



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Laboratoire des Produits Naturels
(LAPRONA)

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

EN BIOLOGIE

Option

Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse

Par

M^{elle} MAZARI Khadidja

Thème

**Etude phytochimique et pouvoir antimicrobien
de *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L.
et *Cupressus sempervirens* L. de la région de Tlemcen.**

Soutenue :

devant le jury composé de :

M^{me} BELARBIM.

Professeur (Univ. A. B. Tlemcen)

Président

M^r BENABADJI N.

Professeur (Univ. A. B. Tlemcen)

Examineur

M^{me} HASSAINE H.

Maître de Conférences (Univ. A. B. Tlemcen)

Examinatrice

M^r LAZOUNI H. A.

Maître de Conférences (Univ. A. B. Tlemcen)

Examineur

M^{me} BEKHECHI C.

Maître de Conférences (Univ. A. B. Tlemcen)

Co-Promoteur

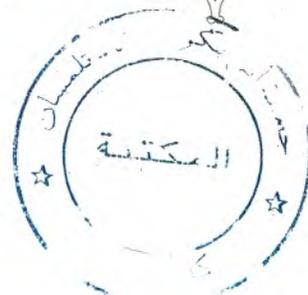
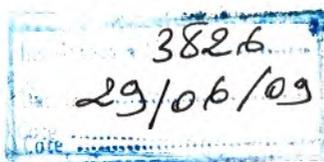
M^{me} BENDIMERAD N.

Maître de Conférences (Univ. A. B. Tlemcen)

Promoteur

Année Universitaire 2008-2009

Mag: 153/02



DEDICACES

Je dédie ce mémoire,

*A mes très chers parents pour leur amour, soutien et encouragements
durant toutes mes années d'études, que Dieu les protège,*

A mes chères sœurs et frères,

A mes neveux et nièces,

A mes très chères amies,

A ma promotion de Magister 2006-2007,

Ainsi qu'à toute ma famille et mes amies.

KHADIDJA

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) du Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, de la Faculté des Sciences, de l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, sous la direction de M^{me} BENDIMERAD Nassima et M^{me} BEKHECHI Chahrazed, comme co-directeur.

A madame BENDIMERAD N., Maître de Conférences au Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, j'exprime ma profonde reconnaissance et gratitude tant pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce travail. Ses conseils et encouragements m'ont permis de mener à bien cette étude.

Je tiens à remercier M^{me} BEKHECHI C., Maître de Conférences au Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, pour avoir participé à la direction de ce travail ainsi que pour l'aide qu'elle m'a fourni.

Je tiens à remercier M^{me} BELARBI Meriem, Professeur au Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je veux exprimer mes sincères et vifs remerciements à M^f BENABADJI Noury, Professeur au Département de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, pour toute l'aide qu'il nous a fourni ainsi que pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à remercier également M^{me} HASSAINE Haféda, Maître de Conférences au Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens aussi à remercier M^f LAZOUNI Hamadi Abderrahmane, Maître de Conférences au Département de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse également mes remerciements les plus vifs et ma profonde reconnaissance et gratitude à Monsieur Xavier FERNANDEZ, Maître de Conférences à l'Université de Nice Sophia-Antipolis, pour nous avoir accueillis au sein du Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (LCMBA) et toute l'aide qu'il nous a fourni afin de réaliser les analyses chromatographiques.

Mes remerciements vont également à tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS UTILISEES

Abs : Absorbance

ABTS⁺ : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

AcOEt : Acétate d'éthyle

amu : Atomic mass unit (unité de masse atomique-uma)

ATB : Antibiotique

ATCC : American type culture collection

ATF : Antifongique

C. : *Cupressus*

CCM : Chromatographie sur couche mince

cm : Centimètre

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

éq. : Equivalent

ev : Electron volt

FID : Détecteur à ionisation de flamme

g : Gramme

h : Heure

H. E. : Huile essentielle

J. : *Juniperus*

L : Litre

mg : milligramme

min : minute

mL : millilitre

mM : millimolaire

mm : millimètre

n-buOH : n-butanol

nm : nanomètre

PDA : Potatoes Dextrose Agar

Rf : Rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

TLC : Thin Layer Chromatography

UFC : Unité formant une colonie

U.V. : Ultraviolet

V : Volume

% : Pourcentage

°C : Degré celsius

µg : Microgramme

µL : Microlitre

µm : Micromètre

Résumés

Etude phytochimique et pouvoir antimicrobien de *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L. et *Cupressus sempervirens* L. de la région de Tlemcen.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de trois plantes : *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L. et *Cupressus sempervirens* L., poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen.

Des tests phytochimiques réalisés lors de cette étude ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles de ces plantes.

L'extraction des huiles essentielles nous a révélé que le rendement en huile essentielle de *J. phoenicea* (0,52%) est plus élevé par rapport à ceux de *J. oxycedrus* et *C. sempervirens*, qui présentent respectivement des rendements de 0,11% et 0,26%. La détermination de la composition chimique de ces huiles essentielles a été réalisée par CPG/SM. Les composés majoritaires mis en évidence dans l'huile essentielle de *J. phoenicea* sont : l' α -pinène (34,51%), le β -phellandène (22,37%) et l'acétate d' α -terpényle (14,68%). L'huile essentielle de *J. oxycedrus* est caractérisée par une prédominance en α -pinène (39,32%), suivi du D-germacrène (8,88%). Pour l'espèce *C. sempervirens*, l' α -pinène (60,51%) est le composé majoritaire, suivi du cédrol (8,32%).

L'extraction des composés phénoliques a permis d'obtenir un même rendement pour les deux espèces : *Juniperus phoenicea* (24,2%) et *Cupressus sempervirens* (24,2%). Quant à l'espèce *Juniperus oxycedrus*, il présente un rendement proche de ces derniers (25,4%).

Le fractionnement de l'extrait méthanolique a permis d'obtenir le même rendement de la fraction AcOEt (4%) pour les deux espèces *J. phoenicea* et *C. sempervirens*. Par contre, *J. oxycedrus* présente un rendement faible de 2,66%. En ce qui concerne la fraction n-buOH, *Juniperus oxycedrus* présente le rendement le plus élevé (14%) en comparaison avec les autres plantes : (7%) pour *C. sempervirens* et (4,5%) pour *J. phoenicea*. L'analyse par CCM de ces fractions nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de flavonoïdes et d'acides phénoliques.

L'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de ces plantes a montré que les huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* se sont avérées actives uniquement sur la souche bactérienne *Enterococcus faecalis*. La souche fongique *Penicillium ssp.* s'est révélée sensible vis-à-vis de l'huile essentielle de *J. oxycedrus* par rapport aux huiles essentielles des deux autres plantes.

L'étude du pouvoir antioxydant des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes de ces plantes nous a permis de déduire que toutes ces fractions (à l'exception de la fraction AcOEt de *J. oxycedrus*) possèdent une activité antioxydante faible par comparaison avec celle de l'acide ascorbique.

Mots clés : *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L., *Cupressus sempervirens* L., huiles essentielles, flavonoïdes, CPG/SM, CCM, pouvoir antimicrobien, pouvoir antioxydant.

الدراسة الفيتوكيميائية والقدرة المضادة للميكروبات لـ *Juniperus phoenicea* L.,
Cupressus sempervirens L. و *Juniperus oxycedrus* L.
لمنطقة تلمسان

ملخص:

يدور هذا العمل حول دراسة فيتوكيميائية وبيولوجية لثلاثة نباتات برية لمنطقة تلمسان وهي:

Juniperus phoenicea L.، *Juniperus oxycedrus* L. و *Cupressus sempervirens* L.

مكثنا الاختبارات الفيتوكيميائية التي تم إنجازها خلال هذه الدراسة من اظهار مختلف المكونات

الكيميائية الموجودة بأوراق هذه النباتات.

بين لنا استخلاص الزيوت الأساسية أن مردود الزيت الأساسي لـ *J. phoenicea* (0,52%) هو

أعلى بالنسبة لمردودات *J. oxycedrus* و *C. sempervirens*، الذين يمثلون مردودات 0,11% و 0,26% على الترتيب.

لقد تم تحديد البنية الكيميائية لهذه الزيوت الأساسية بواسطة الكروماتوغرافية الغازية المتجانسة مع

منظار طيفي كتلي. المركبات السائدة التي تم الكشف عنها في الزيت الأساسي لـ *J. phoenicea* هي:

α - pinène (34,51%)، β -phellandrène (22,37%) و acétate d' α -terpényle (14,68%). الزيت

الأساسي لـ *J. oxycedrus* يتميز بسيادة α -pinène (39,32%)، متبوع بـ D-germacrène (8,88%).

بالنسبة للصنف *C. sempervirens*، α -pinène (60,51%) هو المركب السائد، متبوع بـ cédrol (8,32%).

صرح استخلاص المركبات الفينولية بالحصول على نفس المردود للصنفين: *J. phoenicea*

و *C. sempervirens* (24,2%). فيما يخص الصنف *J. oxycedrus*، فإنه يمثل مردود قريب بالنسبة للصنفين

السابقين (25,4%).

بينت تجزئة المستخلص الميثانولي الحصول على نفس المردود لجزء AcOEt (4%) بالنسبة للصنفين

J. phoenicea و *C. sempervirens*. بالعكس *J. oxycedrus* يمثل مردود ضعيف (2,66%). فيما يخص جزء

J. oxycedrus، n-buOH يمثل المردود العالي (14%) مقارنة بالنباتات الأخرى: (7%) لـ *C. sempervirens*

و (4,5%) لـ *J. phoenicea*. التحليل بالكروماتوغرافية على الطبقة الرقيقة لهذه الأجزاء سمح لنا بالكشف

على عدد معين من الفلافونويدات و الأحماض الفينولية.

بينت دراسة القدرة المضادة للميكروبات للزيوت الأساسية لهذه النباتات بأن الزيوت الأساسية لـ

J. phoenicea و *J. oxycedrus* نشيطة فقط على السلالة البكتيرية *Enterococcus faecalis*. السلالة الفطرية

Penicillium ssp. اتضحت أنها حساسة نحو الزيت الأساسي لـ *J. oxycedrus* مقارنة بالزيوت الأساسية

للنبتين الأخرتين.

سمحت لنا دراسة القدرة المضادة للأكسدة لأجزاء AcEot و n-buOH للفلافونويدات لهذه النباتات

من استخلاص بان كل هذه الاجزاء (باستثناء جزء AcEot لـ *J. oxycedrus*) تملك نشاط ضعيف ضد

الأكسدة مقارنة بحمض الأكسوريك.

كلمات مفتاحية: *Juniperus phoenicea* L.، *Juniperus oxycedrus* L.، *Cupressus sempervirens* L.

الزيوت الأساسية، الفلافونويدات، الكروماتوغرافية الغازية المتجانسة مع منظار طيفي كتلي، الكروماتوغرافية على

الطبقة الرقيقة، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة.

Sommaire

	Page
Abréviations utilisées	iii
Résumés	iv
Sommaire	viii
Liste des Tableaux	xii
Liste des Figures	xiv
Introduction générale	01
Synthèse bibliographique	05
I- Présentation des plantes étudiées	06
I-1 <i>Juniperus phoenicea</i> L.	06
I-2 <i>Juniperus oxycedrus</i> L.	09
I-3 <i>Cupressus sempervirens</i> L.	13
II- Substances actives des plantes	16
II-1 Composés phénoliques	16
II-1.1 Définition	16
II-1.2 Activités biologiques	16
II-1.3 Flavonoïdes	17
II-1.4 Tanins	19
II-2 Composés terpéniques	21
II-2.1 Saponosides	21
II-2.2 Huiles essentielles	21
II-3 Alcaloïdes	24
III- Stress oxydant et antioxydants	25
III-1 Stress oxydatif	25
III-1.1 Définition	25
III-1.2 Origine du stress oxydatif	25
III-1.3 Radicaux libres	25
III-1.4 Conséquences du stress oxydant	27
III-2 Antioxydants	27
III-2.1 Définition	27
III-2.2 Antioxydants endogènes	27
III-2.3 Antioxydants naturels	28

Partie expérimentale	31
I- Introduction	32
II- Matériel végétal	32
II-1 Origine géographique et période de récolte	32
II-2 Identification botanique	32
II-3 Préparation du matériel végétal	32
III- Tests phytochimiques	32
III-1 Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud	34
III-1.1 Amidon	34
III-1.2 Saponosides	34
III-1.3 Tanins	34
III-2 Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol	34
III-2.1 Alcaloïdes sels	35
III-2.2 Flavonoïdes	35
III-2.3 tanins	35
III-2.4 Composés réducteurs	35
III-2.5 Anthracénosides, coumarines et anthocyanosides	35
III-2.6 Stérols et stéroïdes	36
III-3 Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique	37
III-3.1 Huiles volatiles	37
III-3.2 Acides gras	37
III-3.3 Alcaloïdes bases	38
III-3.4 Emodols	38
IV- Extractions sélectives- Analyses	38
IV-1 Les huiles essentielles	38
IV-1.1 Technique d'extraction	38
IV-1.2 Calcul du rendement	39
IV-1.3 Analyse par CPG/SM	39
IV-1.3.1 Conditions opératoires	40
IV-1.3.2 Identification des constituants	40

IV-2 Les flavonoïdes	41
IV-2.1 Préparation des extraits bruts	41
IV-2.2 Calcul du rendement des extraits bruts	41
IV-2.3 Dosage des phénols totaux	41
IV-2.4 Dosage des flavonoïdes	41
IV-2.5 Préparation des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes	42
IV-2.6 Calcul du rendement des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes	42
IV-2.7 Analyse par CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes	42
IV-3 Les tanins	44
IV-3.1 Dégraissage du matériel végétal	44
IV-3.2 Procédé d'extraction	44
IV-3.3 Analyse par CCM	44
V- Activités biologiques	46
V-1 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des antimicrobiens (Antibiotiques et Antifongique)	46
V-1.1 Provenance des germes testés	46
V-1.2 Pouvoir antimicrobien des antibiotiques et de l'antifongique	47
V-1.3 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles	47
V-1.3.1 Méthodes d'étude du pouvoir antibactérien	47
VI-1.3.1.1 Méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme)	48
V-1.3.1.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	48
V-1.3.2 Méthode d'étude du pouvoir antifongique	49
V-1.4 Préparation des inoculums	49
V-1.4.1 Bactéries	49
V-1.4.2 Moisissures	50
V-1.5 Milieux de culture	50
V-2 Pouvoir antioxydant des flavonoïdes	50
V-2.1 L'essai au DPPH	51
V-2.2 Expression des résultats	51

Résultats et discussion	53
I- Tests phytochimiques	54
II- Extractions sélectives - Analyses	54
II-1 Les huiles essentielles	56
II-1.1 Rendements en huiles essentielles	
II-1.2 Composition chimique des huiles essentielles des différentes plantes	58
II-1.2.1 Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. phoenicea</i> L.	58
II-1.2.2 Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. oxycedrus</i> L.	63
II-1.2.3 Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>C. sempervirens</i> L.	68
II-2 Les flavonoïdes	73
II-2.1 Rendements des extraits bruts secs	73
II-2.2 Teneurs en phénols totaux	74
II-2.3 Teneurs en flavonoïdes	75
II-2.4 Rendements des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes	76
II-2.5 CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes	77
II-3 Les tanins	83
II-3.1 Rendements des extraits obtenus	83
II-3.2 CCM des extraits des tanins	84
III- Activités biologiques	87
III-1 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des antimicrobiens (Antibiotiques et Antifongique)	87
III-1.1 Pouvoir antimicrobien des antibiotiques et de l'antifongique	87
III-1.2 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles	88
III-1.2.1 Activité antibactérienne des huiles essentielles testée par la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme)	88
III-1.2.1.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	89
III-1.2.2 Activité antifongique des huiles essentielles testée par la méthode de contact direct	90
III-2 Pouvoir antioxydant des flavonoïdes	93
Conclusion générale	99
Références bibliographiques	103
Annexes	119

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Activité biologique des molécules aromatiques selon leur fonction chimique	23
Tableau 2 : Provenance des germes testées	46
Tableau 3 : Antibiotiques utilisés	47
Tableau 4 : Antifongique utilisé	47
Tableau 5 : Résultats des tests phytochimiques réalisés sur les feuilles de <i>J. phoenicea</i> L., de <i>J. oxycedrus</i> L. et de <i>C. sempervirens</i> L.	55
Tableau 6 : Comparaison des rendements en huiles essentielles des plantes étudiées avec ceux des travaux antérieurs	57
Tableau 7 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. phoenicea</i> L.	58
Tableau 8 : Bilan de l'étude de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. phoenicea</i> L.	61
Tableau 9 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. phoenicea</i> L. avec celles des travaux antérieurs	62
Tableau 10 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. oxycedrus</i> L.	63
Tableau 11 : Bilan de l'étude de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. oxycedrus</i> L.	66
Tableau 12 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. oxycedrus</i> L. avec celles des travaux antérieurs	67
Tableau 13 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>C. sempervirens</i> L.	68
Tableau 14 : Bilan de l'étude de l'huile essentielle des feuilles de <i>C. sempervirens</i> L.	71
Tableau 15 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de <i>C. sempervirens</i> L. avec celles des travaux antérieurs	72
Tableau 16 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des huiles essentielles des trois espèces étudiées	73
Tableau 17 : Résultats de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes Système solvant (1) : n-hexane/ acétate d'éthyle/ acide acétique (31:14:5) (v/v/v)	79
Tableau 18 : Résultats de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes Système solvant (2) : Toluène/acétone/acide formique (38:10:5) (v/v/v)	80

Tableau 19 : Valeurs des Rf des étalons	82
Système solvant (1) : n-hexane/ acétate d'éthyle/ acide acétique (31:14:5) (v/v/v)	
Système solvant (2) : Toluène/acétone/acide formique (38:10:5) (v/v/v)	
Tableau 20 : Composés identifiés dans les trois espèces étudiées	83
Tableau 21 : Résultats de la CCM des extraits des tanins	85
Système solvant : acétone / Toluène /acide formique (30:30:10) (v/v/v)	
Tableau 22 : Valeurs des Rf des étalons	86
Système solvant : acétone / Toluène /acide formique (30:30:10) (v/v/v)	
Tableau 23 : Composés identifiés dans les trois espèces étudiées	86
Tableau 24 : Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de <i>J. phoenicea</i> L. et <i>J. oxycedrus</i> L. relative à la souche <i>Enterococcus faecalis</i>	90
Tableau 25 : EC ₅₀ et puissance antiradicalaire (ARP) des extraits naturels et du standard	96

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Photo d'un rameau de <i>Juniperus phoenicea</i> L.	7
Figure 2 : Photo d'un rameau de <i>Juniperus oxycedrus</i> L.	10
Figure 3 : Photo d'un rameau de <i>Cupressus sempervirens</i> L.	14
Figure 4 : Squelette de base des flavonoïdes	17
Figure 5 : Biosynthèse des flavonoïdes	18
Figure 6 : Exemple de tanins hydrolysables	19
Figure 7 : Exemple de tanins condensés	20
Figure 8 : Exemples des composants terpéniques	22
Figure 9 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	26
Figure 10 : Carte de localisation géographique des stations d'étude	33
Figure 11 : Schéma d'un appareil de couplage CG-SM	40
Figure 12 : Protocole d'extraction des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes	43
Figure 13 : Protocole d'extraction des tanins	45
Figure 14 : Forme libre et réduite du DPPH	50
Figure 15 : Rendements en huiles essentielles	56
Figure 16 : Chromatogramme en CPG/SM de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. phoenicea</i> L.	60
Figure 17 : Distribution des composés volatils présents dans l'huile essentielle des feuilles de <i>J. phoenicea</i> L.	61
Figure 18 : Chromatogramme en CPG/SM de l'huile essentielle des feuilles de <i>J. oxycedrus</i> L.	65
Figure 19 : Distribution de composés volatils présents dans l'huile essentielle des feuilles de <i>J. oxycedrus</i> L.	66
Figure 20 : Chromatogramme en CPG/SM de l'huile essentielle des feuilles de <i>C. sempervirens</i> L.	70
Figure 21 : Distribution de composés volatils présents dans l'huile essentielle des feuilles de <i>C. sempervirens</i> L.	71
Figure 22 : Rendements des extraits bruts secs	73

Figure 23 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux	74
Figure 24 Teneurs en phénols totaux (mg/g)	74
Figure 25 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes	75
Figure 26 : Teneurs en flavonoïdes totaux (mg/g)	76
Figure 27 : Rendements des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes	77
Figure 28 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes (système 1)	78
Figure 29 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes (système 2)	78
Figure 30 : Rendements des extraits des tanins	84
Figure 31 : Chromatogramme résultant de la CCM des extraits des tanins	84
Figure 32 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des antibiotiques relatifs aux différentes souches bactériennes	87
Figure 33 : Pourcentages d'inhibition de l'amphotéricine B relatifs aux différentes souches fongiques	88
Figure 34 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles relatives aux différentes souches bactériennes	89
Figure 35 : Pourcentages d'inhibition des huiles essentielles relatifs aux différentes souches fongiques	91
Figure 36 : Activité antioxydante de l'acide ascorbique	93
Figure 37 : Activité antioxydante de la fraction AcOEt de <i>J. phoenicea</i> L.	94
Figure 38 : Activité antioxydante de la fraction n-buOH de <i>J. phoenicea</i> L.	94
Figure 39 : Activité antioxydante de la fraction AcOEt de <i>J. oxycedrus</i> L.	95
Figure 40 : Activité antioxydante de la fraction n-buOH de <i>J. oxycedrus</i> L.	95
Figure 41 : Activité antioxydante de la fraction AcOEt de <i>C. sempervirens</i> L.	95
Figure 42 : Activité antioxydante de la fraction n-buOH de <i>C. sempervirens</i> L.	95
Figure 43 : EC ₅₀ des extraits flavonoïdiques et du standard	97
Figure 44 : ARP des extraits flavonoïdiques et du standard	98

Introduction générale

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains.

Aujourd'hui, encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. L'industrie pharmaceutique moderne, elle-même, s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400 000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (**Hostettmann et al., 1998**).

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les microorganismes (bactéries, champignons,...) se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leurs résistent de plus en plus. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (**Larousse, 2001**).

La recherche des principes actifs extraits des plantes est donc d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

Le présent travail constitue une partie de l'effort déployé par notre laboratoire et particulièrement par notre équipe dans le cadre de la valorisation de la flore locale, et ce par l'étude chimique et biologique (activités antimicrobienne et antioxydante) de quelques plantes suspectées médicinales en vue de découvrir de nouvelles substances d'intérêt biologique et thérapeutique (**Bendimerad et al., 2005 ; Bendimerad et al., 2007 ; Bekhechi et al., 2007 ; Belarbi et al., 2007 ; Benhammou et al., 2007 ; Atik Bekkara et al., 2008 ; Bekhechi et al., 2008 ; Benhammou et al., 2008**).

