résultats de ce dosage révèlent la concentration en flavonoïde la plus élevée dans l'extrait d'acétate d'éthyle avec 45 %, le n-butanol contient 34 %, et comme pour l'autre sous-espèce la phase aqueuse a montrée la teneur en flavonoïdes la plus basse avec 21 % (figure 20).



**Figure19** : Histogramme représentatif de la teneur en flavonoïdes des feuilles du “*J. oxycedrus*”.



**Figure 20** : Histogramme représentatif de la teneur en flavonoïdes des feuilles du “*J. phoenicea*”.

L'évaluation de la teneur en flavonoïde des extraits des fruits pour les deux sous-espèces étudiées “*J. oxycedrus* et *J. phoenicea*” n'a pas exhiber une grande différence. Comme illustré sur les figures 21 et 22, la concentration en flavonoïde la plus élevée était dans l'extrait d'acétate d'éthyle avec 51 % du pour le *J. oxycedrus* et 57 % pour le *J. phoenicea*, suivi des extraits butanolique puis de ceux de la phase aqueuse.

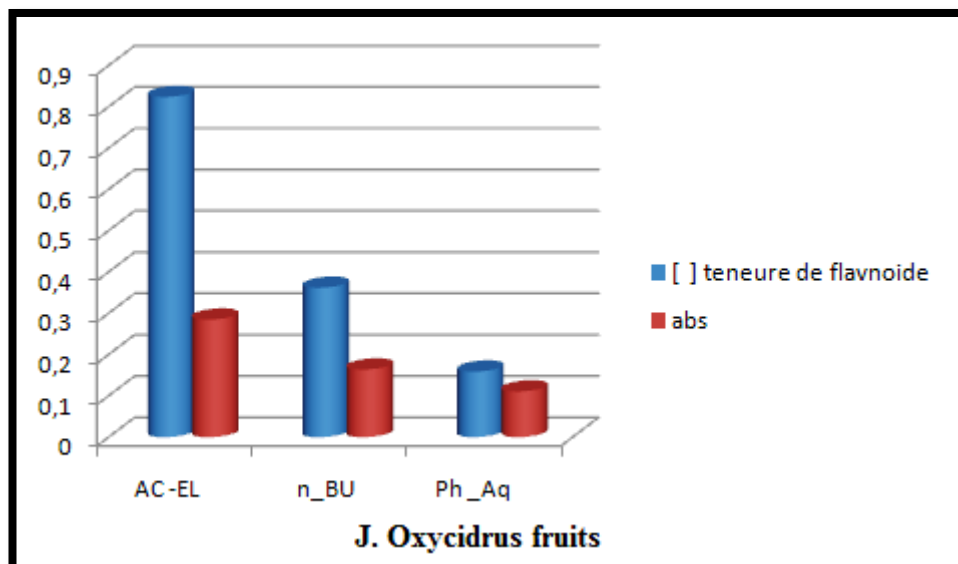


Figure 21 : Histogramme représentatif de la teneur en flavonoïdes des fruits du “*J. oxycedrus*”.