C'est dans ce cadre que nous avons opté pour l'étude de trois espèces spontanées appartenant à la famille des cupressacées, *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L. et *Cupressus sempervirens* L., collectées de la région de Tlemcen.

Les recherches bibliographiques que nous avons menées sur ces plantes montrant l'absence de travaux de recherches antérieurs en Algérie, nous ont motivés à les choisir, pour une étude phytochimique et biologique. Cependant, beaucoup de travaux ont été réalisés ailleurs sur la composition chimique des huiles essentielles de ces trois espèces.

Ce travail a donc pour objectif général d'étudier la phytochimie et les activités antimicrobienne et antioxydante de ces plantes. Pour cela, notre étude a été réalisée en trois parties :

Dans la première partie de ce manuscrit, une étude bibliographique est menée sur :

- La description des différentes espèces végétales, les propriétés thérapeutiques et les travaux déjà réalisés sur ces plantes ;
- La définition et les activités biologiques des grandes familles de métabolites secondaires des plantes qui sont doués d'activités pharmacologiques, à savoir : les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes ;
- La définition, l'origine et les conséquences du stress oxydatif, ainsi que la présentation des différents types des antioxydants.

La deuxième partie, qui est expérimentale est répartie comme suit :

- Tests phytochimiques : qui sont réalisés sur les feuilles de nos plantes, en utilisant trois solvants de polarité différente (l'eau, l'éthanol et l'éther diéthylique).
- Extractions sélectives et analyses :
 - Extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau ;
 - Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ;
 - Extraction des composés phénoliques ;
 - Dosage des phénols totaux ;
 - Dosage des flavonoïdes ;

- Extraction des flavonoïdes ;
 - Analyse de la composition chimique des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince ;
 - Extraction des tanins ;
 - Analyse de la composition chimique des tanins par chromatographie sur couche mince.
- Activités biologiques :
- Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des différentes espèces végétales vis-à-vis de cinq souches bactériennes et quatre souches fongiques.
 - Etude du pouvoir antioxydant des flavonoïdes par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

Dans la troisième partie, nous discutons les résultats obtenus lors cette étude.

Synthèse bibliographique

I- Présentation des plantes étudiées

I-1 *Juniperus phoenicea* L.

Le nom « *Juniperus* » provient du mot celtique « *juneprus* » qui signifie âpre, à cause de la saveur des fruits (Garnier et al., 1961 ; Bonnier, 1990). Ou encore de *junio* et *pario*, l'arbre possédant à la fois des fruits jeunes et des fruits près de tomber (Garnier et al., 1961).

I-1.1 Noms vernaculaires

En Arabe : Arar (Quezel et Santa, 1962).

En Français : Genévrier rouge, Genévrier de Phénicie.

En Anglais : Phoenician Cedar, Berry Bearing Cedar.

En Allemand : Cypressen Wacholder, Rotbeeriger Wacholder, Griechischer Wacholder.

En Italien : Cedro licio (Bonnier, 1990).

I-1.2 Systématique

Embranchement : Spermaphytes

Sous- Embranchement : Gymnospermes

Classe : Conifères

Ordre : Coniférales

Famille : Cupressacées

Genre : *Juniperus*

Espèce : *Juniperus phoenicea* L. (Quezel et Santa, 1962).

I-1.3 Description botanique

C'est un arbrisseau, de 1 à 8 mètres de hauteur, ramifié dès la base et à houppier dense, allongé. L'écorce est brun- rouge, fibreuse, assez épaisse.

Les feuilles persistantes opposées (rarement verticillées par trois), sont de deux sortes :

- Des feuilles en aiguilles (10x1mm), piquantes, avec deux lignes blanches dessus et dessous, qui se trouvent uniquement sur les individus très jeunes ;
- Des feuilles en écailles, petites (1mm), ovales et bombées sur le dos, étroitement appliquées sur les rameaux, bordées d'une marge d'aspect cartilagineux.

Les fruits (automne de la deuxième année) 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 graines (Becker et al., 1982) (figure 1).

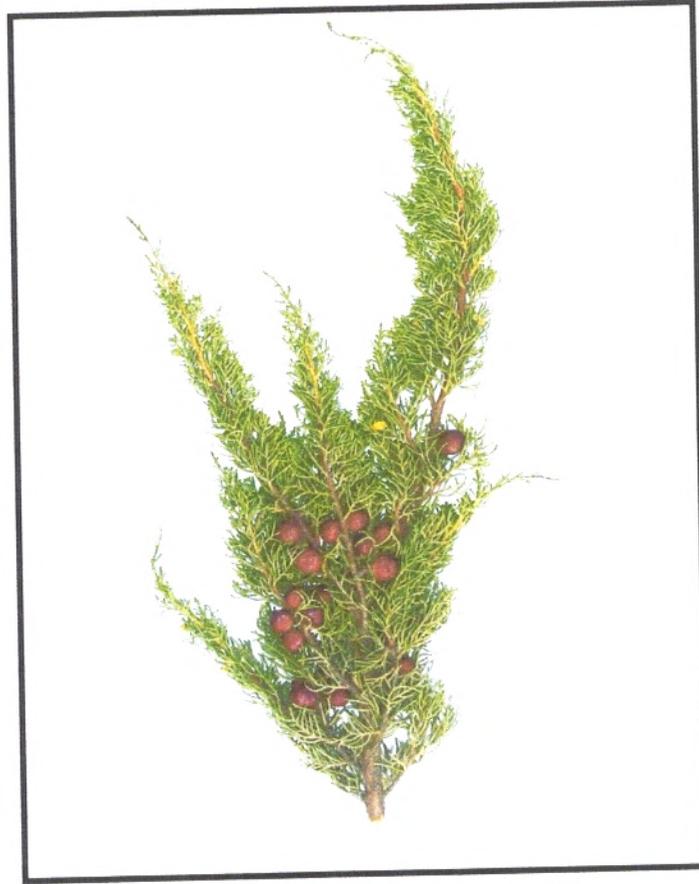


Figure 1 : Photo d'un rameau de *Juniperus phoenicea* L.

I-1.4 Distribution et Habitat

C'est une espèce répandue sur tout le pourtour de la méditerranée (Becker et al., 1982). Il s'élève dans les alpes jusqu'à 1200 mètres d'altitude.

Il croît sur les côteaux, les rochers, dans les endroits rocailleux de la région méditerranéenne et de ses confins (Bonnier, 1990).

I-1.5 Usages thérapeutiques

Cette espèce est très utilisée en médecine traditionnelle. Les feuilles sont utilisées sous forme de décoction pour soigner le diabète, la diarrhée et le rhumatisme alors que les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (Le Floc'h, 1983).

Les feuilles sont utilisées contre les maladies broncho-pulmonaires et comme un diurétique (Bellakhder, 1997; Boullard, 2001).

Le mélange des feuilles et cônes a été utilisé comme un hypoglycémiant oral (Bellakhder, 1997).

Il a été démontré que les huiles essentielles des feuilles et des cônes possèdent une activité antimicrobienne (Stassi et al., 1996).

L' α -pinène, qui est le composé majoritaire de l'huile de *Juniperus phoenicea*, présente plusieurs activités biologiques : il est antibactérien, anti-inflammatoire, antiviral, expectorant, sédatif, herbicide, insectifuge, et aromatisant (Duke, 1998).

I-1.6 Travaux antérieurs

Akrouit (1999) a déterminé la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus phoenicea*, récolté en Tunisie. L' α -pinène est le composé majoritaire avec une teneur de 67,71%. D'autres composés sont présents dans cette huile en quantités appréciables : le p-cymène (5,86%), le β -phellandrène (2,21%) et l'acétate d' α -terpényle (2,71%).

L'étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* récolté dans différentes régions en Corse, a permis à Rezzi et al. en 2001 de définir deux groupes d'huiles essentielles :

- Les huiles essentielles du groupe I sont caractérisées par une forte teneur en α -pinène (58,7%).
- La composition chimique des échantillons du groupe II, est caractérisée par une faible teneur en α -pinène (33,0%) et une teneur significative en β -phellandrène (21,1%) et en acétate d' α -terpényle (8,2%).

Par ailleurs, l'étude réalisée par Cavaleiro et al. en 2001 sur la même sous-espèce récoltée en Portugal, leur a permis de distinguer trois groupes d'huiles essentielles :

- Le premier groupe est caractérisé par une prédominance en α -pinène (teneur moyenne : 44,3%), suivi de β -phellandrène (teneur moyenne : 22,7%) et de l'acétate d' α -terpényle (teneur moyenne : 6,9%). Le rapport α -pinène/ β -phellandrène est proche de 2/1.
- Les huiles essentielles du groupe II sont aussi caractérisées par l' α -pinène (teneur moyenne : 27,8%), le β -phellandrène (teneur moyenne : 28,8%) et l'acétate d' α -terpényle (teneur moyenne : 10,5%), mais le rapport α -pinène/ β -phellandrène est proche de 1.
- Les échantillons appartenant au groupe III, sont dominés par l' α -pinène (teneur moyenne : 81,5%).

Barrero et al. (2006) ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus phoenicea* L., récolté en Maroc. Les constituants majoritaires sont des hydrocarbures monoterpéniques : l' α -pinène (45,5%) et le δ -carène (13,0%).

Hayouni et al. (2007) ont démontré que les solvants et la méthode d'extraction, influent significativement sur la teneur des polyphénols et les activités biologiques (antioxydante et antibactérienne) des extraits des fruits de *Juniperus phoenicea* L., récolté en Tunisie.

I-2 *Juniperus oxycedrus* L.

Le nom « *oxycedrus* » provient de deux mots grecs « *oxys* » et « *Cedros* » qui signifient respectivement aigu et Cèdre, c'est-à-dire « Cèdre à feuilles épineuses » (**Garnier et al., 1961**).

I-2.1 Noms vernaculaires

En Arabe : Taga (**Quezel et Santa, 1962**).

En Français : Cadier, Cade, Genévrier oxycèdre, Petit Cèdre, Petit Cèdre d'Espagne.

En Anglais : Berried Cedar, Prickly Cedar, Brown berried Juniper, Cade Oil Plant.

En Allemand : Ceder Wachholder, Spanischer Wachholder, Stachelbeere Wachholder.

En Espagnol : Cada.

En Italien : Appeggi, Ginepro Appeggi, Ginepro rosso, Ginepro Ossicedro (**Garnier et al., 1961 ; Bonnier, 1990**).

I-2.2 Systématique

Embranchement : Spermaphytes

Sous-Embranchement : Gymnospermes

Classe : Conifères

Ordre : Coniférales

Famille : Cupressacées

Genre : *Juniperus*

Espèce : *Juniperus oxycedrus* L. (**Quezel et Santa, 1962**).

I-2.3 Description botanique

C'est un arbrisseau, dont la taille varie de 1 à 9 mètres, dressé, qui ressemble beaucoup au genévrier commun (**Becker et al., 1982**).

Les feuilles verticillées par trois, persistantes, en forme d'aiguilles plus larges à la base qu'au sommet (15 à 20 x 1 à 1,5 mm), sont piquantes, glauques et marquées de deux lignes blanches dessus, et d'une carène acérée dessous (**Garnier et al., 1961**).

Les fruits (automne de la deuxième année) sont globuleux, assez gros (8 à 10 mm), verts, puis rouge-brun et luisants à maturité ; ils renferment généralement 3 graines (**Becker et al., 1982**) (figure 2).



Figure 2 : Photo d'un rameau de *Juniperus oxycedrus* L.

I-2.4 Distribution et Habitat

Le genévrier oxycède est une espèce originaire de la région méditerranéenne (**Marongiu et al., 2003**). Il atteint dans les montagnes méridionales l'altitude de 1000 mètres. Il n'est pas cultivé. Les sols calcaires, mi-calcaires et marneux lui conviennent particulièrement, de même que l'exposition au midi (**Garnier et al., 1961**).

Il croit dans les bois, sur les côtes arides et les rochers, en compagnie des pistachiers, des filarias, du genévrier de Phénicie et du buis (**Becker et al., 1982 ; Bonnier, 1990**).

I-2.5 Usages thérapeutiques

En médecine traditionnelle, cette plante est utilisée dans le traitement de diverses maladies tel que l'hyperglycémie, l'obésité, la tuberculose, la bronchite, et la pneumonie (**Swanston-Flatt et al., 1990 ; Sanchez de Medina et al., 1994**). Elle est également utilisée sous forme de décoction pour le traitement des troubles gastriques et comme un analgésique buccal (**Fernández et al., 1996**).

Les baies du genévrier oxycède sont diurétiques, stimulantes et vermifuges (**Becker et al., 1982**).

Ce genévrier est surtout connu pour l'huile que l'on obtient en distillant son bois, nommé l'huile de Cade (**Marongiu et al., 2003**). Cette huile est utilisée depuis très longtemps, comme remède externe de nombreuses affections cutanées : eczéma chronique à forme sèche, acné, psoriasis, et lichen. Pour l'usage interne, l'huile de Cade peut être préconisée comme vermifuge et contre la lithiase biliaire, la néphrite chronique, et la pyélite (**Garnier et al., 1961**).

Par ailleurs, **Leung et Foster, en 1996**, rapportent que l'huile de Cade possède des propriétés kératolytiques et antipruritiques et des activités antimicrobiennes *in vitro*.

Stassi et al. en 1996, rapportent que les huiles essentielles des feuilles et des baies de *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* et *Juniperus oxycedrus ssp. macrocarpa* ont montré une activité sur plusieurs microorganismes.

Digrak et al. en 1999, ont testé le pouvoir antimicrobien de l'extrait des feuilles, des fruits, de la résine et de l'écorce de *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus*. Ils ont constaté que ces extraits inhibent la croissance de plusieurs bactéries, mais ils ne montrent pas des effets antifongiques.

Il a été démontré que les extraits méthanolique et du dichlorométhane des feuilles et des tiges de *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus*, réduisent la pression sanguine des rats normotensives (**Bello et al., 1997**), inhibent la réponse à l'histamine, à la sérotonine et à l'acétylcholine (**Moreno et al., 1997**) et possèdent une activité anti-inflammatoire significative (**Moreno et al., 1998**).

I-2.6 Travaux antérieurs

En 2000, **Milos et Radonic**, ont pu identifier 36 composés dans l'huile des feuilles, 15 composés dans l'huile des baies vertes et 22 composés dans celle des baies matures de *Juniperus oxycedrus* L., récolté en Dalmatie. L' α -pinène est le composé majoritaire avec un pourcentage variant entre 41,37% et 66,30%.

Salido et al. (2002) rapportent que l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus oxycedrus ssp. badia* récolté en Espagne, contient une forte teneur en α -pinène (40-57%), suivi de l'oxyde de manoylé (5-10%). Alors que, l'huile des baies est dominée par l' α -pinène (65%) avec des quantités modérées de myrcène, de limonène, du D-germacrène et du γ -muurolène.

Ils ont trouvé également que ces deux huiles sont inactives, contre la réplication des virus HIV-1(III_B) et HIV-2(ROD) en culture cellulaire, tandis qu'elles sont toxiques pour les cellules à une concentration cytotoxique à 50% de 106 et 123 $\mu\text{g/mL}$ respectivement.

Valentini et al. (2003) ont comparé la composition chimique des huiles essentielles des feuilles et des cônes femelles de *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *macrocarpa* et de *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus*, récoltés en Italie. L' α -pinène est le composé majoritaire avec une teneur qui varie de 33,8 à 81,3% et de 50,3 à 85,1% respectivement dans les huiles des feuilles et des cônes de la ssp. *macrocarpa*.

Dans la ssp. *oxycedrus*, les composés majoritaires mis en évidence dans l'huile des cônes sont : le myrcène (40%) et l' α -pinène (31%). Alors que l'huile des feuilles est caractérisée par une forte teneur en limonène (30,0%), suivi par l' α -pinène (26,3%).

Karaman et al. (2003) ont étudié le pouvoir antimicrobien des extraits aqueux et méthanolique des feuilles de *Juniperus oxycedrus* L., récolté en Turquie. Ils ont démontré que l'extrait aqueux n'a pas un effet antimicrobien contre les microorganismes testés, tandis que l'extrait méthanolique a des effets inhibiteurs sur la croissance de 11 souches de *Candida albicans* et 57 souches de 24 espèces bactériens dans les genres suivants : *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Brucella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Xanthomonas*.

En 2006, **Boti et al.**, ont effectué une étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle des baies et des feuilles de *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus*, récolté à différentes altitudes en Corse. Ils ont pu distinguer deux groupes dans chacune des huiles :

☛ L'huile des baies :

- Le groupe I est caractérisé par une forte teneur en α -pinène (58,7%), suivi du myrcène (14,1%) et du D-germacrène (11,7%). Le rapport de ces trois composés est proche de 5/1/1.
- Les huiles du groupe II, sont aussi caractérisées par une prédominance en α -pinène (41,1%), suivi du myrcène (21,9%) et du D-germacrène (19,9%), mais le rapport est proche de 2/1/1.

☛ L'huile des feuilles :

- Les échantillons appartenant au groupe I, sont dominés par l' α -pinène (73,3%), suivi de β -phellandrène (3,3%).
- Dans les échantillons du groupe II, l' α -pinène est le composé majoritaire (56,1%), accompagné par le δ -3-carène (8,2%) et le β -phellandrène (4,2%).

En 2007, **Loizzo et al.**, ont analysé l'huile essentielle de *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus*, récolté en Liban, ce qui leur a permis d'identifier 50 composés dans l'huile des baies et 23 composés dans celle du bois.

L'huile des baies est caractérisée par une forte teneur en α -pinène (27,4%) et en β -myrcène (18,9%). Elle renferme également d'autres composés qui sont : l' α -phellandrène (7.1%), le limonène (6.7%), l'épi-bicyclosquiphellandrène (2.3%) et le δ -cadinène (2.2%). Par contre, le δ -cadinène (14,5%) est le composé majoritaire dans l'huile du bois, suivi par le cistujopsène (9.2%) et l' α -muurolène (4.9%).

Ces auteurs ont démontré également que ces deux huiles possèdent une activité antioxydante significative, avec les valeurs de l'IC₅₀ suivantes : 1,45 μ L/mL pour le bois et 7,42 μ L/mL pour les baies.

Ils ont trouvé aussi que l'huile du bois extraite par hydrodistillation, présente une activité hypoglycémiant intéressante avec une IC₅₀ de 3,49 μ L/mL.

I-3 *Cupressus sempervirens* L.

Cupressus : nom provient de *Cuparissos*, nom du jeune grec qui fut changé en cette plante par Apollon.

sempervirens : nom signifie « toujours vert » (**Garnier et al., 1961**).

I-3.1 Noms vernaculaires

En Français : Cyprès, Cyprès pyramidal, Cyprès toujours vert, Cyprès d'Italie, Cyprès femelle, Cyprès fastigié.

En Anglais : Evergreen Cypress, Italian Cypress, Upright Cypress.

En Allemand : Immergrüne Cypresse, Italienische Cypresse, Pyramiden Cypresse.

En Espagnol : Cipres comun.

En Italien : Cipresso (**Garnier et al., 1961 ; Bonnier, 1990**).

I-3.2 Systématique

Embranchement : Spermaphytes

Sous-Embranchement : Gymnospermes

Classe : Conifères

Ordre : Coniférales

Famille : Cupressacées

Genre : *Cupressus*

Espèce : *Cupressus sempervirens* L. (**Quezel et Santa, 1962**).

I-3.3 Description botanique

Le cyprès est un arbre, qui peut atteindre 25 mètres de hauteur. Il a un tronc élancé d'où partent de nombreuses branches ramifiées disposées en longue cyme pyramidale étroite et aigue. L'écorce est d'un gris rougeâtre et fissurée.

Les feuilles persistantes, en forme d'écailles, triangulaires, d'un vert foncé, imbriquées sur 4 rangs, revêtent entièrement les rameaux.

Les cônes fructifères, arrondis, et d'un gris brun un peu luisant, ont 2 à 3 cm de diamètre et se composent de 8 à 12 écailles ligneuses et élargies au sommet, en forme de têtes de clou polygonales, qui s'écartent à maturité pour laisser échapper les graines (**Garnier et al., 1961 ; Bonnier, 1990**) (figure 3).



Figure 3 : Photo d'un rameau de *Cupressus sempervirens* L.

I-3.4 Distribution et Habitat

C'est une des espèces typiques de la région méditerranéenne. Il est sensible au froid, résistant à la sécheresse, et assez exigeant en lumière.

Le cyprès est très peu exigeant quant à la nature du sol, il tolère aussi bien les sols acides que les sols calcaires, à condition qu'ils soient assez profonds (**Becker et al., 1982**).

I-3.5 Usages thérapeutiques

L'essence extraite des feuilles écailleuses et le résidu de leur distillation sont employés pour soigner la coqueluche et diverses affections pulmonaires (dont l'emphysème) (**Bellakhder, 1997**).

Les cônes de Cyprès sont reconnus pour leurs propriétés astringentes et vasoconstrictrices. Elles sont employées pour soigner les troubles de la circulation (varices, métrorragies et autres troubles de la ménopause) (Bellakhder, 1997 ; Girre, 2001) ; mais c'est surtout pour le traitement des hémorroïdes (affaissement des bourrelets, diminution de la douleur et du flux sanguin) (Garnier et al., 1961 ; Becker et al., 1982).

L'insuffisance circulatoire au niveau des membres inférieurs est pareillement combattue en utilisant ces cônes que l'on peut, en outre, tenir pour antihémorragiques, antitussives, diurétiques (et en même temps efficaces contre l'énurésie des enfants).

Quant aux rameaux, on les considère comme antiseptiques et antispasmodiques (Bellakhder, 1997).

Le cyprès soigne également les rhumes, la grippe, les maux de gorge et les douleurs rhumatismales (Larousse, 2001).

I-3.6 Travaux antérieurs

Madar et al. (1995) ont isolé à partir de l'écorce de *Cupressus sempervirens*, infecté par le champignon *Diplodia pinea* f. sp. *Cupressi*, deux terpénoïdes antifongiques : le 6-isopropyltropolone β -glucoside et le 5-(3-hydroxy-3-méthyle-trans-1-butényle)-6-isopropyltropolone β -glucoside, nommés Cupressotropolone A et B, respectivement. Ces glucosides tropolones inhibent la germination *in vitro* des spores de *Diplodia pinea* f. sp. *cupressi*, de *Seiridium cardinale*, d'*Alternaria alternata* et de *Verticillium dahliae*.

Tapondjou et al. (2005) rapportent que l'huile essentielle des feuilles de *Cupressus sempervirens* L., récolté en Cameroun, contient les constituants majoritaires suivants : le sabinène (14.8%), le terpinène-4-ol (11.2%) et l' α -pinène (9.9%).

Ils ont constaté également que cette huile cause une mortalité significative de *Sitophilus zeamais* et *Tribolium confusum* (insectes qui affectent les grains de maïs).

Sacchetti et al. (2005) ont démontré que l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* est constituée de 89,2% d'hydrocarbures monoterpéniques, 9,06% de monoterpènes oxygénés, 1,22% de cétones et de 0,97% d'hydrocarbures sesquiterpéniques. Les composés majoritaires mis en évidence sont : le sabinène (39,6%), l' α -pinène (19,3%), le 4-terpinéol (7,34%), le limonène (7,3%) et le γ -terpinène (6,14%).

En 2006, Tognolini et al., ont effectué une analyse de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L. Les résultats obtenus montrent que cette huile est constituée de 49,69% de monoterpènes non-oxygénés, 11,44% de monoterpènes oxygénés, 12,67% de sesquiterpènes hydrocarbonés et de 12,23% de sesquiterpènes oxygénés. Les composés majoritaires mis en évidence sont : l' α -pinène (26,37%), le δ -3-carène (7,46%) et le limonène (6,4%).

II- Substances actives des plantes

Une plante médicinale et plus précisément une drogue végétale, est à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives. Parmi ces substances, on trouve les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes. Ces composés constituent les grandes familles de métabolites secondaires des plantes, qui sont doués d'activité pharmacologiques et toxicologiques.

II-1 Composés phénoliques

II-1.1 Définition

Les polyphénols constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (**Lugasi et al., 2003**).

Les composés phénoliques ont tous en commun la présence d'une ou de plusieurs fonctions hydroxyles. Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient par la complexité et le degré de modifications du squelette de base (**Macheix et al., 2005**).

II-1.2 Activités biologiques

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir :

- Dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...) (**Macheix et al., 2005**) ;
- Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux (**Dixon et Paiva, 1995 ; Lebham, 2005**).
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par transformation (**Macheix et al., 1990 ; Fleuriet et al., 1996**) ;
- Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini (**Macheix et al., 2005**) ;

- Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Lacaille-Dubois et Wagner, 1996 ; Raskin et al., 2002**).

II-1.3 Flavonoïdes

II-1.3.1 Définition

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux (**Guignard, 1996**). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (**Gabor ,1988**).

II-1.3.2 Structure

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ (**figure 4**) (**Bruneton, 1999**).

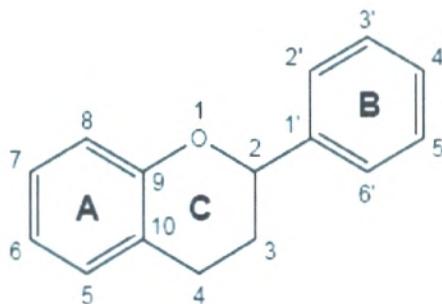


Figure 4 : Squelette de base des flavonoïdes.

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (**Medić-Šarić et al., 2004**).

II-1.3.3 Biosynthèse

Elle se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone (**figure 5**). Cette chalcone métabolisée sous l'action d'une enzyme, la chalcone isomérase, en naringénine. Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner : apigénine ou le dihydroflavonol. Ce dernier, en présence de la flavonol synthase, se métabolise en kaempférol ou en leucoanthocyanidol, qui semble être le précurseur des flavan-3,4-ols et anthocyanidols, qui sous l'action de la 3-O-glycosyltransférerase, se transforme en anthocyanoside (**Marfak, 2003**).

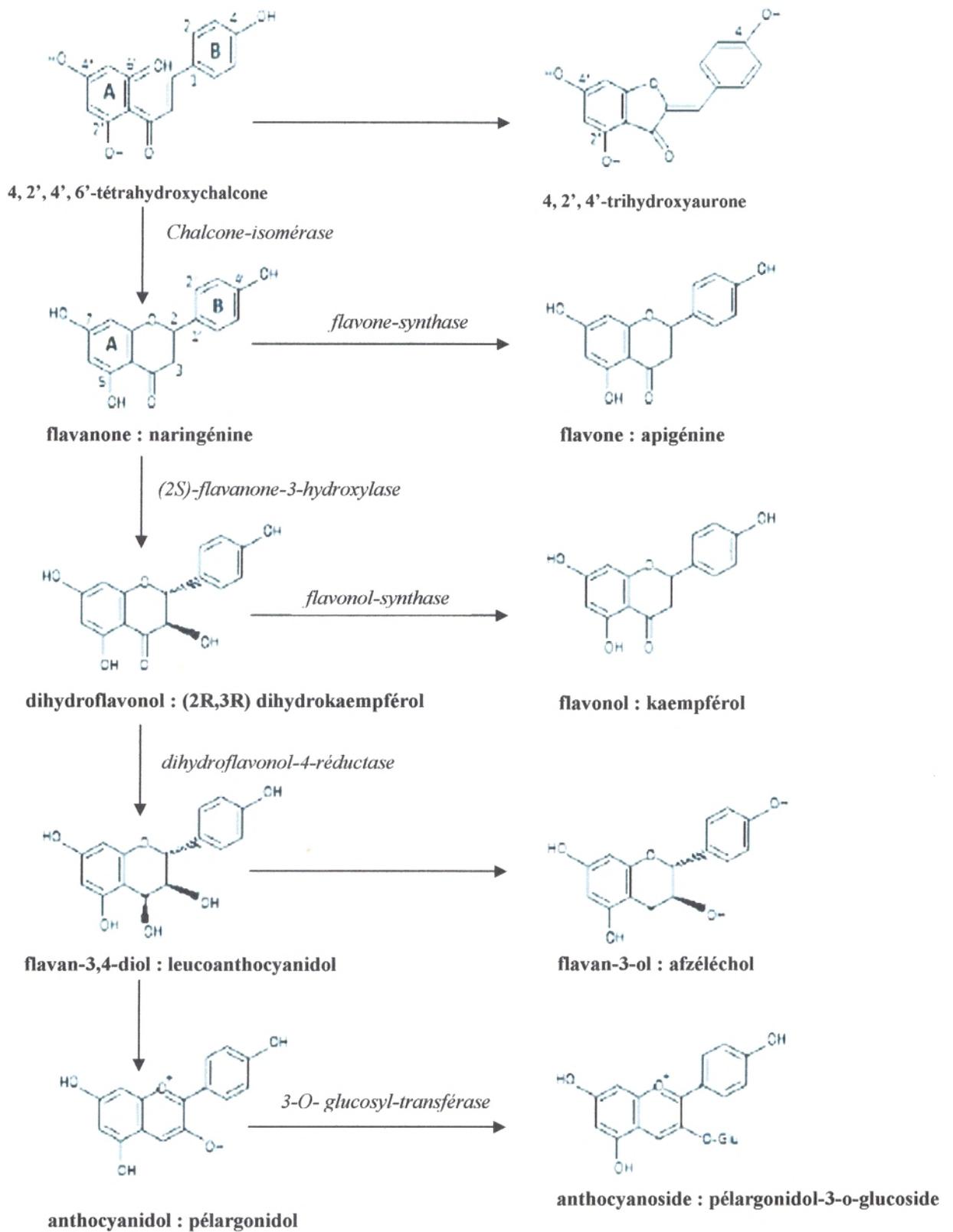


Figure 5 : Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

II-1.3.4 Propriétés biologiques

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-cancéreuses... (Middleton et Kardasnam, 1993) Par exemple, les proanthocyanidols présents dans le vin rouge, peu dans le vin blanc, ont une activité protectrice contre l'infarctus du myocarde et s'opposeraient aux processus de formation des plaques athéromateuses dans nos artères (Leake, 1997).

Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres (Puppo, 1992). Ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (Hadi, 2004). Les plantes contenant les flavonoïdes possèdent de fortes propriétés antioxydantes (Raj et Shalini, 1999 ; Badami et al., 2003).

II-1.4 Tanins

II-1.4.1 Définition

Les tanins sont des composés phénoliques de structures variées, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 (Bruneton, 1999).

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins différents : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Haslam, 1989 ; Clifford et Scalbert, 2000 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

✦ tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables (figure 6), sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique (cas des tanins galliques) soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (cas des tanins ellagiques).

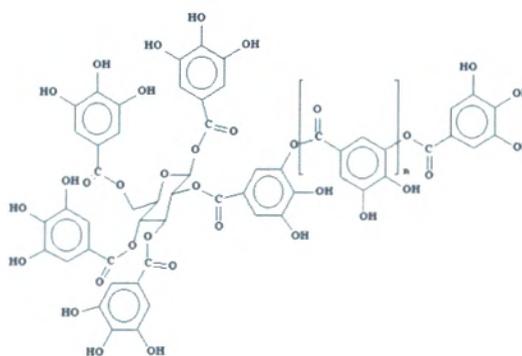


Figure 6 : Exemple de tanins hydrolysables (Monties, 1980).

Ils sont abondants chez les dicotylédones et certains arbres en sont des sources industrielles : tanins de chêne, de châtaigner, de Chine ou de Turquie extraits respectivement d'un arbuste du genre *Rhus* ou de *Quercus tinctoria*.

✦ tanins condensés

Les tanins condensés (**figure 7**), sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées « proanthocyanidines ».

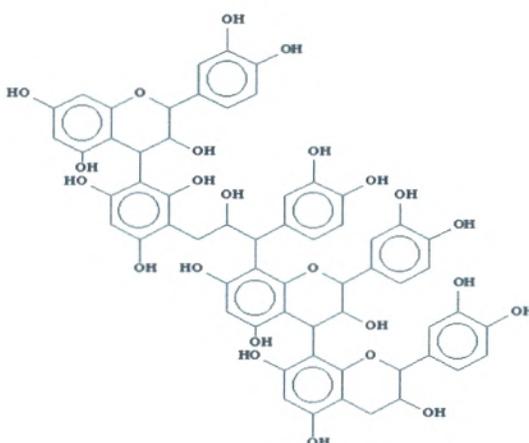


Figure 7 : Exemple de tanins condensés (Monties, 1980).

Ils sont très abondants dans certains organes végétaux consommés ou utilisés par l'homme, par exemple de nombreux fruits (pomme, prune, fraise...) ou des boissons fermentées ou non (thé, vin, cidre...).

II-1.4.2 Propriétés biologiques

Les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols (**Lugasi et al., 2003**). L'astringence est la capacité des tanins à former des complexes stables avec les protéines et les sucres qui leur confère leurs propriétés gustatives et leur astringence (**Bravo, 1998 ; Vergé et al., 1999**).

Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures. Ils ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels.

De plus, ils exercent un effet antidiarrhéique et antiseptique (antibactérien et antifongique) (**Bruneton, 1999**).

II-2 Composés terpéniques

II-2.1 Saponosides

II-2.1.1 Définition

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux.

Structurellement, les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine : saponosides à génine stéroïdique et saponosides à génine triterpénique (**Bruneton, 1999**).

II-2.1.2 Propriétés biologiques

Les saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque fongique ;

Ils sont dépourvus quasiment d'activité antibactérienne et sont parfois actifs, *in vitro*, sur des virus ;

Il n'est pas rare que les saponosides soient cytotoxiques, voire même antitumoraux ;

Les saponosides possèdent des propriétés anti-inflammatoires, anti-oedémateuses antitussives et analgésiques ;

Ils possèdent également des propriétés édulcorantes, largement utilisées dans la formulation de boissons ou de confiseries (**Bruneton, 1999**).

II-2.2 Huiles essentielles

II-2.2.1 Définition

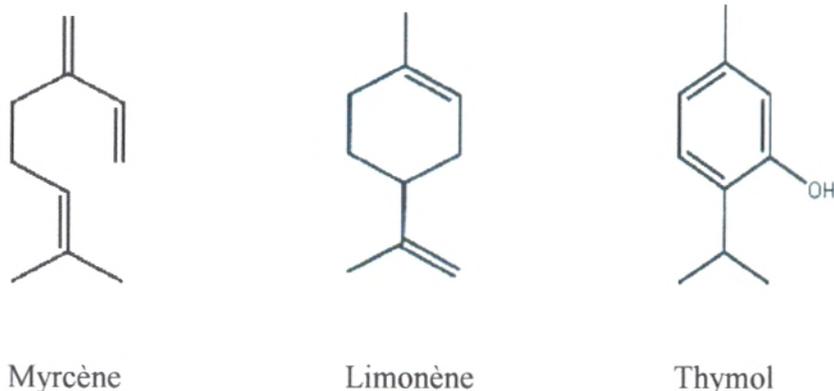
La norme **AFNOR NF T 75-006** (Février 1998), a donné la définition suivante d'une huile essentielle : « Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

II-2.2.2 Composition chimique

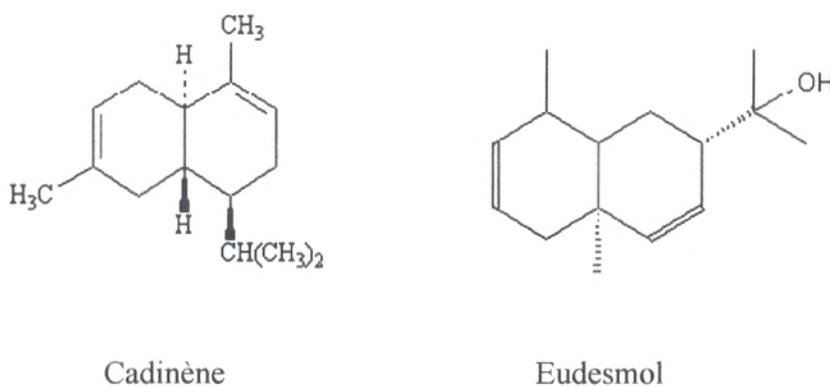
Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des :

1. Mono- et sesquiterpènes

Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (**Bruneton, 1999**) et qui sont à la base de leurs propriétés olfactives (**Ganou, 1993**) (**figure 8**).



Monoterpènes



Sesquiterpènes

Figure 8 : Exemples des composants terpéniques (Ganou, 1993).

2. Composés aromatiques :

Ils sont néanmoins importants sur le plan qualitatif et quantitatif chez certaines huiles essentielles, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc... (Cu, 1990).

- **Les dérivés du phénylpropane (C₆-C₃)** : sont beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes (Bruneton, 1999). On peut citer : l'acide de l'aldéhyde cinnamique, l'eugénol, le safrole, l'anéthole et l'aldéhyde anisique (Paris et Hurabielle, 1981).

- On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C₆-C₁ comme la vanilline ou comme l'anthranilate de méthyle (Bruneton, 1999).

II-2.2.3 Activités biologiques

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires (Pellecuer

et *al.*, 1980) ou au niveau de la microflore vaginale (Viollon et Chaumont, 1994) et d'origine fongique contre les dermatophytes (Chaumont et Leger, 1989).

Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques (Zambonelli et *al.*, 2004).

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (Zambonelli et *al.*, 2004) et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Mangena et Muyima, 1999).

Kurita et *al.* (1979 ; 1981) ont classé les composés purs selon leur activité antifongique vis-à-vis de sept champignons. L'activité décroît selon le type de fonctions chimiques :

⊕Phénols >Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures⊙

Et l'addition de groupements alkyl au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique (Hernandez, 2005).

Tableau 1 : Activité biologique des molécules aromatiques selon leur fonction chimique (Hernandez, 2005).

Composés aromatiques	Propriétés
Phénols (Carvacrol, Eugénol)	Stimulantes, Toniques, Antiseptiques, Bactéricides, Fongicides, Anti-virale, Antiparasitaires, Irritantes
Alcools terpéniques (Géraniol, Citronellol)	Anti-inflammatoires, Antiseptiques, Bactéricides, Fongicides, Anti-virale, Neurotoniques
Aldéhydes terpéniques (Citronellal, Citral)	Antifongiques, Sporicides, Toxicité liée à la présence du groupe aldéhyde, Insecticide
Ether-oxydes, peroxydes (Cinéol)	Antibactériens, Antifongiques, Insecticides
Cétones (Carvone)	Calmantes, Antivirales, Antifongiques Neurotoxiques, Anti-épileptique
Hydrocarbures monoterpéniques (limonène), sesquiterpènes	Fongistatiques, Bactériostatiques, Insecticides

II-3 Alcaloïdes

II-3.1 Définition

Le terme alcaloïde a été introduit au début du XIX^{ème} siècle par W. Meisner ; il rappelle le caractère alcalin de ces substances, mettant à profit leur extraction et leur dosage (**Bruneton, 1999**).

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétale, azotés, basiques, de distribution restreinte et douées, à faibles doses, de propriétés pharmacologiques marquées (**Paris et Hurabielle, 1981**).

A l'état naturel, ils sont généralement salifiés par les acides organiques (tartrates, malates, ...) ou combinés à des tanins (**Guignard et al., 1985**).

On distingue trois classes d'alcaloïdes:

➤ alcaloïdes vrais

Ils existent à l'état de sels et sont biosynthétiquement formés à partir des acides aminés.

➤ Pseudo-alcaloïdes

Ils présentent, le plus souvent, toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés.

➤ Proto-alcaloïdes

Se sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés (**Bruneton, 1999**).

II-3.2 Propriétés biologiques

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques variées et diversifiées :

➤ au niveau du système nerveux central

Ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine,...) ou stimulants (strychnine, caféine,...).

➤ au niveau du système nerveux autonome

Certains sont des sympathomimétiques (éphédrine), sympatholytiques (yohimbine, certains alcaloïdes de l'ergot de seigle,...), parasympathomimétiques (ésérine, pilocarpine), anticholinergiques (atropine, hyoscyamine,...) ou ganglioplégiques (spartéine, nicotine,...)

➤ D'autres ont des propriétés d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine), d'antitumoraux (vinblastine, ellipticine), d'antipaludiques (quinine),... (**Bruneton, 1999**).

III- Stress oxydant et antioxydants

La recherche de ces deux dernières décennies a montré que de nombreuses pathologies humaines sont causées ou favorisées par le stress oxydant, situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Pour lutter contre cette production excessive de radicaux libres, notre organisme est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydantes. Un moyen simple pour augmenter ces défenses endogènes est de favoriser un régime alimentaire riche en antioxydants.

III-1 Stress oxydatif

III-1.1 Définition

Le stress oxydatif représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives (EOR), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

III-1.2 Origine du stress oxydatif

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (**Favier, 2003**).

III-1.3 Radicaux libres

III-1.3.1 Définition

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique.

Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule. Ils ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) (**Sen et al., 2000**).

Les principaux radicaux libres sont l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le radical hydroxyle OH^{\cdot} et le monoxyde d'azote NO^{\cdot} (**Yoshikawa et al., 2000**). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet O_2^{\cdot} , le peroxyde d'hydrogène

(H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Favier, 2003).

III-1.3.2 Origine des radicaux libres

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques (figure 9) afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées.

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450.

Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres (Favier, 2003).

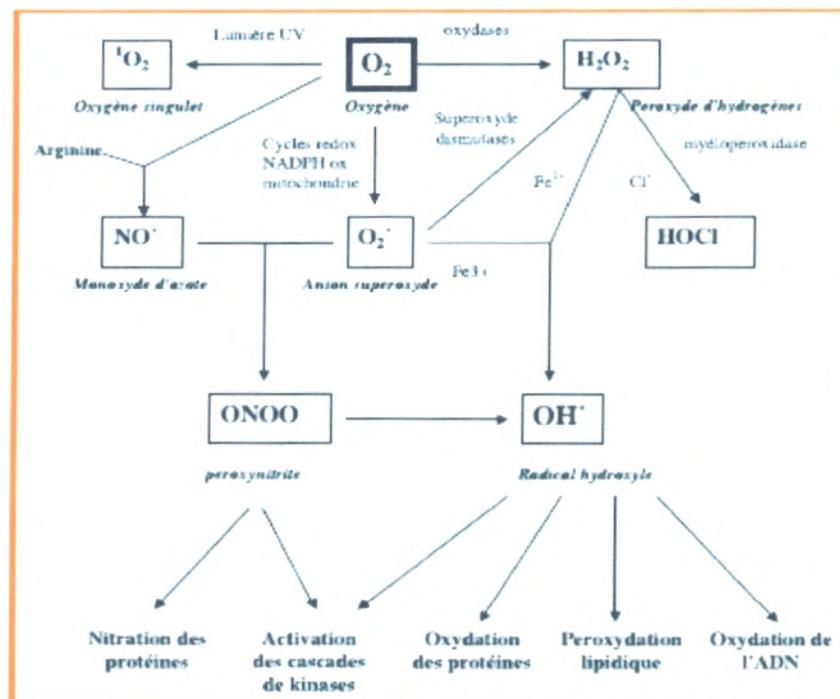


Figure 9 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

III-1.4 Conséquences du stress oxydant

Lors d'un stress oxydant, les EOR non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules directement à leur contact, contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines, et l'ADN.

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle, réaction appelée peroxydation lipidique (**Esterbauer et al., 1992**).

La toxicité des radicaux libres s'exerce également sur les protéines. Ils sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Ils sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques (**Dean et al., 1997**).

L'ADN, est également une cible majeure des EOR. Ces derniers provoquent des altérations structurales qui lorsqu'elles ne sont réparées entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (**Sen et al., 2000**).

Le stress oxydant, principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire. Il est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Montagnier et al. 1998**). Le stress oxydant est également impliqué dans des affections aussi diverses que l'arthrite (**Hitchon et El-Gabalawy, 2004**), la maladie de Parkinson (**Norris et Giasson, 2005**) et la maladie d'Alzheimer (**Moreira et al., 2006**). Enfin, le stress oxydant est également un mécanisme majeur dans le vieillissement physiologique (**Harman, 2003**).

III-2 Antioxydants

III-2.1 Définition

Les antioxydants sont des substances qui retardent ou inhibent l'oxydation d'un substrat quand ils sont présents à faible concentration comparée à celle du substrat (**Halliwell et Gutteridge, 1990 ; Gate et al., 1999**). Elles représentent un système de protection cellulaire face à la réactivité des espèces oxygénées (**Sen et al., 2000**).