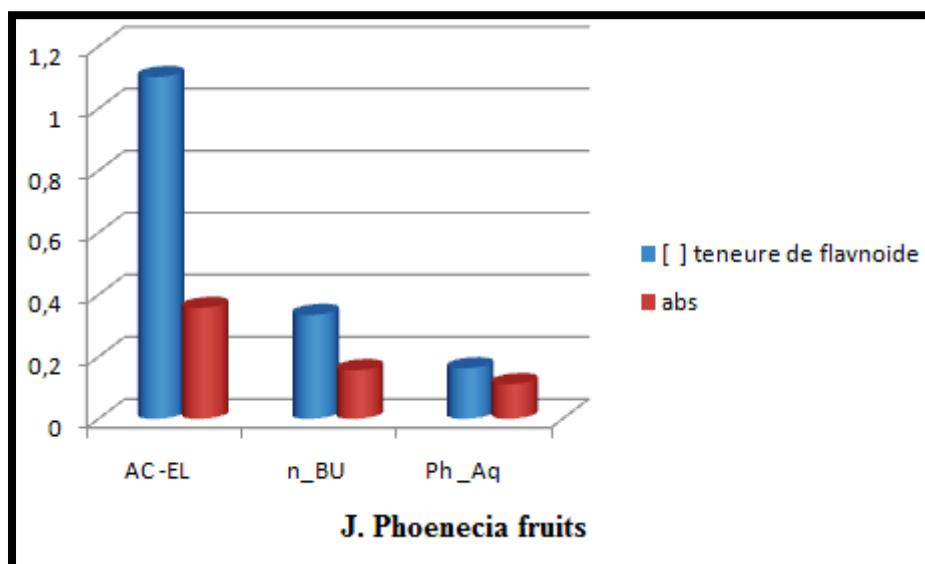


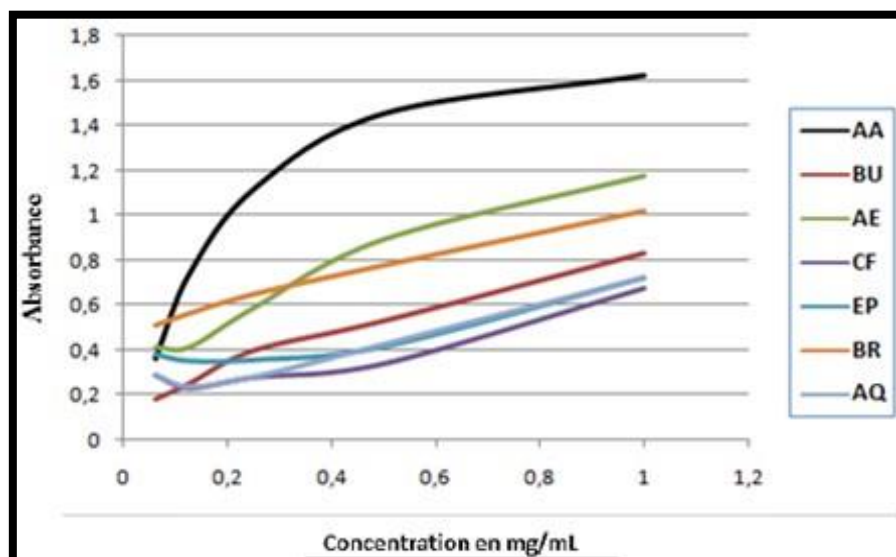
Figure 22 : Histogramme représentatif de la teneur en flavonoïdes des fruits du “*J. phoenicea*”.

#### IV. RÉSULTATS D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES :

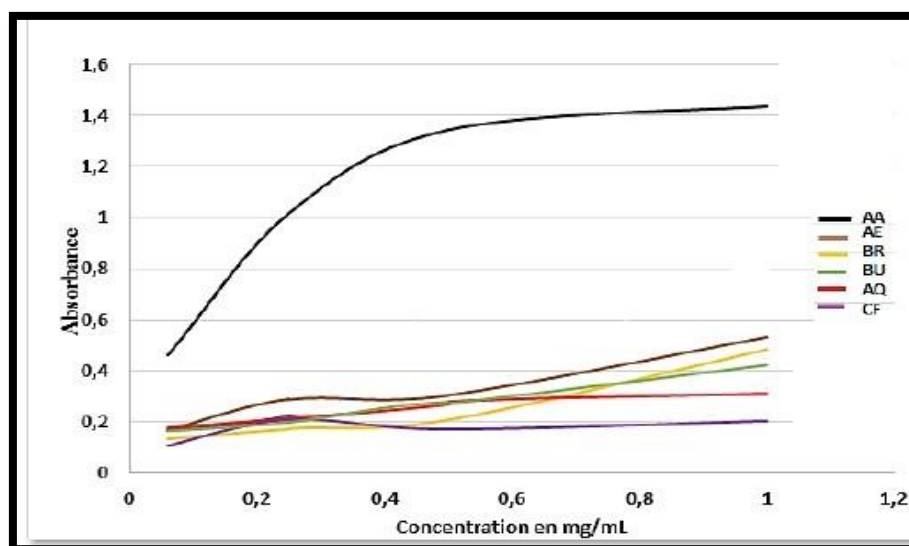
##### IV. 1. Réduction de fer (FRAP):

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction du fer est une méthode couramment utilisée pour distinguer les phases qui comportent plus d'activités antioxydantes, les pouvoirs réducteurs des solutions des différents extrais ont été mesurés par un spectrophotomètre UV-Visible à 700 nm. Ces mesures ont été réalisées systématiquement en triplicata pour chaque échantillon.

Les résultats obtenus pour les extraits de feuilles du *Juniperus oxycedrus* et du *J. phoenicea* sont exposés dans les figures 23 et 24 respectivement.



**Figure 23 :** Pouvoir réducteur des extraits des feuilles du “*Juniperus oxycedrus*” en comparaison avec celui de l’acide ascorbique.



**Figure 24 :** Pouvoir réducteur des extraits des feuilles du “*Juniperus phoenicea*” en comparaison avec celui de l’acide ascorbique.