III-2.2 Antioxydants endogènes

L'organisme dispose d'une large gamme d'antioxydants endogènes sous forme de systèmes enzymatiques, ou non enzymatiques :

III-2.2.1 Antioxydants enzymatiques

> Superoxydes dismutases

La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en dioxygène et H_2O_2 selon la formule :



(Johnson et Giulivi, 2005 ; McCord et Edeas, 2005).

> Catalases

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en libérant de l'oxygène et de l'eau (Fontaine et al., 2002).

> Glutathions peroxydases (GPX)

Elles détruisent non seulement le H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol (Ganther, 1999).

IV-2.2.2 Antioxydants non enzymatiques

Il existe des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit (Favier, 2003).

III-2.3 Antioxydants naturels

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les antioxydants d'origine naturelle ». Les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E) et l'acide ascorbique (vitamine C) sont des antioxydants essentiels pour l'homme dont les apports peuvent prévenir et même aider au traitement des maladies liées au stress oxydant. Il existe de nombreux autres antioxydants. Parmi ces substances, certaines sont regroupées dans le grand groupe des polyphénols. Bien que non essentielles, ces substances jouent pourtant un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant (Curtay et Robin, 2000). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre, le zinc et le manganèse qui sont des co-facteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydants (Favier, 2003).

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orangée à rouge. Ils sont présents dans les carottes, les fruits rouges et jaunes, les légumes verts et les tomates (Marc et al., 2004). Les principaux caroténoïdes sont le β -carotène (provitamine A), le lycopène et la lutéine. Malgré la similarité de leur structure, ils exercent différentes fonctions biologiques, dont certains préviennent ou contrôlent efficacement la génération de radicaux libres. Le lycopène, le pigment rouge extrait de la tomate, piège les radicaux libres avec une efficacité supérieure d'au moins 70 % à celle du β -carotène (Hughes et al., 1997). La lutéine, concentré dans la région maculaire de la rétine, possède une propriété antioxydante qui s'exerce au travers d'une fonction de filtre de lumière de la lumière bleue et de capteur de

l'oxygène singulet dans les tissus rétiniens, prévenant ainsi la dégénérescence première cause de cécité chez la personne âgé (**Blumberg, 1997 ; Landrum et al., 1997**).

La vitamine E est le principal antioxydant liposoluble (**Ré et al., 2005**). Il doit être apportée sous les deux formes α et γ en quantités équivalentes, pour assurer la protection de l'oxydation des lipoprotéines et des acides gras insaturés des membranes lipidiques (**Esterbauer et al., 1991**). En l'absence de systèmes de régénération appropriés, la vitamine E peut avoir des effets pro-oxydants (**Brigelius-Flohe et Traber, 1999**). La vitamine E est abondante dans les germes de blé, les légumes verts, les corps gras (Huile de tournesol, de soja, de maïs, le beurre), les oeufs, et les noix (**Marc et al., 2004 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

La vitamine C est l'antioxydant hydrosoluble majeur, efficace contre les radicaux peroxydes, hydroxyle et superoxyde ainsi que contre le peroxinitrite (**Ré et al., 2005**). Il est également capable de réduire les métaux de transition et donc d'avoir des effets prooxydants (**Buettner et Jurkiewicz, 1996 ; Carr et Frei, 1999**). La vitamine C est abondante dans les agrumes, les fruits rouges, les pommes de terre primeur, les brocolis (**Marc et al., 2004**).

Les composés phénoliques ont ainsi été décrits comme étant des antioxydants (**Middleton et al., 2000**). Ils sont en effet capables d'empêcher l'oxydation des LDL (**Leake, 1998 ; Osakabe et al., 2002**). La consommation d'aliments riches en composés phénoliques peut donc se révéler bénéfique pour inhiber l'oxydation des LDL (**Bagchi et al., 2003**). Les études *in vivo* conduites sur le rat et les études épidémiologiques des vingt dernières années ont montré que la présence d'antioxydants phénoliques dans le sang permet de limiter l'infarctus du myocarde (**Rice-Evans et Packer, 2003**). Ils puissent également protéger l'ADN de la dégradation oxydative (**Feng et al., 2002**).

Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer, qui à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres (**Puppo, 1992**). Ils protègent les LDL vis-à-vis de l'oxydation (**Leake, 1998**). Le caractère antioxydant des flavonoïdes contribue à la prévention de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (**Cooke, 1998**) et les cancers (**Hertog et al., 1993**). L'effet protecteur des flavonoïdes dépend de leur structures : la présence de deux hydroxyles voisins sur le cycle B augmente l'activité alors que la glycosylation en position 3 la diminue (**Rice-Evans et Packer, 1998**).

La seconde famille des polyphénols, représentée par les anthocyanes, se trouve en quantité importante dans certains fruits, en particulier dans les baies de fruits rouges

(myrtilles, cassis...), ainsi que dans les raisins rouges, les fraises et les framboises. Ces anthocyanes se retrouvent, par exemple, dans les vins connus pour leur action protectrice contre les maladies cardiovasculaires (**Cheng, 1999**). Quant aux extraits (pépins) de raisin, un des antioxydants naturels les plus puissants, ils inhibent la formation anormale de thrombus et protègent de certains cancers (**Lapidot et al., 1999**).

L'action des polyphénols ne sera totalement efficace qu'en présence des tanins, avec entre autre, la famille des catéchines dont le principal représentant est l'épigallocatechingallate (EGCG), le principal ingrédient du thé vert. Celui-ci contient les plus puissants antioxydants polyphénoliques (**Chen et Chan, 1996**) avec une activité antiradicalaire aussi puissante que celle de la vitamine E (**Fourneau et al., 1996**).

Partie Expérimentale

I- Introduction

De nos jours, la découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Ces composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à détecter et doser certains principes actifs existants dans la plante. Ces derniers peuvent servir, non seulement à la découverte des agents thérapeutiques, mais parce qu'ils peuvent être aussi à l'origine de la révélation de nouvelles sources de matériaux économiques.

II- Matériel végétal

II-1 Origine géographique et période de récolte

Les plantes ont été récoltées au mois de novembre 2007 dans trois stations différentes (figure 10).

 *Juniperus phoenicea* L. : station de *Sidi Safi*.

 *Juniperus oxycedrus* L. : station de *Khemis*.

 *Cupressus sempervirens* L. : station de *Maghnia*.

II-2 Identification botanique

L'identification botanique a été faite par le professeur **Benabadji N.** au Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.

II-3 Préparation du matériel végétal

Après la récolte du matériel végétal, les feuilles sont isolées et séchées à l'ombre dans un endroit bien aéré, puis elles sont récupérées dans des sacs propres.

Notant qu'une certaine quantité des feuilles de chaque plante a été broyée, puis conservée dans des flacons, en verre hermétiquement fermés, au congélateur. Ces poudres seront soumises à des tests afin de détecter les différentes classes de composés chimiques existants dans ces espèces, puis de les extraire.

III- Tests phytochimiques

La détection des différentes classes de composés chimiques existants dans la plante est l'un des buts essentiels de l'examen phytochimique. Ceci constitue la première étape dans la recherche des molécules à activités thérapeutiques.

Les tests physicochimiques sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

III-1 Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 50 g de matériel végétal est mis en présence de 300 mL d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests suivants :

III-1.1 Amidon

Le test effectué consiste à :

- ✓ Chauffer 5 mL de l'extrait aqueux avec 10 mL d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition ;
- ✓ Ajouter le réactif d'amidon (**Annexe D**).

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

III-1.2 Saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 mL de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est abandonné pendant 20 minutes et 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 Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 mL de l'extrait aqueux, 1 mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins.

III-2 Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 50 g de matériel végétal est mis en présence de 300 mL d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests suivants :

III-2.1 Alcaloïdes sels

Leur détection consiste à :

- ✓ Evaporer à sec 20 mL de l'extrait éthanolique ;
- ✓ Ajouter 5 mL d'HCl (10 %) au résidu obtenu, puis chauffer dans un bain marie ;
- ✓ Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de NH₄OH (10 %) jusqu'au pH 9 ;
- ✓ Extraire la solution avec l'éther diéthylique, ensuite concentrer à sec ;
- ✓ Dissoudre le résidu dans du HCl (2%) ;
- ✓ Tester la présence des alcaloïdes par les réactifs de Mayer et de Wagner (**Annexe D**).

La formation d'un précipité blanc et d'un précipité brun respectivement avec ces réactifs indique la présence des alcaloïdes.

III-2.2 Flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 mL de l'extrait éthanolique avec 1 mL d'HCl concentré et 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 tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 mL de l'extrait éthanolique, 2 mL d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue – noire (tanins galliques), verte ou bleue – verte (tanins cathéchiques).

III-2.4 Composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 mL de l'extrait éthanolique avec 2 mL d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge - brique.

III-2.5 Anthracénosides, coumarines et anthocyanosides

Pour mettre en évidence ces composés, il faudra suivre les étapes suivantes :

- ✓ Ajouter 15 mL d' HCl (10%) à 25 mL de l'extrait éthanolique ;

- ✓ Porter l'ensemble à reflux pendant 30 minutes ;
- ✓ Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 mL d'éther ;

Ensuite, chacune de ces familles est détectée séparément :

a) Anthracénosides

La détection des anthracénosides est réalisée par le réactif de Bornträger (**Annexe E**), en traitant 8 mL de la solution extractive étherique par ce dernier. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée – rouge au violet – pourpre.

b) Coumarines

Leur détection consiste à :

- ✓ Evaporer à sec 5 mL de la solution extractive étherique ;
- ✓ Dissoudre le résidu obtenu dans 1 mL d'eau chaude, puis diviser le volume en deux parties ;
- ✓ Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 mL de NH_4OH (10 %) ;
- ✓ Mettre deux tâches sur un papier filtre et examiner sous la lumière U.V.

La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense.

c) 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 confirmée.

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

III-2.6 Stérols et stéroïdes

Deux essais ont été effectués :

✗ **Essai 01** : Il consiste à :

- ✓ Evaporer à sec 10 mL d'extrait éthanolique ;
- ✓ Traiter le résidu obtenu avec 10 mL de chloroforme anhydre puis filtrer ;
- ✓ 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 fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C).

✗ **Essai 02** : Il consiste à :

- ✓ Evaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 mL ;
- ✓ 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 (**Annexe E**).

Si cette réaction donne des colorations verte –bleue et verte – violette, elle indique la présence des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement.

III-3 Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 50 g de matériel végétal est mis en présence de 300 mL d'éther diéthylique. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait étherique est soumis aux tests suivants :

III-3.1 Huiles volatiles

La détection des huiles volatiles consiste à :

- ✓ Evaporer à sec 20 mL de l'extrait étherique ;
- ✓ Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- ✓ Concentrer à sec la solution alcoolique obtenue.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme.

III-3.2 Acides gras

L'essai effectué consiste à :

- ✓ Concentrer à sec 20 mL de la solution étherique ;
- ✓ Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- ✓ Traiter la solution alcoolique avec une solution base de soude ou de potasse ;
- ✓ Ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique ;
- ✓ Concentrer à sec la solution étherée.

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

III-3.3 Alcaloïdes bases

Le test de présence des alcaloïdes bases consiste à :

- ✓ Evaporer à sec 10 mL de l'extrait étherique ;
- ✓ Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 mL d'HCl (2%) ;
- ✓ Ajouter 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer.

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

III-3.4 Emodols

La détection des émodols consiste à :

- ✓ Evaporer à sec 3 mL de l'extrait étherique ;
- ✓ Dissoudre le résidu obtenu dans 1 mL de NH₄OH concentré ;
- ✓ Traiter la solution avec le réactif de Bornträger.

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

IV- Extractions sélectives- Analyses

Après la mise en évidence des différentes familles de composés dans la partie étudiée des plantes, nous avons ciblés les familles qui sont prépondérantes dans cette dernière. Par conséquent, la deuxième étape de notre travail consiste à extraire ces différentes familles selon des méthodes d'extractions sélectives. Cette opération est suivie d'une analyse des extraits par des méthodes chromatographiques ou par des dosages spectrophotométriques.

IV-1 Les huiles essentielles

IV-1.1 Technique d'extraction

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée au moyen d'un extracteur semi industriel fonctionnant avec le principe d'entraînement à la vapeur d'eau. Le montage est constitué d'un ballon métallique contenant 5 litres d'eau, posé au dessus d'une source de chaleur et surmonté d'une enceinte métallique contenant le matériel végétal placé sur une grille (**Annexe S**). L'enceinte est reliée à son tour à des réfrigérants qui condensent les vapeurs que l'on recueille sous forme de distillat dans une fiole à décanter. Cette phase est séchée sur du sulfate de magnésium. L'échantillon d'huile essentielle obtenu est conservé à -18°C jusqu'à analyse.

IV-1.2 Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal sec à traiter (**Carré, 1953**).

$$R = (M/M_0) \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle exprimé en %.

M : Masse en grammes de l'huile essentielle.

M₀ : Masse en grammes du matériel végétal sec à traiter.

IV-1.3 Analyse par CPG/SM

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la technique la plus adaptée pour l'analyse des huiles essentielles compte tenu de la volatilité de leurs constituants (**Bruneton, 1999**).

C'est une méthode d'analyse qui permet d'opérer la séparation des composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit. Elle est applicable aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (**Arpino et al., 1995**).

Toutefois, cette analyse ne peut suffire à une bonne identification sans l'apport de la spectrométrie de masse (SM).

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) (**figure 11**), en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée. Elle permet d'obtenir le spectre de masse de molécules séparées par la CPG et de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé (**Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996**).

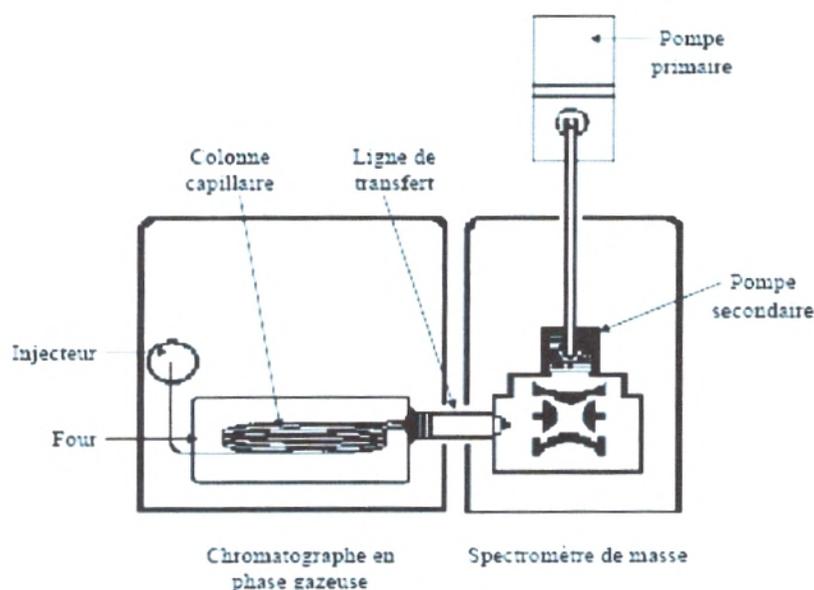


Figure 11 : Schéma d'un appareil de couplage CG-SM.

IV-1.3.1 Conditions opératoires

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe Hewlett-Packard 6890N, muni d'un injecteur automatique couplé à un spectromètre de masse Hewlett-Packard HP 5973.

- Gaz vecteur : Hélium ;
- Température de l'injecteur : 250°C ;
- Température du détecteur : 250°C ;
- Volume injecté : 0,2 μL ;
- Ionisation par impact électronique à 70 eV ;
- Gamme de détection des ions : 35-400 amu ;
- Colonne capillaire apolaire HP-1 (50 m x 0,2 mm x 0,5 μm) ;
- Programmation de la température : 60°C à 200°C à raison de 2°C/min puis 200°C pendant 120 min.

IV-1.3.2 Identification des constituants

L'identification a été basée sur la comparaison des indices de rétention IR, déterminés par injection d'une série d'alcane linéaires allant de C₇ à C₂₈, avec ceux de la littérature (Jennigs et Shibamoto, 1980 ; Lafferty et Stauffer, 1989 ; Davies, 1990 ; Adams, 1995 ; BACIS, 1999 ; Joulain et König, 1998 ; Joulain et al., 2001), ainsi que la comparaison avec des spectres de références des différentes bibliothèques.

IV-2 Les flavonoïdes

IV-2.1 Préparation des extraits bruts

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 2g de matériel végétal broyé est mis en présence de 100 mL d'un mélange du méthanol aqueux (70:30) (v/v). L'ensemble est porté à reflux pendant 3 h à 70°C. Ensuite, la solution est filtrée et évaporée à sec, en utilisant un Rotavapeur Büchi R-200. Le résidu sec est récupéré par 7 mL de méthanol puis conservé à -18°C. Ce dernier étant l'extrait brut qui sert au dosage des phénols totaux et des flavonoïdes.

IV-2.2 Calcul du rendement des extraits bruts

Le rendement en extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait brut sec et la masse du matériel végétal broyé à traiter.

$$R = (M_1/M_2) \times 100$$

R : Rendement en extrait brut sec exprimé en %.

M₁ : Masse en grammes de l'extrait brut sec.

M₂ : Masse en grammes du matériel végétal broyé à traiter.

IV-2.3 Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits bruts des plantes étudiées a été déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu (Wong et al., 2006).

Une quantité de 100 µL de chaque extrait est mélangée avec 2,5 mL du réactif de Folin–Ciocalteu (10 fois dilué) et laissée réagir pendant 5 minutes. Après, 2,5 mL d'une solution saturée de Na₂CO₃ est ajouté. L'absorbance du mélange de réaction est mesurée à 725 nm après une heure d'incubation à température ambiante.

La quantification des phénols totaux est faite en fonction d'une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique par gramme du poids sec de la plante en poudre.

IV-2.4 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée spectrophotométriquement par la méthode décrite par Kim et al. (2003).

Une quantité de 100 µL de l'extrait brut a été mélangée avec 0,4 mL de l'eau distillé, et par la suite avec 0,03 mL d'une solution de NaNO₂ à 5%. Après 5 minutes d'incubation, 0,02 mL d'une solution de AlCl₃ à 10 % a été ajouté. Après 5 minutes, on ajoute au mélange

0,2 mL d'une solution de Na₂CO₃ 1M et 0,25 mL de l'eau distillée. L'absorbance du mélange de réaction a été mesurée à 510 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée.

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) réalisée par la catéchine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Elle est exprimée en mg équivalent en catéchine par gramme du poids sec de la plante en poudre.

IV-2.5 Préparation des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes

Le résidu sec, obtenu après évaporation du filtrat méthanolique de chaque plante, est repris dans de l'eau bouillante et épuisé dans une ampoule à décanter successivement par l'acétate d'éthyle et le n-butanol avec un rapport de volume égale à 1 (v/v) (**figure 12**) (**Bekkara et al., 1998**). Les extraits obtenus des deux fractions sont évaporés à sec et les résidus secs sont récupérés par 3 mL de méthanol, puis conservés à -18°C.

IV-2.6 Calcul du rendement des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes

Le rendement en fraction AcOEt ou n-buOH des flavonoïdes est défini comme étant le rapport entre la masse de la fraction AcOEt ou n-buOH sèche et la masse du matériel végétal broyé à traiter.

$$R = (M_1/M_2) \times 100$$

R : Rendement en fraction AcOEt ou n-buOH sèche exprimé en %.

M₁ : Masse en grammes de la fraction AcOEt ou n-buOH sèche.

M₂ : Masse en grammes du matériel végétal broyé à traiter.

IV-2.7 Analyse par CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes

L'identification des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) avec des plaques de gel de silice, sur support en aluminium, 20x20 cm.

Trois microlitres (3µL) de chaque extrait sont déposés à des points repères à 1cm du bord inférieur de la plaque.

Après plusieurs essais de systèmes de solvants, nous avons adopté les deux systèmes suivants, selon **Medić-Šarić et al. (2004)** :

- ❑ n-hexane/ acétate d'éthyle/ acide acétique, (31:14:5) (v/v/v) ;
- ❑ Toluène/acétone/acide formique, (38:10:5) (v/v/v).

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 365 nm. Les R_f des spots ont été enregistrés.



Figure 12 : Protocole d'extraction des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes.

IV-3 Les tanins

IV-3.1 Dégraissage du matériel végétal

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 100g de matériel végétal broyé est mis en présence de 150 mL d'éther de pétrole. L'ensemble est porté à reflux pendant 2 heures. Ensuite, le marc est filtré et le solvant est évaporé. Le résidu obtenu sous forme d'un extrait huileux représente la matière grasse.

IV-3.2 Procédé d'extraction

Dans un récipient d'extraction, 100g de matériel végétal dégraissé est mis en présence de 250 mL d'eau distillée et 160 mL d'acétone. L'ensemble est porté à une macération à température ambiante pendant 4 jours. Après filtration et élimination de l'acétone, la solution aqueuse est extraite 2 fois avec 50 mL de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Ensuite, la phase aqueuse est extraite 4 fois avec 50 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue est séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée à sec (**figure 13**). Le résidu sec est repris par un minimum d'acétone qui sera soumis à l'analyse par chromatographie sur couche mince (**Bruneton, 1999**).

IV-3.3 Analyse par CCM

L'analyse par chromatographie sur couche mince a été effectuée avec une plaque de gel de silice, sur support en aluminium, 20x20 cm. On a employé comme éluant le système solvant suivant : acétone/toluène/acide formique, (30:30:10) (v/v/v), selon **Lea (1978)**.

Après développement dans une cuve en verre et séchage, la plaque a été observée sous lampe UV à 365 nm. Les R_f des spots ont été enregistrés.