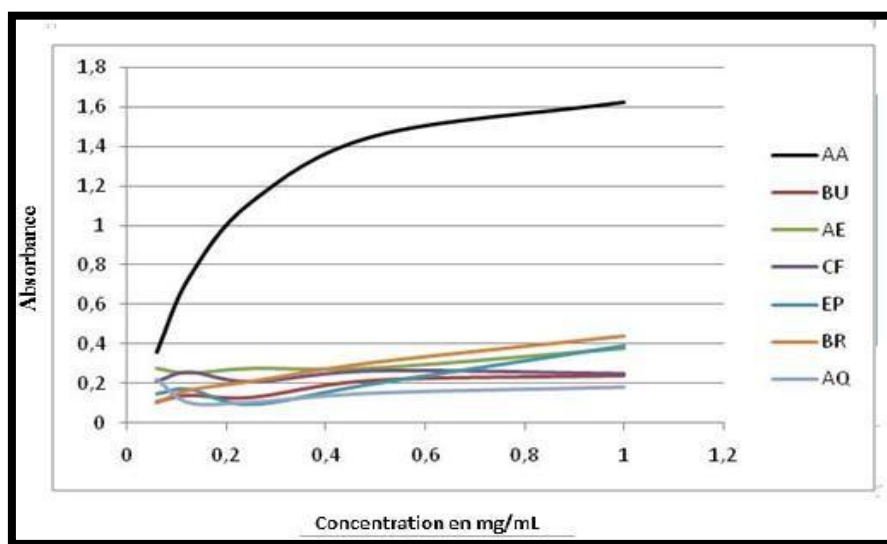
D’après les résultats obtenus et comme les montrent les deux graphes, on a constaté que :

- ✓ Les douz extraits présentent une diminution proportionnelle de la réduction du fer par rapport aux concentrations utilisées.
- ✓ Les extrait du “*Juniperus oxycedrus*” ont montrés un pouvoir réducteur du fer nettement plus important que ceux du “*Juniperus phoenicea*”.
- ✓ L’écart entre ce pouvoir pour l’acide ascorbique et les extrait du “*Juniperus oxycedrus*” était moins important que celui du “*Juniperus phoenicea*”.

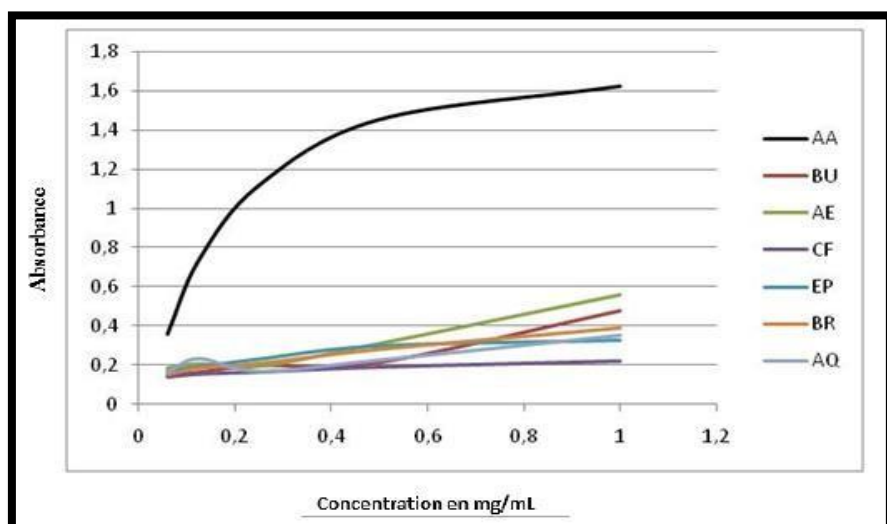


- ✓ Pour les extraits de feuilles des deux sous-espèces, le pouvoir de réduction de l'extrait d'acétate d'éthyle a été le plus actif suivi par l'extrait méthanolique puis l'extrait butanolique. Pour le reste des extraits ils ont été moyennement actifs par rapport aux extraits précédents.

En ce qui concerne les résultats obtenus pour les extraits de fruits des deux sous-espèces étudiées, les figures 25 et 26 les illustre respectivement.



**Figure 25 :** Pouvoir réducteur des extraits des fruits du “*Juniperus oxycedrus*” en comparaison avec celui de l'acide ascorbique.



**Figure 26 :** Pouvoir réducteur des extraits des fruits du “*Juniperus phoenicea*” en comparaison avec celui de l'acide ascorbique.

Comme on le remarque sur les deux graphes, pour les fruits les résultats étaient presque identiques pour les deux sous-espèces mais moins importants que ceux relevés pour les extraits de feuilles.