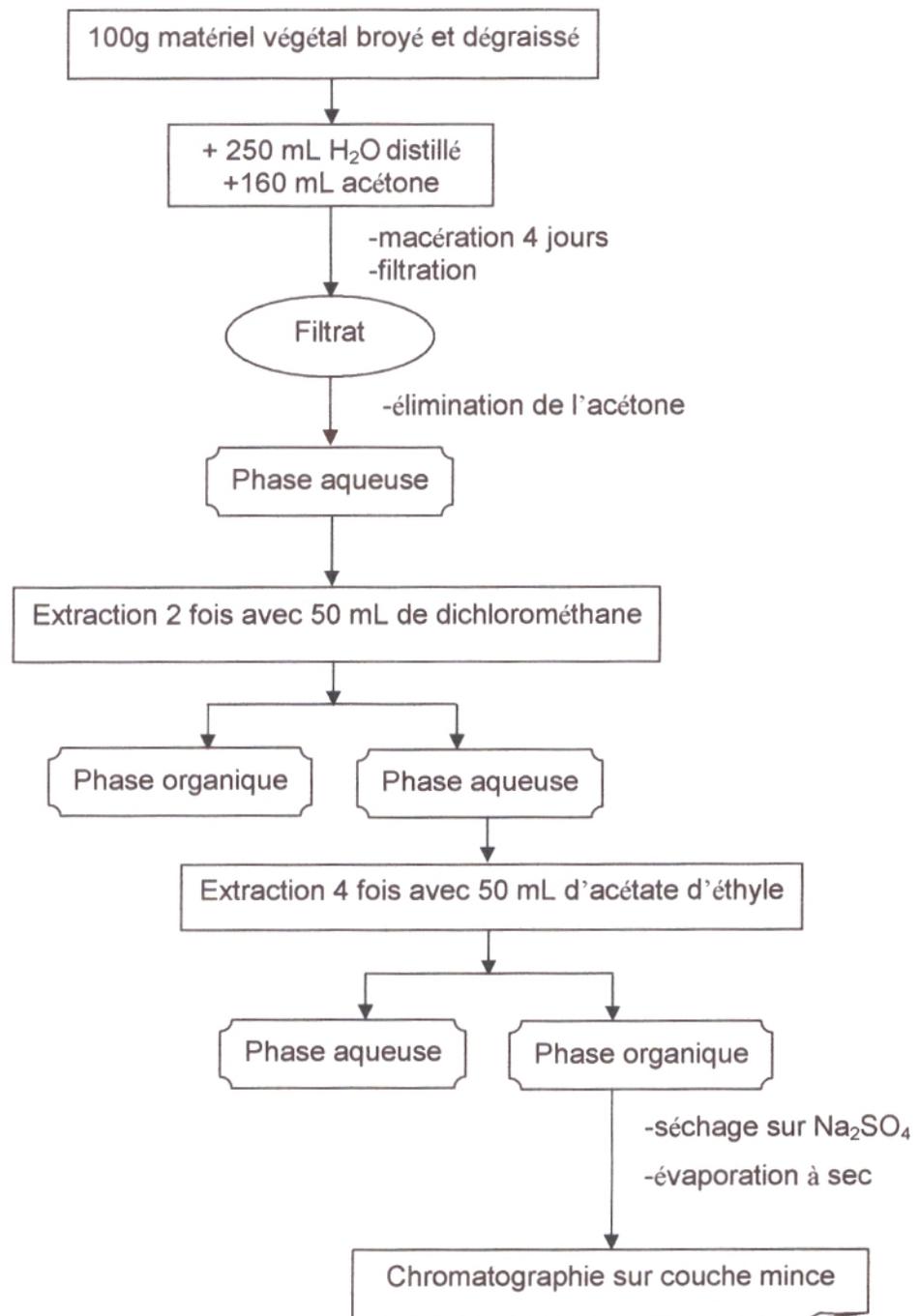


Figure 13 : Protocole d'extraction des tanins.

V- Activités biologiques

V-1 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des antimicrobiens

(Antibiotiques et Antifongique)

Depuis des millénaires, les essences sont exploitées pour leurs propriétés antiseptiques car elles s'opposent au développement des germes et les tuent.

Pour cela, nous avons jugé intéressant de tester l'activité des huiles essentielles de ces plantes vis-à-vis de différentes souches microbiennes, bactéries et moisissures.

Dans cette partie, nous avons traité les points suivants :

- Provenance des germes testés ;
- Effet antimicrobien des antibiotiques et de l'antifongique ;
- Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.

V-1.1 Provenance des germes testés

Les souches utilisées font partie de deux groupes de microorganismes (**Tableau 2**), se sont des contaminants fréquents, provoquant ainsi des infections importantes.

Tableau 2 : Provenance des germes testés

Souches utilisées	Origine
<u>Bactéries</u>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Laboratoire de Microbiologie (Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire) Université de Tlemcen.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	
<u>Moisissures</u>	
<i>Aspergillus flavus</i> (O ₂)	Laboratoire des Produits Naturels Université de Tlemcen
<i>Penicillium</i> spp. (B.T ₂)	
<i>Fusarium oxysporum</i> (F ₁₆)	
<i>Rhizopus stolonifer</i> (O ₁)	

V-1.2 Pouvoir antimicrobien des antibiotiques et de l'antifongique

La sensibilité des souches a été testée vis-à-vis de quelques antibiotiques (**Tableau 3**) et d'un seul antifongique (**tableau 4**).

Tableau 3 : Antibiotiques utilisés

ATB	Sigle	Famille	Charge du disque (µg/disque)
Amoxicilline-Ac Clavulanique	AMC	β-Lactamines	30
Tétracycline	TE	Tétracyclines	30
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	Sulfamides et Associations	25
Céfalexine	CL	Céphalosporines	30

La sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques a été testée par la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

Tableau 4 : Antifongique utilisé

ATF	Sigle	Famille	Concentration (µg/mL)
Amphotéricine B	AB	Macrolide polyénique	200

Nous avons utilisé la même méthode que celle établie pour l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles.

V-1.3 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

V-1.3.1 Méthodes d'étude du pouvoir antibactérien

Lors de cette étude, nous avons testé l'action des huiles essentielles des différentes espèces végétales par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale d'inhibition (CMI).

VI-1.3.1.1 Méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme)

Afin de tester l'activité antibactérienne des huiles essentielles, nous avons utilisé la méthode de l'aromatogramme par diffusion à partir des disques imprégnés d'huile essentielle (Lesueur et al., 2007). Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés d'huile essentielle (15µL), solubilisée dans du DMSO à raison de 10%, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de pétri (3 disques de papier filtre par boîte), préalablement ensemencées en surface en nappe avec 1 mL d'inoculum de concentration précise pendant 5 à 10 min et l'excédent de l'inoculum est éliminé par aspiration.

En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin imbibé par le DMSO (15µL).

Après incubation à $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm, disque inclus.

Trois essais ont été effectués pour chaque huile essentielle.

V-1.3.1.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible du germe (Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999).

Pour déterminer la CMI, l'huile essentielle est disposée dans chaque boîte afin d'effectuer une gamme de concentration de 0,2% à 1% avec pour chacune, son équivalent en DMSO. Puis, 20 mL de gélose Mueller Hinton stériles en surfusion sont ajoutés. Le mélange est alors homogénéisé à la main par de petits gestes circulaires de gauche à droite, puis de bas en haut, et laissé solidifié près de la zone stérile du bec benzène. Un volume de 10µL d'inoculum préalablement préparé est alors déposée sur chaque boîte et étalée avec une pipette râteau (Lesueur et al., 2007).

En parallèle, nous avons utilisé des témoins, comportant de DMSO, afin de vérifier la croissance des différentes souches bactériennes.

Après incubation à $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h, on procède à la lecture des résultats par évaluation de la présence ou l'absence de la croissance bactérienne.

Trois essais ont été effectués pour chaque huile essentielle.

V-1.3.2 Méthode d'étude du pouvoir antifongique

L'essai antifongique contre les moisissures a été estimé par la méthode de contact direct (Fandohan et al., 2004).

Une quantité de 500µL de chaque huile essentielle a été ajoutée à 20 mL du milieu PDA stérile en surfusion pour obtenir une concentration de 2,5% (v/v). Après agitation, les mélanges sont coulés dans des boîtes de Pétri. Un disque mycélien de diamètre de 6 mm, pris de la culture du mycète, a été inoculé dans chaque boîte de Pétri. Le milieu de culture sans huile essentielle a servi de témoin. Les souches ont été incubées à 25 ± 2 °C pendant 48 heures pour *Rhizopus stolonifer* et 7 jours pour les autres souches.

Des mesures de diamètre des colonies ont été faites après la fin de l'incubation. L'action antifongique a été déterminée, par la mesure de l'inhibition de la croissance de la colonie fongique, en utilisant la formule d'Ebbot (Motiejūnaitė et Peičulytė, 2004) :

$$T = \frac{D_K - D_0}{D_K} \times 100$$

D_K : diamètre de la colonie mycélienne du témoin (en cm),

D_0 : diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience (en cm),

T : taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

Trois essais ont été effectués pour chaque huile essentielle.

V-1.4 Préparation des inoculums

V-1.4.1 Bactéries

Les souches conservées dans la gélose nutritive inclinée à 4°C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h, puisensemencées en strie sur boîtes contenant de la gélose nutritive et incubées à $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h. Ensuite, les souches microbiennes sontensemencées sur bouillon nutritif à $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 h.

Après incubation, un certain volume de cette culture est dilué dans de l'eau physiologique pour en avoir une densité optique entre 0,08 et 0,1 à 625 nm, soit environ 10^8 UFC/mL.

La suspension d'inoculum est ensuite diluée 1/10 pour *Staphylococcus aureus* et 1/100 pour les autres souches (Joffin et Leyral, 2001 ; Pessini et al., 2003 ; Careaga et al., 2003).

V-1.4.2 Moisissures

Les souches conservées dans de PDA acidifié inclinée à 4°C, sontensemencées sur le milieu PDA coulé en boîtes de pétri. Ensuite, les boîtes sont incubées à 25 ± 2°C pendant 48 h pour *Rhizopus stolonifer* et 5 jours pour les autres souches.

V-1.5 Milieux de culture

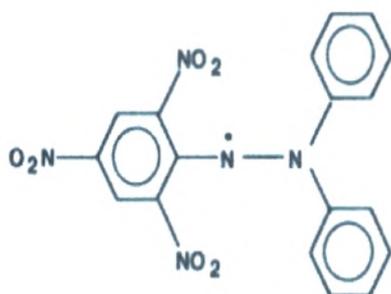
Les milieux de culture utilisés sont :

- ◆ Gélose nutritive, bouillon nutritif et gélose Mueller Hinton (MH) pour les bactéries.
- ◆ Potato Dextrose Agar (PDA) pour les moisissures.

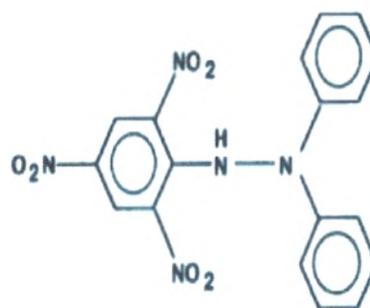
V-2 Pouvoir antioxydant des flavonoïdes

L'essai au DPPH[•] a été largement utilisé pour la détermination de l'activité de piégeage du radical libre de divers plantes et composés purs (Jeller et al., 2004; Murias et al., 2005; Rathee et al., 2006).

Le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical parmi les quelques radicaux libres organiques azotés stables (Brand-Williams et al., 1995). En solution dans le méthanol, le DPPH[•] est caractérisé par une couleur violette sombre dont l'absorption est maximale dans l'intervalle de longueur d'onde [515-528] nm (Sanchez-Moreno, 2002). En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH[•] est réduit à la forme non radicalaire, cette dernière confère à la solution une coloration jaune pâle (figure 14) (Molyneux, 2004).



(1) : Diphénylpicrylhydrazyl
(Radical libre)



(2) : Diphénylpicrylhydrazine
(Forme non radicalaire)

Figure 14 : Forme libre et réduite du DPPH.

V-2.1 L'essai au DPPH'

La capacité de piégeage du radical libre DPPH' de nos extraits a été déterminée en accord avec la méthode décrite par **Leong et Shui (2002)**.

Dans des tubes secs, un volume de 40 µL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 3 mL d'une solution méthanolique du DPPH' 0,1mM, fraîchement préparée. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. L'absorbance est mesurée à 515nm contre un blanc, constitué de 3 mL de méthanol et 40 µL de l'extrait.

Le contrôle négatif est composé de 3 mL de la solution du DPPH' et 40 µL de méthanol.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique, dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

V-2.2 Expression des résultats

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de l'extrait à piéger le radical libre DPPH' est donnée par la formule suivante :

$$AA\% = 100 - [(Abs_{\text{test}}/Abs_{\text{contrôle}}) \times 100] \quad (\text{Mensor et al., 2001}).$$

Ou encore :

$$I\% = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{test}}) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100 \quad (\text{Burits et Bucar, 2000}).$$

Où :

AA% : Activité antioxydante en pourcentage

I% : Inhibition du radical libre DPPH' en pourcentage

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 515 nm.

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures \pm l'écart type.

La valeur EC₅₀ (autrement appelée la valeur IC₅₀) a été déterminée pour chaque extrait. Elle est définie comme étant la concentration de l'extrait qui cause 50% d'inhibition ou bien, c'est la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale de DPPH' (**Brand-Williams et al., 1995**). Les valeurs EC₅₀ ont été calculées par la régression

linéaire où l'abscisse est représenté par la concentration des extraits tests et l'ordonné par l'activité antioxydante en pourcentage.

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire (**Brand-Williams et al., 1995**).

$$(\text{ARP} = 1/\text{EC}_{50})$$

ARP : Puissance antiradicalaire.

EC₅₀: Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale de DPPH.

Résultats et Discussion

I- Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats expérimentaux mentionnés dans le **tableau 5**, montrent la présence des flavonoïdes et des tanins en quantités importantes dans les feuilles des trois plantes étudiées.

Les résultats obtenus montrent également que les feuilles du genévrier rouge sont plus riches en huiles volatiles par rapport à celles du cyprès et du genévrier oxycèdre.

Les saponosides sont présents en faible quantité dans les feuilles du cyprès alors qu'ils sont totalement absents dans celles du genévrier rouge et oxycèdre.

Les coumarines sont présentes en faible quantité dans les feuilles du genévrier rouge et oxycèdre alors qu'elles sont totalement absentes dans celles du cyprès.

L'examen phytochimique nous renseigne aussi sur les faibles quantités des anthocyanosides, des stérols et stéroïdes et des acides gras dans les feuilles des trois plantes.

D'autre part, l'amidon, les composés réducteurs, les alcaloïdes, les anthracénosides et les émодols sont totalement absents dans la partie étudiée des trois plantes.

Les classes prépondérantes seront soumises à des extractions sélectives.

II- Extractions sélectives - Analyses

L'étude phytochimique basée sur des tests de laboratoire a permis de caractériser les familles de composés chimiques existantes dans nos plantes. En effet, il est prouvé que les huiles essentielles, les flavonoïdes et les tanins sont présents en quantités importantes. Ceci nous a incité à effectuer des extractions sélectives de ces derniers afin de déterminer leurs teneurs. Les extraits obtenus ont été ensuite analysés par des techniques chromatographiques ou par des dosages spectrophotométriques.

Tableau 5 : Résultats des tests phytochimiques réalisés sur les feuilles de *J. phoenicea* L., de *J. oxycedrus* L. et de *C. sempervirens* L.

Espèce étudiée Famille de composés	<i>J. phoenicea</i>	<i>J. oxycedrus</i>	<i>C. sempervirens</i>
Tanins	+++	+++	+++
Amidon	-	-	-
Saponosides	-	-	+
Composés réducteurs	-	-	-
Flavonoïdes	+++	+++	+++
Anthracénosides	-	-	-
Huiles volatiles	+++	++	++
Emodols	-	-	-
Anthocyanosides	+	+	+
Alcaloïdes sels	-	-	-
Stérols et stéroïdes	+	+	+
Acides gras	+	+	+
Coumarines	+	+	-
Alcaloïdes bases	-	-	-

- : Test négatif

++ : Test positif

+ : Test faiblement positif

+++ : Test fortement positif

II-1 Les huiles essentielles

II-1.1 Rendements en huiles essentielles

Les rendements en huiles essentielles sont calculés en fonction de la masse sèche de matériel végétal pour les différentes plantes. Ils sont représentés sur la **figure 15**.

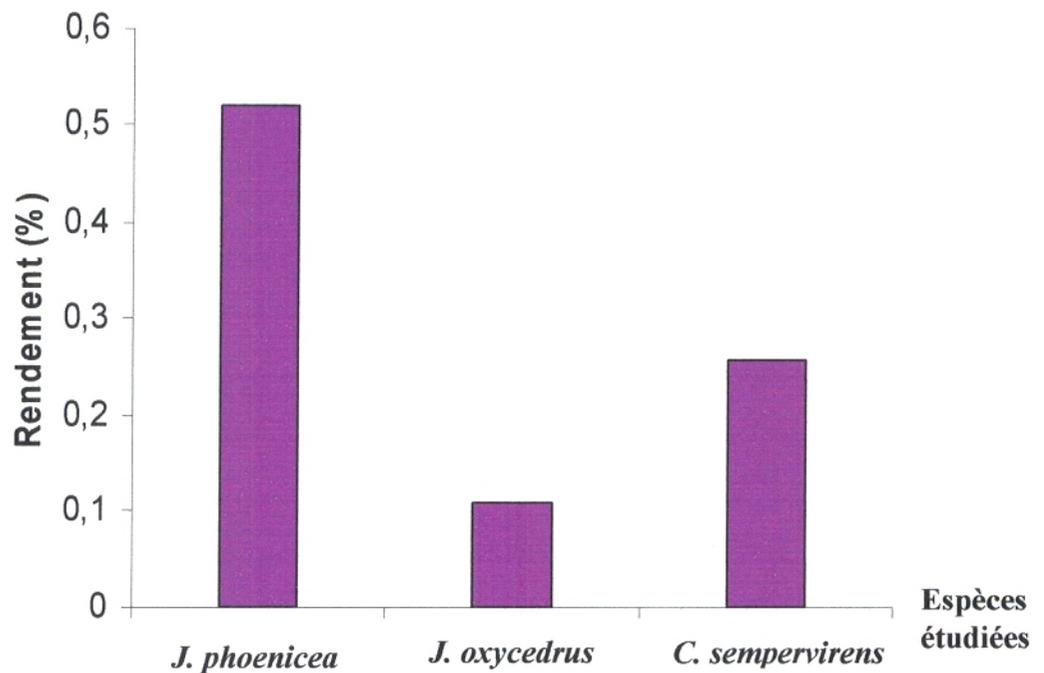


Figure 15 : Rendements en huiles essentielles

Nous remarquons que le rendement en huile essentielle de *Juniperus phoenicea* est le plus élevé, de l'ordre de 0,52%, suivi par celui de *Cupressus sempervirens* (0,26%). Alors que, *Juniperus oxycedrus* présente un rendement faible de 0,11%.

Ces rendements ont été comparés à ceux des travaux antérieurs (**tableau 6**).

Tableau 6 : Comparaison des rendements en huiles essentielles des plantes étudiées avec ceux des travaux antérieurs.

Plante (Origine)	Partie utilisée de la plante	Rendement (%)	Références bibliographiques
<i>J. phoenicea</i> subsp. <i>turbinata</i> (Corse)	Feuilles	0,1-0,7	Rezzi et al. (2001)
<i>Juniperus phoenicea</i> L. (Maroc)	Feuilles	0,7	Barrero et al. (2006)
<i>Juniperus phoenicea</i> L. (Tlemcen)	Feuilles	0,52	Travail personnel (2009)
<i>Juniperus oxycedrus</i> L. (Dalmatie)	Feuilles	0,05	Milos et Radonic (2000)
<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>badia</i> (Espagne)	Feuilles	0,27-0,30	Salido et al. (2002)
<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>oxycedrus</i> (Italie)	Feuilles	0,2	Valentini et al. (2003)
<i>Juniperus oxycedrus</i> L. (Tlemcen)	Feuilles	0,11	Travail personnel (2009)
<i>Cupressus sempervirens</i> (Cameroun)	Feuilles	1	Tapondjou et al. (2005)
<i>Cupressus sempervirens</i> (Tlemcen)	Feuilles	0,26	Travail personnel (2009)

Juniperus phoenicea :

Le rendement en huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* subsp. *turbinata*, récolté dans différentes régions en Corse, est variable allant de 0,1 à 0,7% (**Rezzi et al., 2001**). Par ailleurs, **Barrero et al.** en 2006 rapportent que la teneur en huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* L. de provenance de Maroc, est de l'ordre de 0,7%. Cette valeur est supérieure à notre résultat.

Juniperus oxycedrus :

Milos et Radonic en 2000 rapportent que la teneur en huile essentielle des feuilles de *Juniperus oxycedrus* L. récolté en Dalmatie, est de l'ordre de 0,05%. Cette valeur est nettement inférieure à la nôtre. En outre, Valentini et al. en 2003 révèlent que la teneur en huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* d'origine Italienne est de l'ordre de 0,2%. Cette valeur est supérieure à la nôtre. D'autres part, Salido et al. (2002) rapportent que le rendement en huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* ssp. *badia* récolté en Espagne, est variable de 0,27 à 0,30. Ces valeurs sont nettement supérieures à la nôtre.

Cupressus sempervirens :

La teneur en huile essentielle des feuilles de *Cupressus sempervirens* de provenance de Cameroun, est nettement supérieure à la nôtre : 1% (Tapondjou et al., 2005).

II-1.2 Composition chimique des huiles essentielles des différentes plantes

Les analyses des huiles essentielles des différentes espèces végétales ont été réalisées dans le laboratoire « Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes » (LCMBA), à l'Université de Nice Sophia-Antipolis.

II-1.2.1 Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* L.

La composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* L. est donnée dans le tableau ci-après (tableau 7).

Tableau 7 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* L.

Composés	IR/HP-1	Teneur (%)
Tricyclène	921	0,24
α -thujène	925	0,13
α -pinène	937	34,51
Camphène	948	0,51
Sabinène	971	0,70
β -pinène	976	1,84
Myrcène	990	5,91
α -phellandrène	999	0,57
δ -3-carène	1007	4,69
α -terpinène	1016	0,23
Limonène	1025	1,21
β -phellandrène	1034	22,37

γ -terpinène	1057	0,14
Terpinolène	1085	1,91
Linalol	1099	0,07
Bornéol	1152	0,17
α -terpinéol	1172	0,09
Inconnu 1	1195	0,68
Citronellol	1227	1,23
Acétate de linalyle	1248	0,34
Inconnu 2	1256	0,25
Acétate de bornyle	1283	0,51
Inconnu 3	1316	0,34
Acétate d' α -terpinyle	1349	14,68
β -bourbonène	1381	0,05
β -élémente	1386	0,22
β -caryophyllène	1417	1,02
γ -élémente	1426	0,22
α -humulene	1452	0,38
γ -muurolene	1472	0,14
D-germacrène	1478	1,45
β -sélinène	1486	0,05
α -muurolène	1496	0,15
γ -cadinène	1510	0,14
δ -cadinène	1516	0,54
Elémol	1546	0,37
Inconnu 4	1557	1,14
β -eudèsmol	1630	0,04
α -eudèsmol	1653	0,25
Inconnu 5	1692	0,31
Oxyde de manoyle	1988	0,21

IR/HP-1 : indices de rétention calculés sur colonne HP-1.

Cette analyse a permis d'identifier 36 composés dans cette huile essentielle, qui représentent 97,28% de la composition totale.

Le profil chromatographique de cette huile essentielle (**figure 16**), est caractérisé par la présence de trois composés majoritaires : l' α -pinène (34,51%), le β -phellandrène (22,37%) et l'acétate d' α -terpényle (14,68%), qui représentent à eux seuls 71,56% de la composition totale.

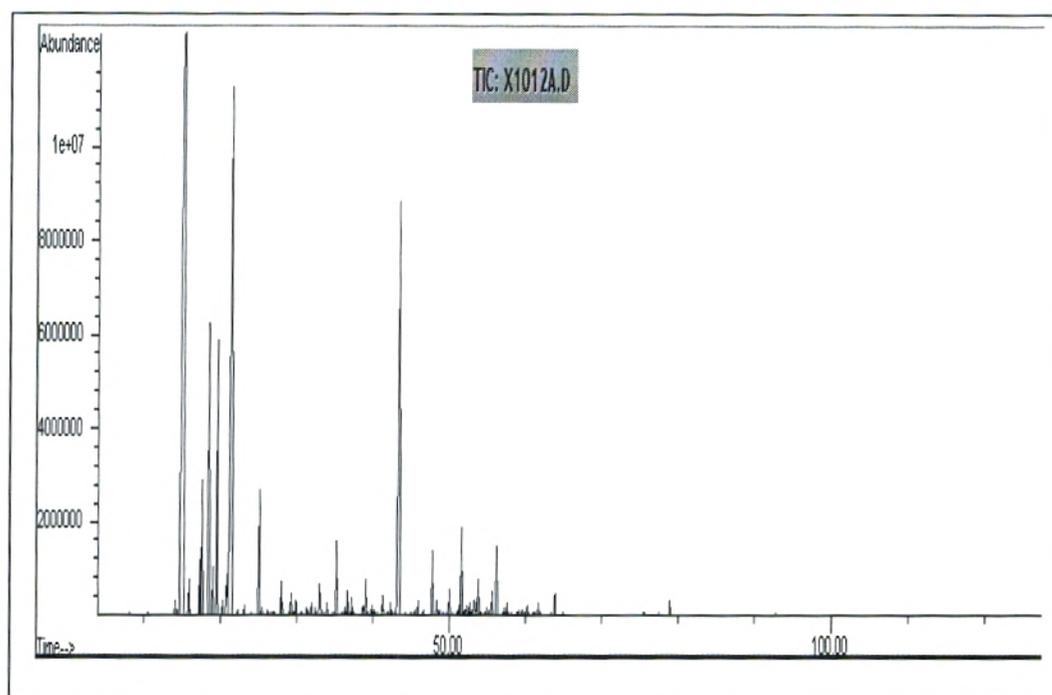


Figure 16 : Chromatogramme en CPG/SM de l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* L.

Lors de l'analyse de cette huile, nous avons constaté que la majorité des constituants identifiés sont des monoterpènes hydrocarbonés (74,96%). Le taux des monoterpènes oxygénés identifiés représente 17,09% de la composition globale. Par contre, les sesquiterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes oxygénés sont présents en très faibles teneurs : 4,36% et 0,87% respectivement. Les composés non identifiés représentent 2,72% de la composition totale (**tableau 8**) (**figure 17**).

Tableau 8 : Bilan de l'étude de l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* L.

Types de composés	Nombre de composés et leur (%)
Monoterpènes hydrocarbonés	14 (74,96)
Monoterpènes oxygénés	7 (17,09)
Sesquiterpènes hydrocarbonés	11 (4,36)
Sesquiterpènes oxygénés	4 (0,87)
Composés identifiés au total	
	36 (97,28)
Composés non identifiés	
	5 (2,72)

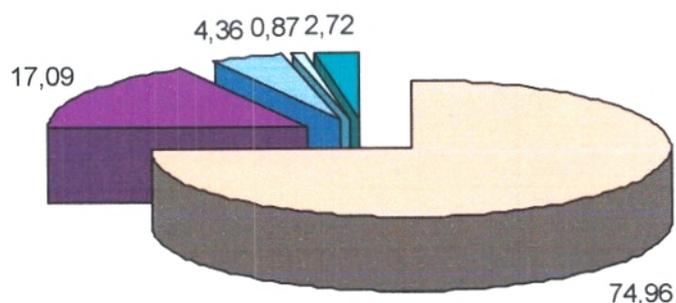
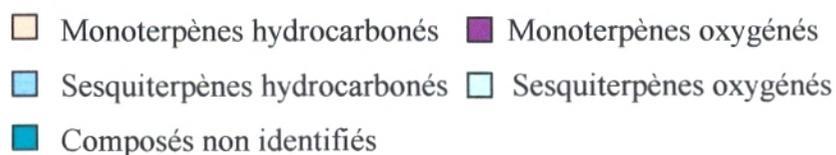


Figure 17 : Distribution des composés volatils présents dans l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* L.

Les teneurs en composés majoritaires ont été comparées à celles des travaux antérieurs (tableau 9).

Nous constatons que l'huile essentielle de notre plante présente les mêmes constituants majoritaires que celle de Corse (groupe II) et de Portugal (groupe I et II), mais à des proportions différentes. Cependant, celles de Tunisie, de Corse (groupe I) et du Portugal (groupe III) sont riches en α -pinène (67,71%, 58,7%, 81,5%) respectivement. Par contre, l'huile essentielle de l'espèce marocaine est constituée majoritairement d' α -pinène (45,5%) suivi du δ -3-carène (13,0%).

Tableau 9 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* L. avec celles des travaux antérieurs.

Plante (Origine)	Partie utilisée de la plante	Teneurs en composés majoritaires (%)	Références bibliographiques
<i>J. phoenicea</i> (Tunisie)	feuilles	α -pinène (67,71)	Akrout (1999)
<i>J. phoenicea</i> L. subsp. <i>turbinata</i> (Corse)	feuilles	groupe I : α -pinène (58,7) groupe II : α -pinène (33,0) β -phellandrène (21,1) Acétate d' α -terpényle (8,2)	Rezzi et al. (2001)
<i>J. phoenicea</i> L. subsp. <i>turbinata</i> (Portugal)	feuilles	groupe I : α -pinène (44,3) β -phellandrène (22,7) Acétate d' α -terpényle (6,9) groupe II : α -pinène (27,8) β -phellandrène (28,8) Acétate d' α -terpényle (10,5) groupe III : α -pinène (81,5)	Cavaleiro et al. (2001)
<i>J. phoenicea</i> L. (Maroc)	feuilles	α -pinène (45,5) δ -3-carène (13,0)	Barrero et al. (2006)
<i>J. phoenicea</i> L. (Tlemcen)	feuilles	α -pinène (34,51) β -phellandrène (22,37) Acétate d' α -terpényle (14,68)	Travail personnel (2009)

II-1.2.2 Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* L.

L'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* a permis d'identifier 41 composés (**tableau 10**), qui représentent 75,04% de la composition globale.

Tableau 10 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* L.

Composés	IR/HP-1	Teneur (%)
Tricyclène	921	0,18
α -thujène	924	0,06
α -pinène	935	39,32
Camphène	948	0,59
Sabinène	971	0,23
β -pinène	976	2,63
Myrcène	988	2,41
α -phellandrène	998	0,28
δ -3-carène	1005	1,21
α -terpinène	1016	0,07
p-cymène	1023	0,51
Limonène	1028	2,83
Trans β -ocimène	1035	0,03
γ -terpinène	1057	0,12
Terpinolène	1084	0,46
Linalol	1099	0,03
α -campholénal	1126	0,75
α -terpinéol	1171	0,25
Myrténol	1180	0,06
Myrténal	1195	0,33
Trans carvéol	1218	0,05
Thymol méthyl éther	1228	0,03
Acétate de bornyl	1283	0,85
Carvacrol	1290	0,51
Thymol	1298	0,40
β -bourbonène	1380	0,81
β -caryophyllène	1416	0,93
γ -élémane	1426	0,20
α -humulène	1452	0,94

γ-muurolène	1473	0,74
D-germacrène	1479	8,88
γ-cadinène	1511	2,88
δ-cadinène	1516	0,98
Elémol	1534	0,23
Inconnu 1	1546	0,78
Inconnu 2	1553	0,89
Oxyde de caryophyllène	1580	0,56
Inconnu 3	1583	0,74
Inconnu 4	1590	0,54
Cèdrol	1607	0,93
Inconnu 5	1612	1,17
Inconnu 6	1614	0,51
Epi γ-eudèsmol	1620	0,36
Inconnu 7	1627	2,72
β-eudèsmol	1631	0,22
Inconnu 8	1640	0,76
α-eudèsmol	1654	1,25
Inconnu 9	1657	0,67
Inconnu 10	1669	5,58
Inconnu 11	1684	2,41
Inconnu 12	1689	0,39
Inconnu 13	1706	0,57
Inconnu 14	1713	1,78
Inconnu 15	1734	0,74
Inconnu 16	1958	0,30
Oxyde de manoylé	1988	0,59
Inconnu 17	2006	0,42
Inconnu 18	2014	0,22
Inconnu 19	2050	0,92
Inconnu 20	2083	2,46
Inconnu 21	2103	0,39
Abiénol	2143	0,35

IR/HP-1 : indices de rétention calculés sur colonne HP-1.

L'huile essentielle des feuilles de *Juniperus oxycedrus* est caractérisée par une prédominance en α -pinène (39,32%), suivi du D-germacrène (8,88%). D'autres composés sont également présents en faibles quantités : le γ -cadinène (2,88%), le limonène (2,83%), le β -pinène (2,63%) et le myrcène (2,41%) (**figure 18**).

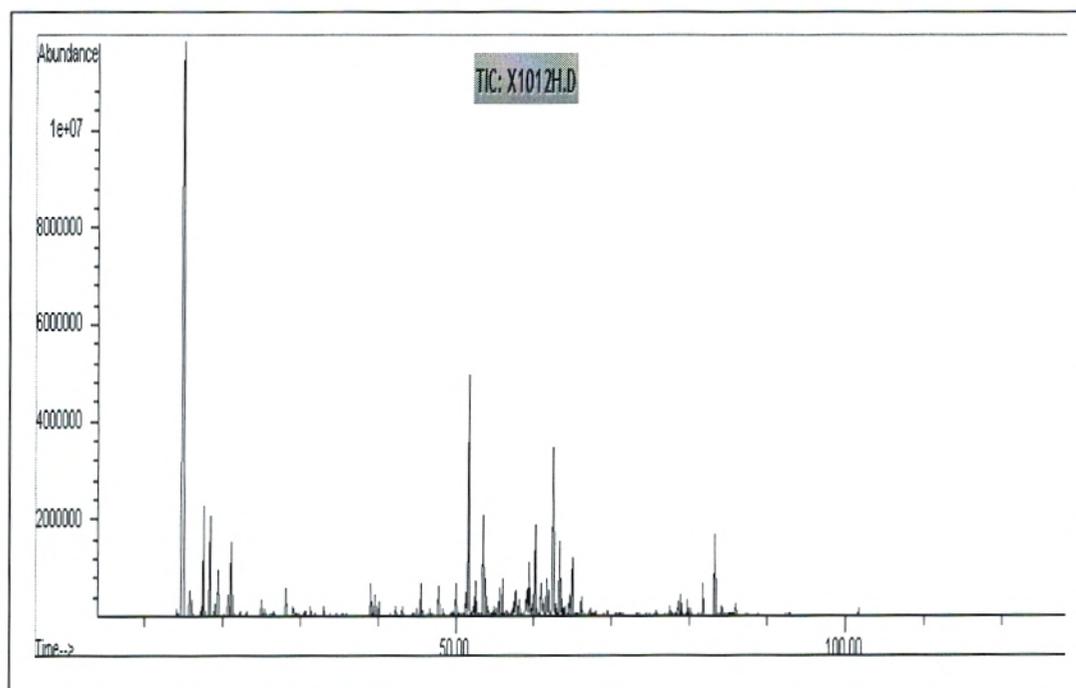


Figure 18 : Chromatogramme en CPG/SM de l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* L.

Nous constatons que cette huile est caractérisée par une teneur élevée en monoterpènes hydrocarbonés (50,93%), alors que les monoterpènes oxygénés ne représentent que 3,26% de la composition totale. Quand aux sesquiterpènes hydrocarbonés présents à 16,36%, sont plus importants que les oxygénés (4,49%). Nous signalons également que plusieurs sesquiterpènes oxygénés, représentant 24,96% de la composition de cette huile, n'ont pu être identifiés, il est nécessaire de séparer cette fraction sur colonne puis de l'analyser par CPG/SM et CPG double colonne (FID) (**tableau 11**) (**figure 19**).

Tableau 11 : Bilan de l'étude de l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* L.

Types de composés	Nombre de composés et leur (%)
Monoterpènes hydrocarbonés	15 (50,93)
Monoterpènes oxygénés	10 (3,26)
Sesquiterpènes hydrocarbonés	8 (16,36)
Sesquiterpènes oxygénés	8 (4,49)
Composés identifiés au total	
41 (75,04)	
Composés non identifiés	
21 (24,96)	

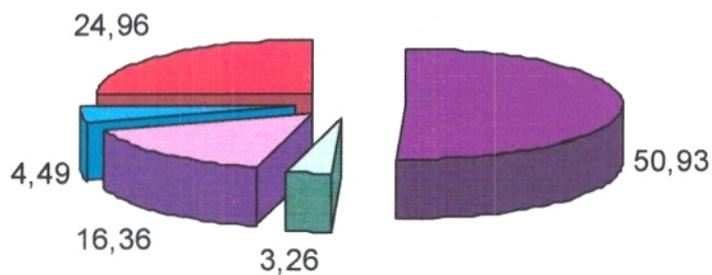
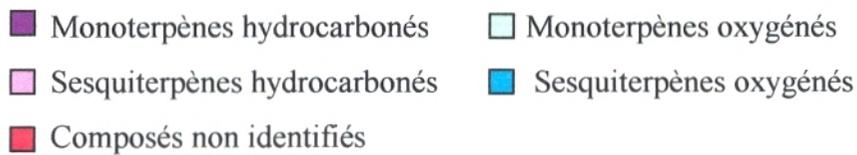


Figure 19 : Distribution des composés volatils présents dans l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* L.

La comparaison de nos résultats obtenus avec ceux des travaux antérieurs cités dans le **tableau 12**, nous amène à constater que notre huile essentielle est caractérisée par une composition chimique différente, avec prédominance de l' α -pinène et du D-germacrène.

Tableau 12 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* L. avec celles des travaux antérieurs.

Plante (Origine)	Partie utilisée de la plante	Teneurs en composés majoritaires (%)	Références bibliographiques
<i>J. oxycedrus</i> L. (Dalmatie)	feuilles	α -pinène (41,37) Oxyde de manoyle (12,29)	Milos et Radonic (2000)
<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>badia</i> (Espagne)	feuilles	α -pinène (40-57) Oxyde de manoyle (5-10)	Salido et al. (2002)
<i>J. oxycedrus</i> L. ssp. <i>macrocarpa</i> (Italie)	feuilles	α -pinène (33,8-81,3)	Valentini et al. (2003)
<i>J. oxycedrus</i> L. ssp. <i>oxycedrus</i> (Corse)	feuilles	<u>groupe I</u> : α -pinène (73,3) <u>groupe II</u> : α -pinène (56,1) δ -3-carène (8,2%)	Boti et al. (2006)
<i>J. oxycedrus</i> L. (Tlemcen)	feuilles	α -pinène (39,32) D-germacrène (8,88).	Travail personnel (2009)

II-1.2.3 Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *C. sempervirens* L.

L'application de la CPG/SM pour l'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *C. sempervirens*, nous a permis d'identifier 35 composés représentant 91,64% de la composition chimique de cette huile (**tableau 13**).

Tableau 13 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *C. sempervirens* L.

Composés	IR/HP-1	Teneur (%)
Tricyclène	921	0,47
α -thujène	925	0,42
α -pinène	937	60,51
Camphène	948	0,51
Sabinène	971	1,27
β -pinène	976	2,90
Myrcène	989	3,87
δ -3-carène	1005	0,22
α -terpinène	1016	0,24
p-cymène	1024	0,17
Limonène	1029	4,59
Inconnu 1	1045	1,72
γ -terpinène	1057	0,45
Terpinolène	1084	1,96
Linalol	1099	0,03
Pinocarvéol	1140	0,03
Bornéol	1155	0,02
α -terpinéol	1171	0,05
Inconnu 2	1180	0,31
Thymol méthyl éther	1237	0,16
Acétate de linalyle	1248	0,01

Acétate de bornyle	1282	0,27
Carvacrol	1290	0,03
Thymol	1298	0,05
Inconnu 3	1345	2,53
Inconnu 4	1412	0,94
Inconnu 5	1416	0,26
β -caryophyllène	1421	0,33
γ -élémente	1427	0,05
α -humulène	1452	0,26
allo-aromadendrène	1459	0,52
γ -muurolène	1472	0,23
D-germacrène	1478	2,26
α -muurolène	1493	0,18
γ -cadinène	1510	0,09
δ -cadinène	1515	0,61
Oxyde de caryophyllène	1580	0,06
Cèdrol	1609	8,32
β -eudèsmol	1631	0,19
α -eudèsmol	1653	0,31
Inconnu 6	1989	0,72
Inconnu 7	1993	1,49
Inconnu 8	2049	0,39

IR/HP-1 : indices de rétention calculés sur colonne HP-1.

L' α -pinène est le composé majoritaire de cette huile essentielle avec un pourcentage de 60,51%. D'autres composés sont présents en quantités appréciables, à savoir : le cédrol (8,32%), le limonène (4,59%) et le myrcène (3,87%) (**figure 20**).

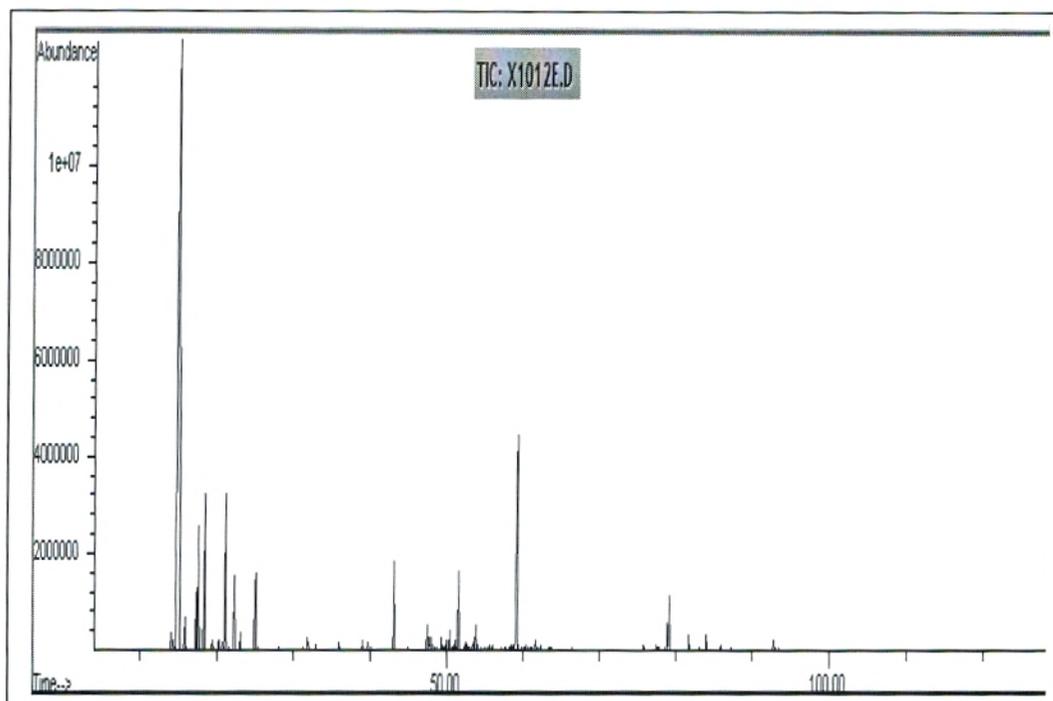


Figure 20 : Chromatogramme en CPG/SM de l'huile essentielle des feuilles de *C. sempervirens* L.

Nous remarquons que cette huile est très riche en monoterpènes hydrocarbonés, soit 13 composés qui représentent 77,58% de la composition chimique globale. Par contre, les monoterpènes oxygénés sont présents en très faible teneur (0,65%). Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent 4,53% de la composition totale de cette huile, les sesquiterpènes oxygénés (8,88%). Les composés non identifiés représentent à eux seuls 8,36% (**tableau 14**) (**figure 21**).

Tableau 14 : Bilan de l'étude de l'huile essentielle des feuilles de *C. sempervirens* L.

Types de composés	Nombre de composés et leur (%)
Monoterpènes hydrocarbonés	13 (77,58)
Monoterpènes oxygénés	9 (0,65)
Sesquiterpènes hydrocarbonés	9 (4,53)
Sesquiterpènes oxygénés	4 (8,88)
	Composés identifiés au total
	35 (91,64)
	Composés non identifiés
	8 (8,36)

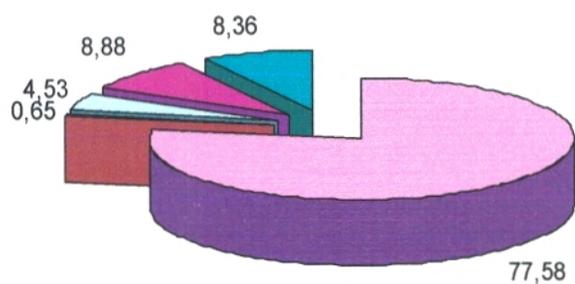


Figure 21 : Distribution des composés volatils présents dans l'huile essentielle des feuilles de *C. sempervirens* L.

La comparaison de nos résultats, obtenus par l'analyse de l'huile essentielle de *C. sempervirens* récolté dans la région de Tlemcen avec ceux des travaux antérieurs cités dans le **tableau 15**, nous amène à déduire que notre huile essentielle est caractérisée par une composition chimique différente, avec prédominance de l' α -pinène et du cédrol.

Tableau 15 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles de *C. sempervirens* L. avec celles des travaux antérieurs.