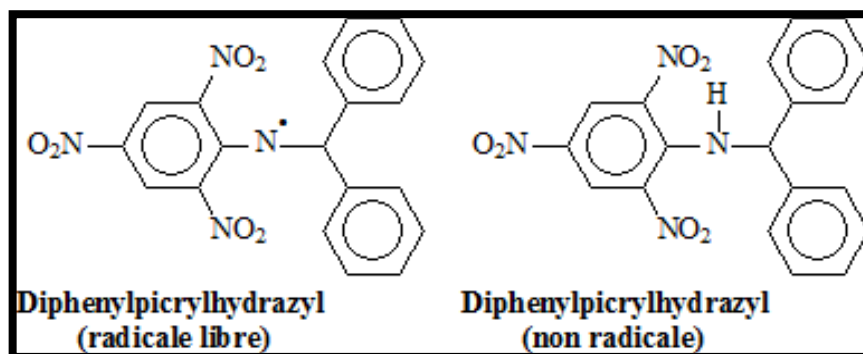
On a constaté que :

- ✓ Là aussi les douz extraits présentent une diminution proportionnelle de la réduction du fer par rapport aux concentrations utilisées.
- ✓ Le rôle s'est inversé pour les extraits des fruits : le "*Juniperus oxycedrus*" a montré un pouvoir réducteur du fer moins important que celui du "*Juniperus phoenicea*".
- ✓ Pour les fruits l'écart entre le pouvoir réducteur du fer pour l'acide ascorbique et celui des extraits des deux sous-espèces était important
- ✓ L'extrait méthanolique du "*Juniperus oxycedrus*" a montré le pouvoir réducteur le plus actif, tandis que pour le "*Juniperus phoenicea*" l'extrait d'acétate d'éthyle a présenté la plus grande efficacité de réduction du fer.

#### IV. 2. Piégeage du radical libre DPPH :

Nous avons employé une deuxième méthode pour évaluer le pouvoir antioxydant de nos différents extraits de plantes qui est la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

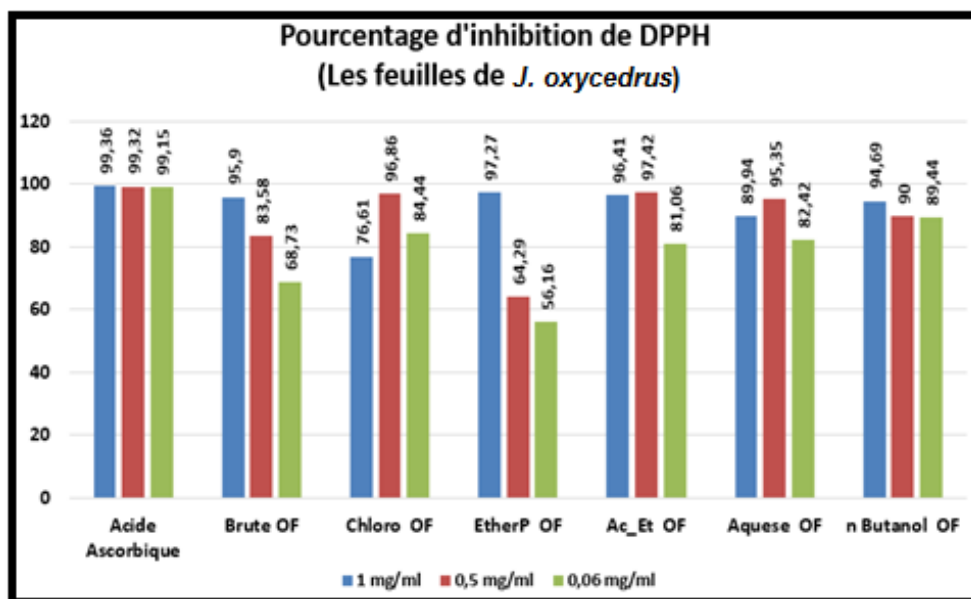
La figure 27 illustre les formes radicalaire et réduite de la molécule "Diphénylpicrylhydrazyl-DPPH", lorsque ce radical est libre : il est stable et possède une couleur violette foncée, tandis que lorsqu'il est réduit, sa coloration devient jaune pâle.