Plante (Origine)	Partie de la plante	Teneurs en composés majoritaires (%)	Références bibliographiques
<i>C. sempervirens</i> L. (Cameroun)	feuilles	Sabinène (14,8) Terpinèn-4-ol (11,2) α -pinène (9,9)	Tapondjou et al. (2005)
<i>C. sempervirens</i> L.	feuilles	Sabinène (39,6) α -pinène (19,3) 4-terpinéol (7,34) Limonène (7,3) γ -terpinène (6,14)	Sacchetti et al. (2005)
<i>C. sempervirens</i> L.	feuilles	α -pinène (26,37) δ -3-carène (7,46) Limonène (6,4)	Tognolini et al. (2006)
<i>C. sempervirens</i> L. (Tlemcen)	feuilles	α -pinène (60,51) Cédrol (8,32)	Travail personnel (2009)

Nous remarquons que les huiles essentielles des trois plantes sont qualitativement proches. Nous signalons également la présence ou l'absence de certains composés dans chacune des espèces. Le **tableau 16**, nous permet de constater que ces huiles présentent des teneurs différentes en composés majoritaires. Cependant, elles sont caractérisées par le même composé majoritaire soit l' α -pinène.

Tableau 16 : Comparaison des teneurs en composés majoritaires des huiles essentielles des trois espèces étudiées.

Espèce étudiée	Partie utilisée de la plante	Teneurs en composés majoritaires (%)
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	Feuilles	α -pinène (34,51) β -phellandrène (22,37) Acétate d' α -terpényle (14,68)
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Feuilles	α -pinène (39,32) D-germacrène (8,88).
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Feuilles	α -pinène (60,51) Cédrol (8,32)

II-2 Les flavonoïdes

II-2.1 Rendements des extraits bruts secs

Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure 22**.

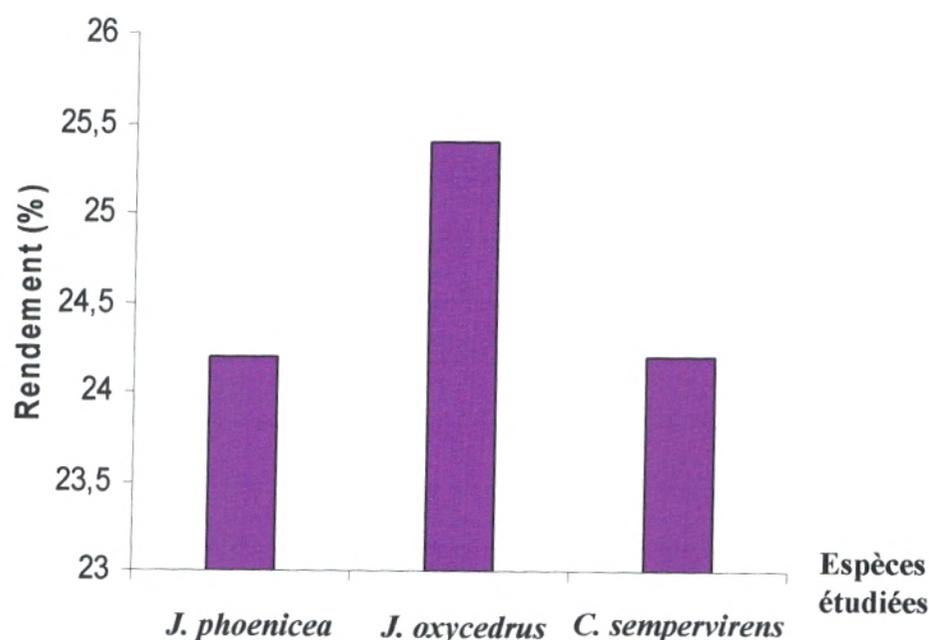


Figure 22 : Rendements des extraits bruts secs

Les trois espèces *Juniperus phoenicea*, *Cupressus sempervirens* et *Juniperus oxycedrus* présentent des rendements relativement proches voire même égaux dans le cas des deux premières espèces. Ces rendements sont respectivement de 24,2%, 24,2% et 25,4%.

II-2.2 Teneurs en phénols totaux

Dans le but de déterminer la teneur totale des phénols de nos plantes, un dosage biochimique a été effectué au niveau des extraits bruts des composés phénoliques. Une courbe d'étalonnage réalisée par l'acide gallique (**figure 23**), a été tracée pour cet objectif.

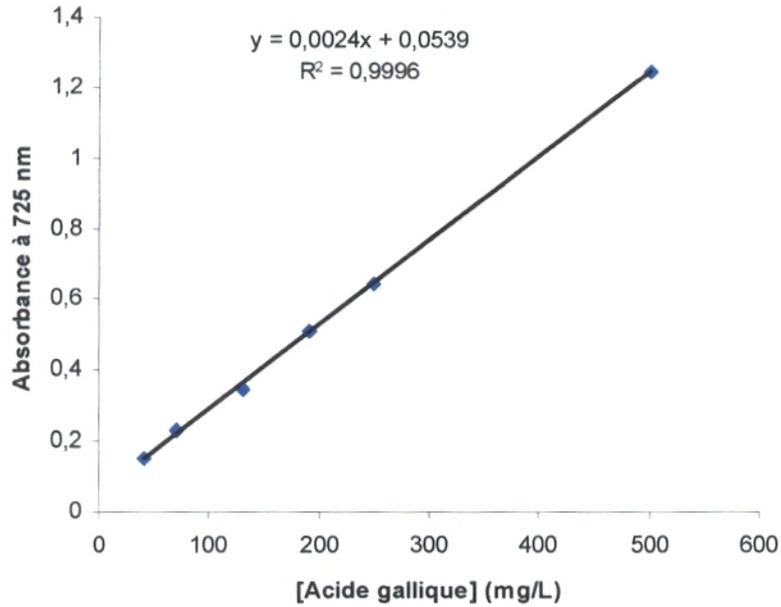


Figure 23 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux.

Les résultats obtenus sont représentés dans l'histogramme ci-après (**figure 24**).

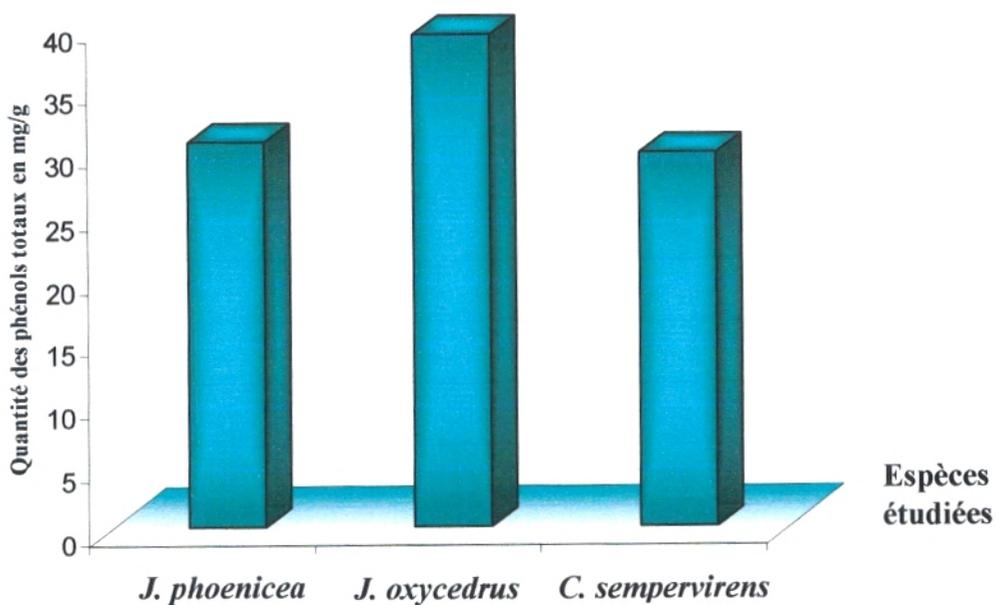


Figure 24 : Teneurs en phénols totaux (mg/g).

On remarque que le genévrier oxycède possède la teneur la plus élevée, de l'ordre de 39,1 mg en équivalent acide gallique par g de matériel végétal réduit en poudre. Cette valeur est supérieure à celle trouvée par **Djeridane et al. (2006)**, qui est de 12,66 mg/g.

Les deux autres espèces présentent presque les mêmes teneurs : 30,5 mg/g pour le genévrier rouge et 29,7 mg/g pour le cyprès.

Pour le genévrier rouge, la teneur en phénols totaux des feuilles obtenue est inférieure à celle des fruits (66,1 à 202 mg/g) (**Hayouni et al., 2007**).

II-2.3 Teneurs en flavonoïdes

La détermination de la teneur des flavonoïdes de nos plantes, a été effectuée au moyen d'un dosage spectrophotométrique au niveau des extraits bruts des composés phénoliques. Pour cet objectif, une courbe d'étalonnage réalisée par la catéchine (**figure 25**) a été tracée.

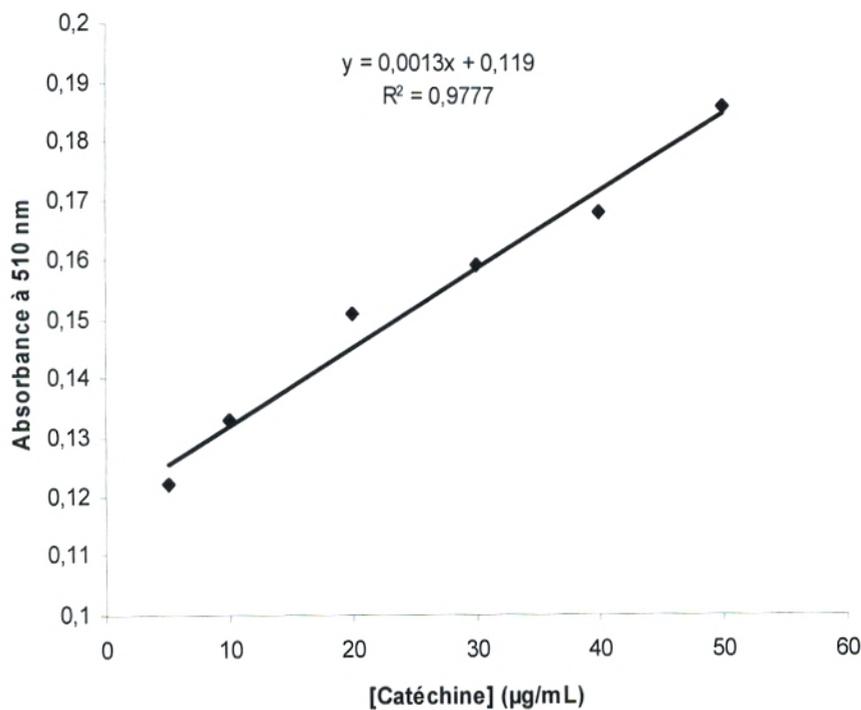


Figure 25 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

Les résultats obtenus sont reportés dans l'histogramme ci-après (**figure 26**).

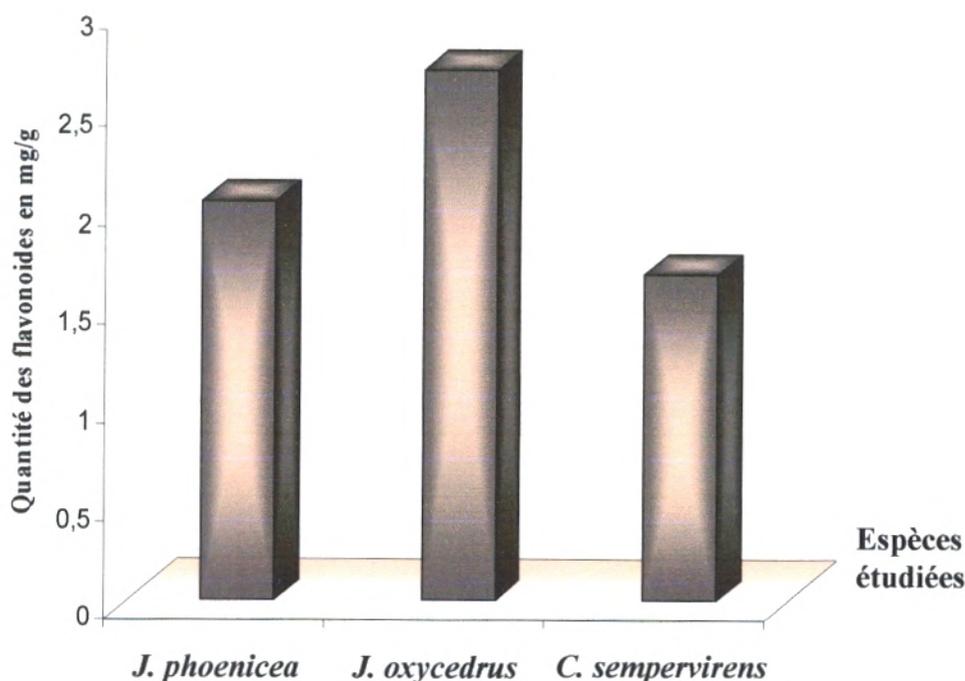


Figure 26 : Teneurs en flavonoïdes (mg/g).

La teneur en flavonoïdes des feuilles de *Juniperus oxycedrus* (2,70 mg/g) est plus élevée par rapport aux deux autres espèces, qui présentent des teneurs de 2,03 mg/g et 1,66 mg/g respectivement pour *Juniperus phœnicea* et *Cupressus sempervirens*.

La teneur en flavonoïdes des feuilles de *Juniperus oxycedrus* est proche de celle obtenue par **Djeridane et al. (2006)** (3,50 mg/g).

II-2.4 Rendements des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes

Les résultats d'extraction de cette famille sont représentés sous forme d'histogramme dans la **figure 27**.

Par comparaison des rendements, nous constatons que *Juniperus phoenicea* et *Cupressus sempervirens* possèdent un même rendement en fraction AcOEt (4%). Par contre, *Juniperus oxycedrus* présente un rendement faible de 2,66%.

En ce qui concerne la fraction n-buOH, *Juniperus oxycedrus* présente le rendement le plus élevé (14%), en comparaison avec les autres plantes : (7%) pour *Cupressus sempervirens* et (4,5%) pour *Juniperus phoenicea*.

La plante *Juniperus phoenicea* présente presque le même rendement en fractions AcOEt et n-buOH, il est respectivement de 4% et 4,5%.

En revanche, *Juniperus oxycedrus* possède un rendement faible de 2,66% en fraction AcOEt, et un rendement très élevé de 14% en fraction n-buOH. Alors que, *Cupressus sempervirens* présente un rendement de 7% en fraction n-buOH, élevé au rendement en fraction AcOEt (4%).

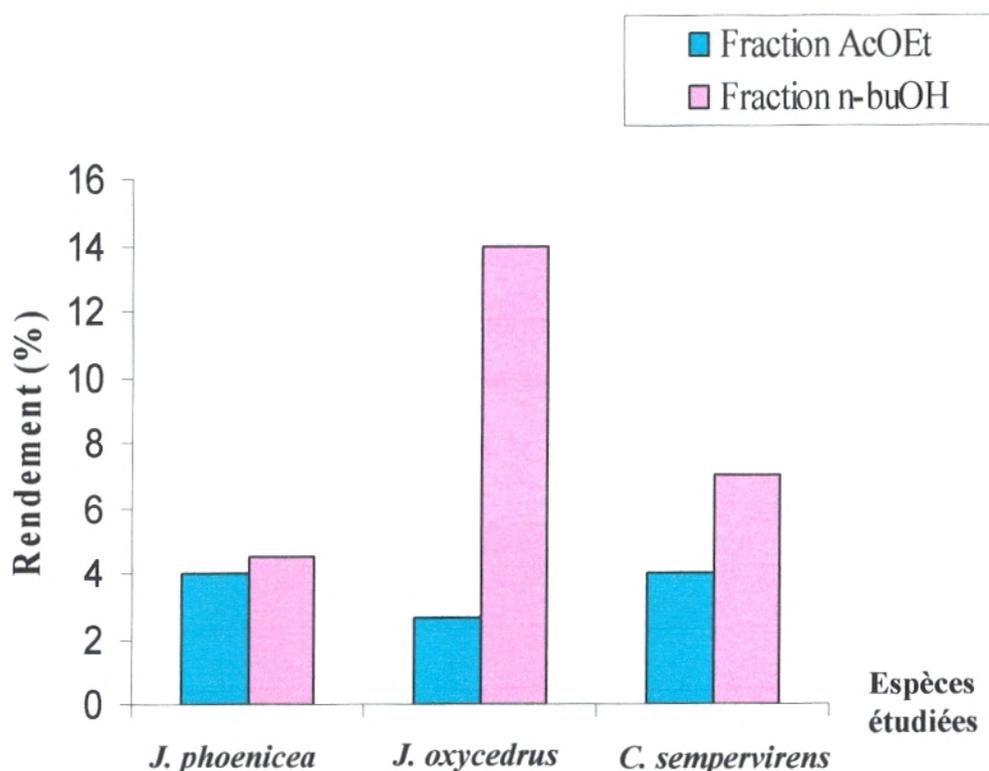


Figure 27 : Rendements des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes

II-2.5 CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes

Après essai de plusieurs systèmes d'éluants, nous optons pour les deux systèmes n-hexane/ acétate d'éthyle/ acide acétique (31:14:5) (v/v/v) et Toluène/acétone/acide formique (38:10:5) (v/v/v), qui ont donné la meilleure séparation. Cette dernière nous a donné plusieurs tâches représentées sur les **figures 28** et **29**. Les Rf de ces tâches sont consignées dans les **tableaux 17** et **18**.

Tableau 17 : Résultats de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes.

Système solvant (1) : n-hexane/ acétate d'éthyle/ acide acétique (31:14:5) (v/v/v).

	Fraction AcOEt		Fraction n-buOH	
	Spots (n°)	Rf	Spots (n°)	Rf
<i>J. phoenicea</i>	1	0,08	1	0,02
	2	0,13	2	0,07
	3	0,43		
	4	0,57		
	5	0,73		
	6	0,85		
	7	0,89		
<i>J. oxycetrus</i>	1	0,01	1	0,03
	2	0,05	2	0,08
	3	0,07	3	0,11
	4	0,11	4	0,14
	5	0,13	5	0,55
	6	0,43	6	0,88
	7	0,57		
<i>C. sempervirens</i>	1	0,08	1	0,08
	2	0,13		
	3	0,42		
	4	0,56		
	5	0,68		
	6	0,82		
	7	0,87		

Rf: rapport frontal.

Tableau 18 : Résultats de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes.

Système solvant (2) : Toluène/acétone/acide formique (38:10:5) (v/v/v).

	Fraction AcOEt		Fraction n-buOH	
	Spots (n°)	Rf	Spots (n°)	Rf
<i>J. phoenicea</i>	1	0,03	1	0,02
	2	0,12	2	0,12
	3	0,16	3	0,16
	4	0,18	4	0,17
	5	0,21		
	6	0,24		
	7	0,30		
	8	0,33		
	9	0,37		
	10	0,59		
	11	0,84		
	12	0,87		
<i>J. oxycedrus</i>	1	0,03	1	0,03
	2	0,05	2	0,06
	3	0,13	3	0,11
	4	0,16	4	0,16
	5	0,18	5	0,17
	6	0,21	6	0,24
	7	0,24	7	0,29
	8	0,28	8	0,86
	9	0,30		
	10	0,36		
<i>C. sempervirens</i>	1	0,03	1	0,02
	2	0,12	2	0,11
	3	0,16	3	0,16
	4	0,18	4	0,17
	5	0,30		
	6	0,36		
	7	0,58		
	8	0,85		
	9	0,87		

Nous constatons que le système de solvants (2) sépare plus de composés dans les deux fractions de nos plantes que le système (1).

Les deux systèmes séparent plusieurs constituants dans la fraction AcOEt que la fraction n-buOH dans le cas de *J. phoenicea* et *C. sempervirens*.

Systeme (1) :

▣ *J. phoenicea* :

Sept composés ont été séparés dans la fraction AcOEt et 2 composés dans la fraction n-buOH.

▣ *J. oxycedrus* :

Le nombre de tâches est de 7 dans la fraction AcOEt et 6 dans la fraction n-buOH.

▣ *C. sempervirens* :

La fraction AcOEt présente 7 composés, par contre un seul composé est révélé dans la fraction n-buOH.

Systeme (2) :

♣ *J. phoenicea* :

La fraction AcOEt présente un maximum de composés au nombre de 12, tandis que la fraction n-buOH présente 4 composés.

♣ *J. oxycedrus* :

Dix tâches ont été révélées dans la fraction AcOEt et 8 tâches dans la fraction n-buOH.

♣ *C. sempervirens* :

9 spots ont été ségrégués de dépôt de la fraction AcOEt et 4 spots de celui de la fraction n-buOH.

Le tableau ci-après (**tableau 19**) indique les valeurs des Rf des étalons obtenues avec les deux systèmes (1) et (2).

Tableau 19 : Valeurs des Rf des étalons (Medić-Šarić et al., 2004).

Système solvant (1) : n-hexane/ acétate d'éthyle/ acide acétique (31:14:5) (v/v/v).

Système solvant (2) : Toluène/acétone/acide formique (38:10:5) (v/v/v).

Etalons		Rf	
		Système (1)	Système (2)
Flavanones	Flavanone	0,75	0,62
	Naringénine	0,52	0,44
Flavones	Flavone	0,91	0,85
	3-Hydroxyflavone	0,82	0,66
	6-Hydroxyflavone	0,75	0,56
	6'-Hydroxyflavone	0,56	0,48
	7-Hydroxyflavone	0,47	0,46
	3,6-Dihydroxyflavone	0,56	0,46
	3,7-Dihydroxyflavone	0,54	0,47
	Morine	0,13	0,23
	Chrysine	0,68	0,56
	Galangine	0,72	0,60
	Apigénine	0,39	0,37
Flavonols	Quercétine	0,30	0,35
	Kaempférol	0,47	0,40
Acides phénoliques	acide <i>o</i> -coumarique	0,73	0,48
	acide <i>p</i> -coumarique	0,69	0,47
	acide férulique	0,63	0,45

L'identification des composés séparés dans les deux systèmes a donné les résultats consignés dans le **tableau 20**.

Tableau 20 : Composés identifiés dans les trois espèces étudiées.