**Figure 27 :** Forme libre et réduite de la molécule DPPH.

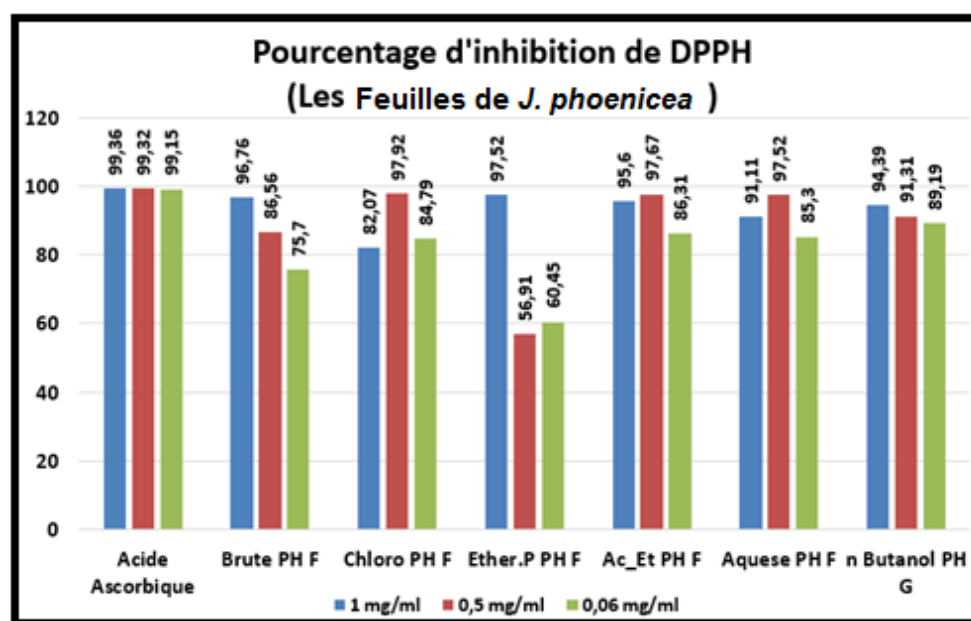
Les résultats obtenus à partir des trois concentrations que nous avons testés (1 mg/mL, 0.1 mg/mL et 0.06 mg/mL) sur tous les extraits des deux plantes étudiés ont présentés des pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH relativement élevés et significatifs en comparaison avec l'acide ascorbique. Ces mesures ont été réalisées systématiquement en duplicata pour chaque échantillon.

Ces résultats sont illustrés sur les figures 28 et 29 pour les extraits de feuilles des deux sous-espèces et sur les figures 30 et 31 pour les extraits de leurs fruits.



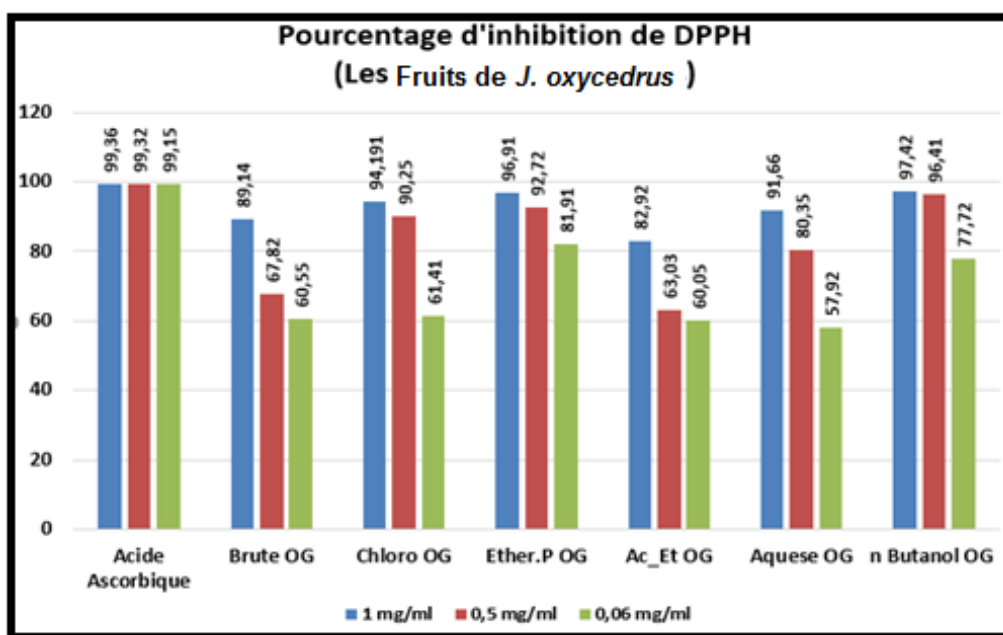
**Figure 28 :** Pourcentage d’inhibition du radicale libre DPPH par les extraits des feuilles du “*J. oxycedrus*”.

Comme on le voit sur l’histogramme représentatif du pourcentage d’inhibition du radical libre DPPH par les extraits des feuilles du “*J. Oxycedrus*”, la plus grande concentration en extrait à (1mg/mL) a réalisé globalement l’inhibition la plus intéressante tandis qu’elle a varié d’un extrait à l’autre pour les deux autres concentrations.

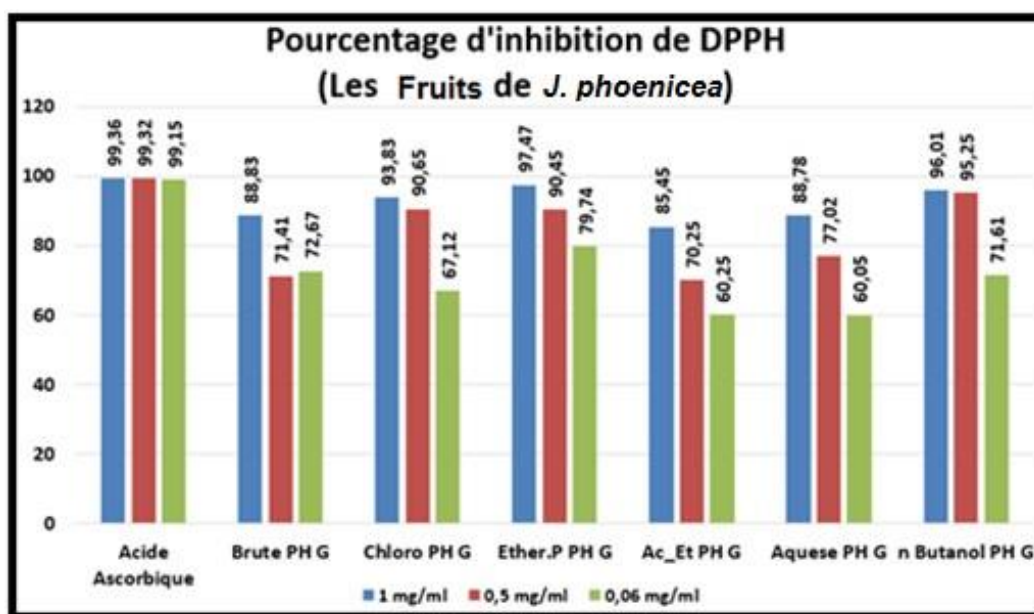


**Figure 29 :** Pourcentage d’inhibition du radical libre DPPH par les extraits des feuilles du “*J. phoenicea*”.

Concernant les extraits des feuilles de “*J. phoenicea*” et des fruits du “*J. oxycedrus*”, nous avons constaté qu’ils ont présentés presque le même pouvoir d’inhibition qui est généralement modéré vis-à-vis les différents et les différentes concentrations.



**Figure 30 :** Pourcentage d’inhibition du radicale libre DPPH par les extraits des fruits du “*J. oxycedrus*”



**Figure 31 :** Pourcentage d’inhibition du radicale libre DPPH par les extraits des fruits du “*J. phoenicea*”.

L'histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH par les extraits des fruits du "*J. phoenicea*", a montré que à la plus grande concentration en extrait à (1mg/mL), l'inhibition a été intéressant tandis qu'elle a été proportionnelle d'un extrait à l'autre.

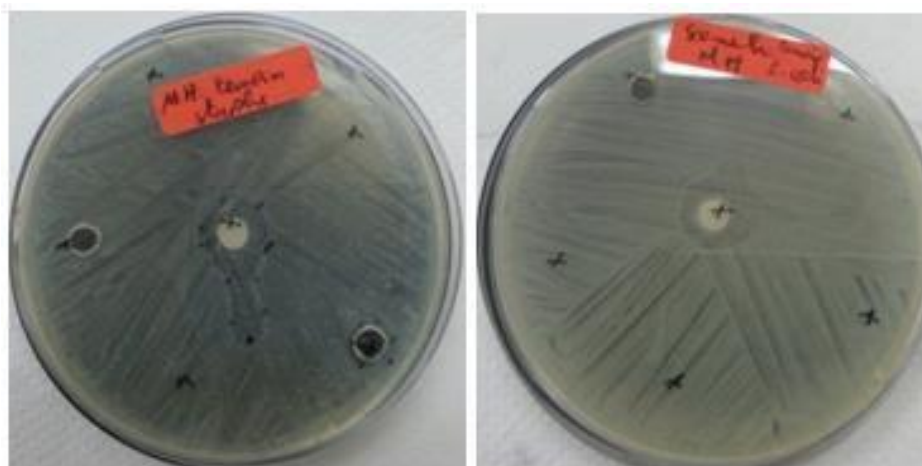
## V. RÉSULTATS D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNE :

Nous avons élaboré une étude *in vitro* visant l'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits des deux plantes investiguées par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés ainsi que la méthode des puits vis-à-vis deux souches bactériennes "*Staphylococcus aureus* ATCC 25293, et *Escherichia coli* ATCC 25922".

Les souches bactérienne nageant dans des tubes a vis contenant du bouillon nutritif ont été prélevées à l'aide d'un écouvillon,ensemencées sur les boites de pétris contenant la gélose nutritive préparées préalablement.

Dans chaque boite trois puits ont été creusés à l'aide d'une pipette pasteur stérile puis remplis de 15µL d'extrait (1 mg/mL, dans le DMSO à 10 %) et trois disques stériles placés sur la gélose nutritive ont été injectés par le même volume que celui des puits avec la même concentration, le tous a été incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

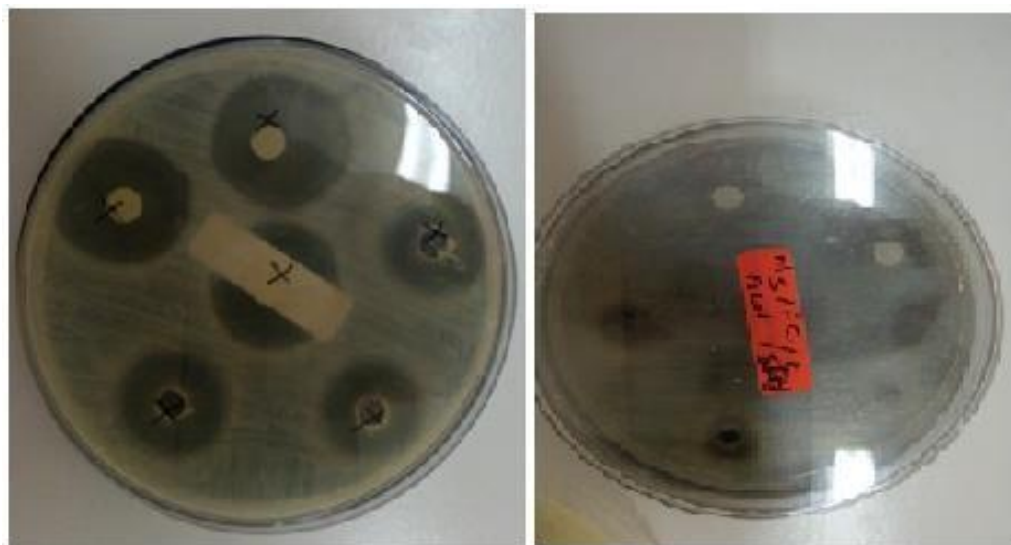
La toxicité du solvant utilisé peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique lorsqu'on dépose les extraits, la raison pour laquelle le DMSO a été testé et les résultats ont montrés qu'il ne présentant aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes comme illustrés sur la figure 32.



**Figure 32 :** Effet du DMSO sur les deux bactéries testées.

Au terme de 24 h d'incubation à 37°C, les deux bactéries testées ont présentées une sensibilité moyenne vis-à-vis des extraits des feuilles du "*Juniperus phenicea*", cependant elles ont présentées une sensibilité plus élevé vis-à-vis les extraits des fruits du même plante. En se qui concerne le "*Juniperus oxycedrus*" aucune sensibilité pour les deux souches bactérienne n'a été révélée, sauf dans le cas de l'*Escherichia coli* qui a présentée une sensibilité moyenne vis-à-vis de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles.

La figure 33 montre un exemple des résultats obtenus confirmant la sensibilité des deux souches bactériennes à l'égard d'un exemple d'un extrait des plantes étudiée à effet antibactérien.



**Figure 33 :** Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du “*Juniperus oxycedrus*” sur l'*Escherichia coli* et le *Staphylococcus aureus*.

Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes des flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les micro-organismes. Cette toxicité est fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur les molécules flavonoïdes.

L'effet antimicrobien de ces phases peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires (Dhaouadi et *al.*, 2010).

Les résultats obtenus estimant le pouvoir inhibiteur du *Staphylococcus aureus* et de l'*Escherichia coli*, autour des puits et des disques contenant les extraits des deux plantes étudiées sont présentés dans le tableau 8.

**Tableau 8** : Résultats estimés en termes de diamètres des zones d'inhibition (mm) du *Staphylococcus aureus* et de l'*Escherichia coli*, autour des puits et des disques contenant les extraits des deux plantes étudiées.

Extrait	Escherichia coli		Staphylococcus aureus	
	Zone d'inhibition (mm)	Degré de sensibilité	Zone d'inhibition (mm)	Degré de sensibilité
Ph F EP	18.10	++	17,86	++
Ph F But	0	/	17,60	++
Ph F CLO	0	/	-	/
Ph F AQ	15.88	++	-	/
Ph F AQ	13.58	++	17.27	++
Ph F CLO	29.24	+++	16.21	++
Ph F AcEt	-	/	-	
Ph F But	-	/	-	/
Ph F EP	-	/	-	/
O F CLO	-	/	-	/
O F AcEt	14.24	+	-	/
O F EP	-	/	-	/
O FAQ	-	/	-	/

(+) : Sensibilité limitée; (++) : Sensibilité moyenne; (+++) haute sensibilité.

# CONCLUSION

# GÉNÉRALE





Dans le cadre de valorisation des ressources végétales naturelles de la région de Tébéssa, une étude comparative entre deux sous-espèces du genre “*Juniperus*” appartenant à la famille des “*Cupressaceae*” connu pour leurs propriétés thérapeutiques bénéfiques sur les coliques et autre gastrites en médecine traditionnelle a été entrepris.

L'étude accompli nous a permit de faire une comparaison entre les différentes propriétés phytochimiques et biologique évaluées pour les extraits des feuilles et des fruits des deux sous-espèces “*Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus*”.

Les tests de screening phytochimiques révèlent la richesse des plantes investiguées en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des coumarines et des tanins. Les huiles volatiles, les stérols et les stéroïdes en quantités moins importantes, tandis que les quantités des acides gras et des hétérosides terpéniques était faibles. Cependant en plus de ces familles de composés le “*Juniperus oxycedrus*”, contenait aussi les anthracénosides, les amidons et les composés réducteurs.

Les rendements d'extraction réalisés sur les deux parties aériennes (feuilles et fruits) des deux plantes étudiées étaient relativement importants. Les rendements les plus élevés ont été observés avec l'extrait méthanolique pour les deux sous-espèces avec 14.22 % (feuilles) et 9.11 % (fruits) pour le “*J. phoenicea*”, et 11.72 % (feuilles) et 7.55 % (fruits) pour le “*J. oxycedrus*”, alors que les autres phases extraites ont été obtenus avec des rendements modérés.

Les phases extraites par l'acétate d'éthyle des fruits des deux sous-espèces ont exhibées la teneur en composés flavonoïdes la plus élevée avec 57 % pour le “*J. phoenicea*” et 51 % pour le “*J. oxycedrus*”. Pour les extraits des feuilles du “*J. oxycedrus*”, on note que la concentration en flavonoïde la plus élevée était dans l'extrait n-butanol avec 46 %, tandis que pour les extraits du “*J. phoenicea*”, les résultats de ce dosage révèlent la concentration en flavonoïde la plus élevée est dans l'extrait d'acétate d'éthyle avec 45 % comme pour les fruits.

Le pouvoir antioxydant des extraits des deux sous-espèces était remarquable. Ces résultats ont été confirmés par deux méthodes : la première est celle du piégeage du radical libre DPPH, où les extraits des feuilles du “*J. oxycedrus*” ont présentés le meilleur résultat suivi de ceux des extrait des grains de “*J. oxycedrus*” et les feuilles de “*J. phoenicea*” qui était aussi intéressants.

Cette deuxième méthode concernant la réduction du fer (**FRAP**), a confirmée bel et bien les résultats obtenus par la première méthode.

L'activité antibactérien des plantes étudiées a montrée que les deux souches bactériennes testées ont présentées une sensibilité moyenne vis-à-vis des extraits des feuilles du “*Juniperus phenicea*”, cependant elles ont présentées une sensibilité plus élevé vis-à-vis a leurs extraits de fruits. En ce qui concerne le “*Juniperus oxycedrus*” aucune sensibilité pour les deux souches bactérienne n'a été révélée, sauf dans le cas de l'*Escherichia coli* qui a présentée une sensibilité moyenne vis-à-vis l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles.

➤ Pour nos perspectives :

- ✚ Tester l'activité antimicrobienne des deux plantes in vitro sur d'autres souches microbiennes,
- ✚ Extraction et isolement des produits du métabolisme secondaires avec un degré de pureté suffisant pour les constituants de chaque famille,
- ✚ Tester les différentes familles ou molécules isolées, in vivo sur différents modèles biologiques afin de trouver une application thérapeutique des molécules actives isolées.

A travers ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de notre flore locale.