	Système (1)				Système (2)			
	Fraction AcOEt		Fraction n-buOH		Fraction AcOEt		Fraction n-buOH	
	Composé	Rf	Composé	Rf	Composé	Rf	Composé	Rf
<i>J. phoenicea</i>	Morine	0,13			Apigénine	0,37		
	acide <i>o</i> -Coumarique	0,73						
<i>J. oxycedrus</i>	Morine	0,13						
<i>C. sempervirens</i>	Morine	0,13			Flavone	0,85		
	6'-Hydroxyflavone	0,56						
	3,6-Dihydroxyflavone							
	Chrysine	0,68						
	3-Hydroxyflavone	0,82						

En comparant les Rf des spots avec ceux des étalons, on a pu mettre en évidence un certain nombre de composés dans les feuilles des espèces étudiées :

- * Dans la fraction AcOEt des feuilles de *J. phoenicea*, nous avons pu mettre en évidence deux flavones qui sont : la morine et l'apigénine, et un acide phénolique soit l'acide *o*-coumarique.
- * Une flavone a été mise en évidence dans la fraction AcOEt des feuilles de *J. oxycedrus*, qui est la morine.
- * Dans la fraction AcOEt des feuilles de *C. sempervirens*, cinq flavones ont été mise en évidence, qui sont : la morine, le 6'-Hydroxyflavone ou le 3,6-Dihydroxyflavone, la Chrysine, le 3-Hydroxyflavone et une flavone.

II-3 Les tanins

II-3.1 Rendements des extraits obtenus

Les trois plantes ont données des masses en extraits secs inférieurs à 2% en poids. Le genévrier oxycèdre présente le rendement le plus élevé (1,05%), suivi par le cyprès et le genévrier rouge, qui possèdent respectivement des rendements de 0,91% et 0,76% (figure 30).

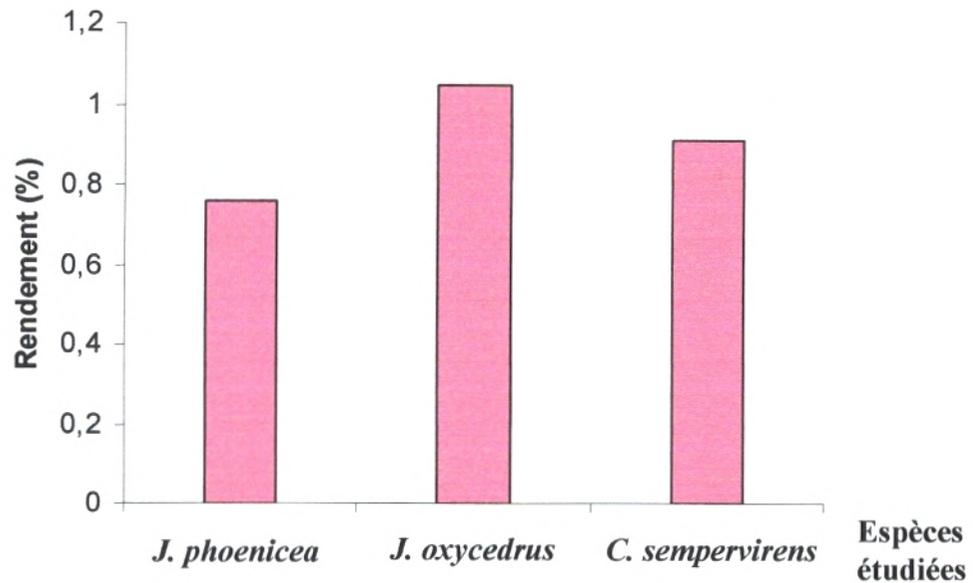


Figure 30 : Rendements des extraits des tanins.

II-3.2 CCM des extraits des tanins

Pour cette séparation l'éluant sélectionné est le système : acétone/toluène/acide formique (30:30:10) (v/v/v). Ce dernier a permis de séparer 9 tâches dans l'extrait de *J. phoenicea* et de *J. oxycedrus* et 8 tâches dans celui de *C. sempervirens* (figure 31). Les Rf de ces composés sont donnés dans le tableau 21.

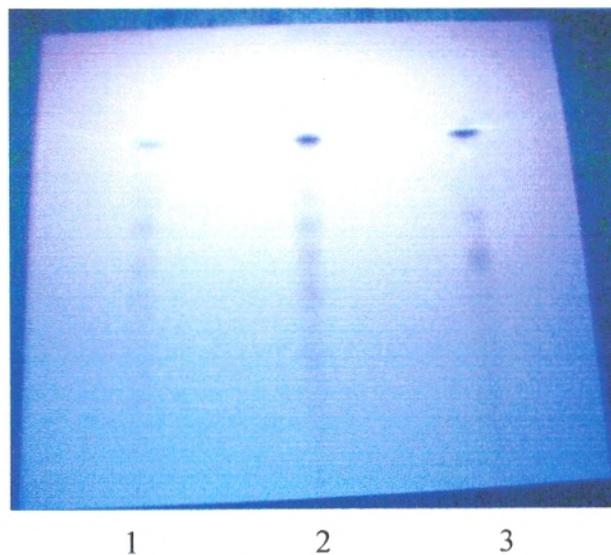


Figure 31 : Chromatogramme résultant de la CCM des extraits des tanins.

- (1) : extrait des tanins de *J. phoenicea* ; (2) : extrait des tanins de *J. oxycedrus* ;
 (3) : extrait des tanins de *C. sempervirens*.

Tableau 21 : Résultats de la CCM des extraits des tanins.

Système solvant : acétone / toluène /acide formique (30:30:10) (v/v/v).

La plante	Spots (n°)	Rf des spots
<i>J. phoenicea</i>	1	0,32
	2	0,37
	3	0,45
	4	0,48
	5	0,55
	6	0,60
	7	0,70
	8	0,75
	9	0,77
<i>J. oxycedrus</i>	1	0,24
	2	0,39
	3	0,47
	4	0,54
	5	0,58
	6	0,70
	7	0,74
	8	0,76
	9	0,77
<i>C. sempervirens</i>	1	0,44
	2	0,48
	3	0,54
	4	0,61
	5	0,70
	6	0,75
	7	0,76
	8	0,77

Le **tableau 22** indique les Rf des étalons utilisés à savoir le phloroglucinol, le pyrogallol, l'hydroquinone, le résorcinol et le catéchol.

Tableau 22 : Valeurs des Rf des étalons.

Système solvant : acétone / toluène /acide formique (30:30:10) (v/v/v).

Étalons	Rf
Phloroglucinol	0,66
Pyrogallol	0,70
Hydroquinone	0,72
Résorcinol	0,74
Catéchol	0,76

Par comparaison des Rf des spots avec ceux des étalons, on a pu mettre en évidence le pyrogallol dans l'extrait de *J. phoenicea* ; le pyrogallol, le résorcinol et le catéchol dans l'extrait de *J. oxycedrus* ; le pyrogallol et le catéchol dans l'extrait de *C. sempervirens* (**tableau 23**).

Tableau 23 : Composés identifiés dans les trois espèces étudiées.

Plante	Composé	Rf
<i>J. phoenicea</i>	Pyrogallol	0,70
<i>J. oxycedrus</i>	Pyrogallol	0,70
	Résorcinol	0,74
	catéchol	0,76
<i>C. sempervirens</i>	Pyrogallol	0,70
	catéchol	0,76

III- Activités biologiques

III-1 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des antimicrobiens

(Antibiotiques et Antifongique)

III-1.1 Pouvoir antimicrobien des antibiotiques et de l'antifongique

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de quatre antibiotiques par la méthode des disques.

Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques. Les diamètres de celles-ci sont donnés sur la **figure 32**, et sont comparés à ceux des tableaux de Recommandations 2008 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie afin de déterminer si la souche est sensible, intermédiaire ou résistante.

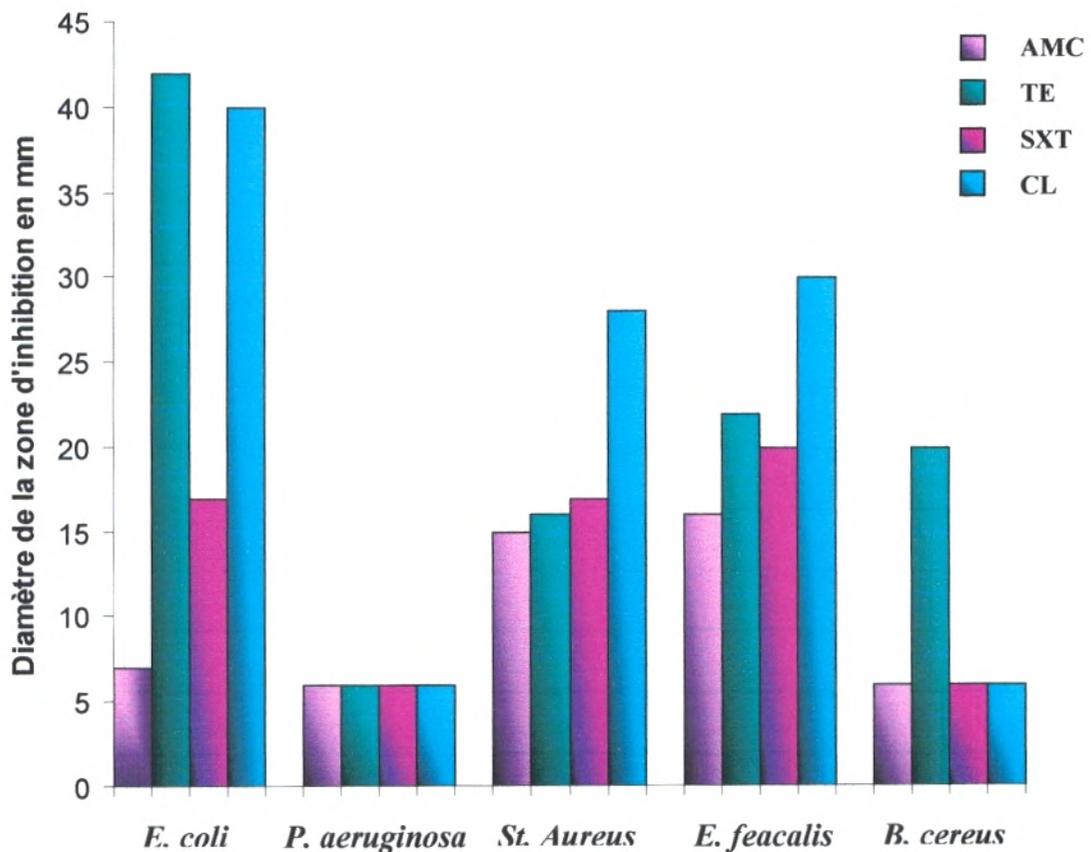


Figure 32 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des antibiotiques relatifs aux différentes souches bactériennes.

Nous remarquons que la majorité des souches testées ont montré une sensibilité vis-à-vis de la plus part des antibiotiques, à l'exception de *P. aeruginosa*, qui se révèle très résistante vis-à-vis de l'ensemble des antibiotiques testés. Par contre, la souche *B. cereus* est sensible vis-à-vis uniquement de la tétracycline.

Pour les moisissures, un seul antifongique, l'amphotéricine B, a été utilisé vis-à-vis des mycètes. Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure 33**.

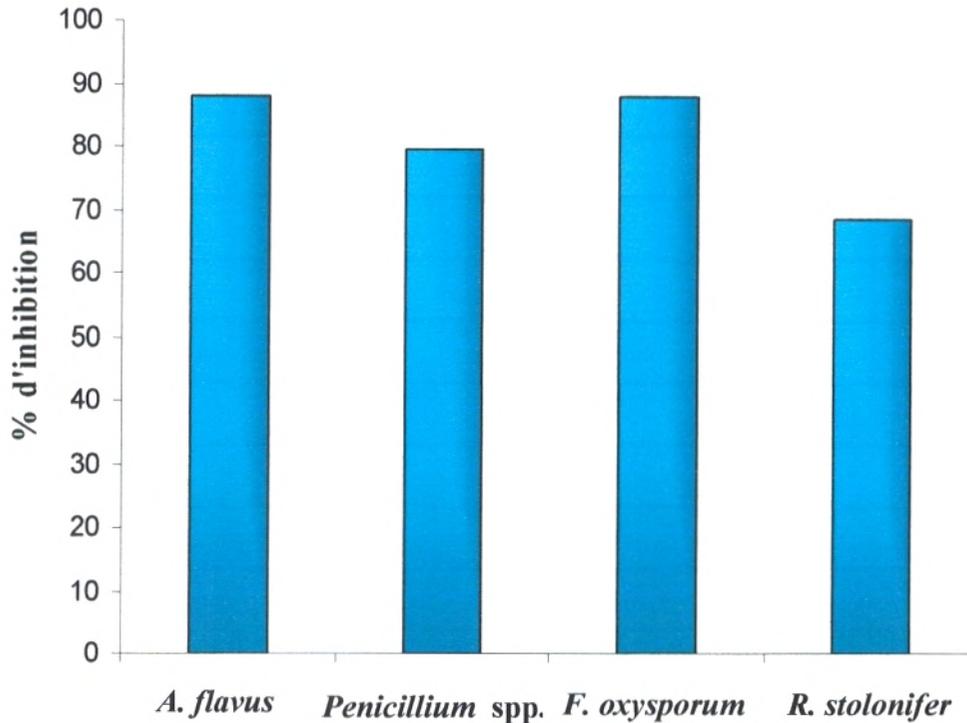


Figure 33 : Pourcentages d'inhibition de l'amphotéricine B relatifs aux différentes souches fongiques.

Les quatre moisissures se sont montrées sensibles vis-à-vis de l'amphotéricine B. En effet, cet antifongique a pu réduire le taux de croissance de la colonie mycélienne de : 88,10% pour *F.oxysporum*, 88,12% pour *A. flavus* et 79,64% pour *Penicillium spp.*

Cependant, il s'est manifesté avec un taux d'inhibition légèrement moins important de l'ordre de 68% vis-à-vis de *R. stolonifer*.

III-1.2 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

III-1.2.1 Activité antibactérienne des huiles essentielles testée par la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme)

Les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *J. phoenicea*, de *J. oxycedrus* et de *C. sempervirens* spécifiques à chacune des bactéries testées sont donnés sur la **figure 34**.

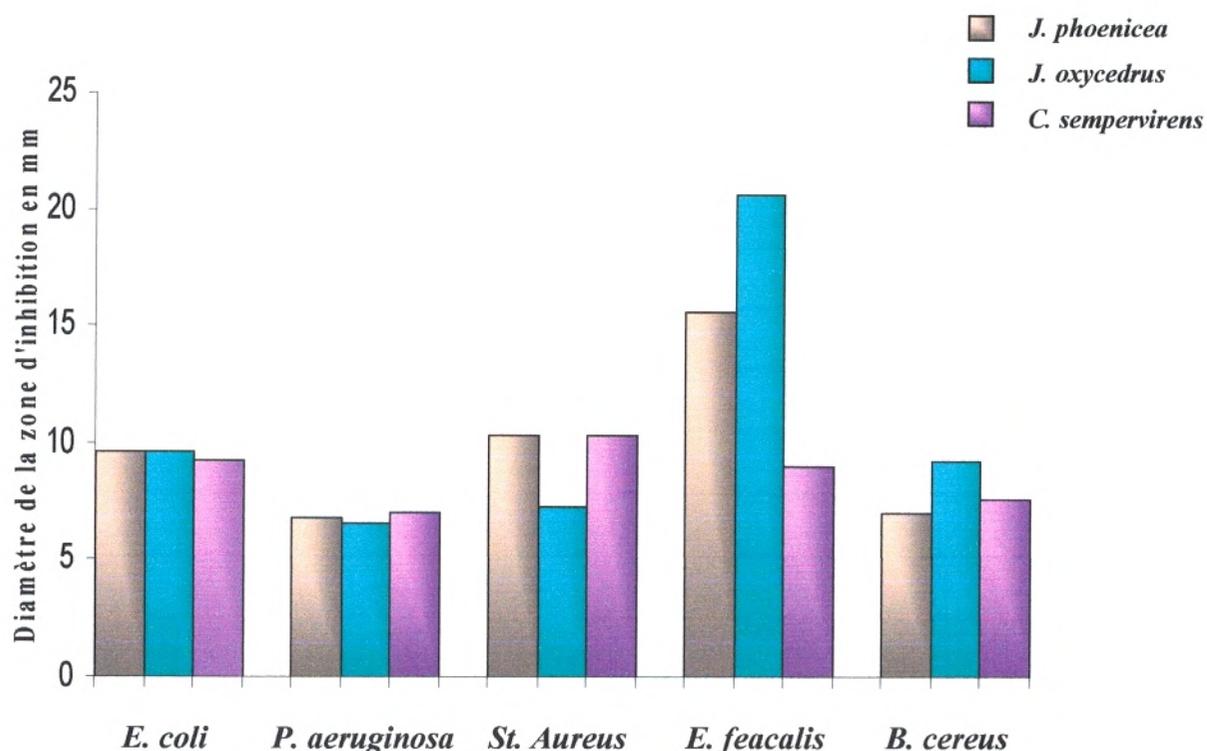


Figure 34 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles relatives aux différentes souches bactériennes.

Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 15 mm (Rossi, 2003).

Ainsi, les huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* se sont avérées actives uniquement sur la souche *E. feacalis*, dont la valeur moyenne de l'auréole d'inhibition est respectivement de 15,6 et 20,6 mm.

Par ailleurs, l'huile essentielle de *C. sempervirens* s'est avérée inactive sur l'ensemble des bactéries testées.

III-1.2.1.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Dans un deuxième temps, nous avons jugé intéressant de déterminer la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* vis-à-vis de la souche *E. feacalis*, qui s'est révélé sensible vis-à-vis de ces huiles essentielles (tableau 24).

Tableau 24 : Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* relative à la souche *Enterococcus faecalis*.

Concentration en $\mu\text{L}/\text{mL}$	Huile essentielle de <i>J. phoenicea</i>	Huile essentielle de <i>J. oxycedrus</i>
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	-
6	+	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-

- : pas de croissance + : croissance

Ces résultats confirment ceux obtenus avec l'aromatogramme. En effet la souche testée est inhibée à partir d'une concentration de $5\mu\text{L}/\text{mL}$ de l'huile essentielle de *J. oxycedrus*, alors qu'elle ne révèle une sensibilité qu'à partir de $7\mu\text{L}/\text{mL}$ pour l'huile essentielle de *J. phoenicea*.

III-1.2.2 Activité antifongique des huiles essentielles testée par la méthode de contact direct

Les pourcentages d'inhibition des huiles essentielles de *J. phoenicea*, de *J. oxycedrus* et de *C. sempervirens* relatives aux souches fongiques testées sont donnés dans la **figure 35**.

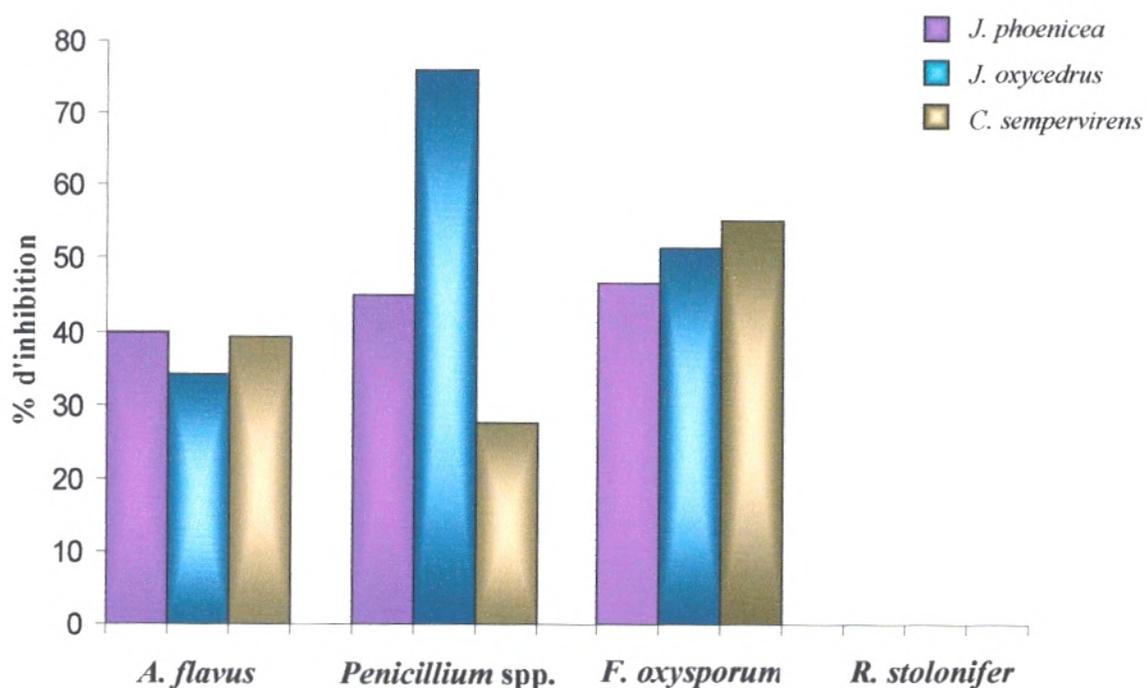


Figure 35 : Pourcentages d'inhibition des huiles essentielles relatifs aux différentes souches fongiques.

Les trois moisissures : *A. flavus*, *Penicillium spp.* et *F. oxysporum* se sont montrées sensibles vis-à-vis de l'ensemble des huiles essentielles testées. Cependant, la souche *R. stolonifer* a manifesté une résistance totale, où aucune réduction de la croissance de la colonie n'a été observée.

Les huiles essentielles de *J. phoenicea* et *C. sempervirens* présentent le même taux d'inhibition vis-à-vis d' *A. flavus*.

La souche *Penicillium ssp.* s'est révélée très sensible vis-à-vis de l'huile essentielle de *J. oxycedrus* par rapport aux huiles essentielles des deux autres plantes.

L'huile essentielle de *C. sempervirens* a pu réduire le taux de croissance de la souche *F. oxysporum* de : 55,28%, suivi par l'huile de *J. oxycedrus* et celle de *J. phoenicea* avec respectivement des taux d'inhibition de : 51,42 et 46,71%.

Discussion :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de nos plantes nous a permis de déduire que toutes ces huiles sont inactives sur l'ensemble des souches testées, à l'exception des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus*, qui se sont avérées actives vis-à-vis de la souche *Enterococcus faecalis*.

Cette faible activité est due à leur composition chimique. En effet, l'huile essentielle de *C. sempervirens*, qui s'est révélée inactive vis-à-vis de toutes les souches bactériennes, est très riche en α -pinène (60,51%).

Ainsi, nous pouvons conclure que l' α -pinène ne présente aucun pouvoir antibactérien. Ceci a déjà été confirmé par les travaux de **Chéraïf et al. (2007)**. Cette étude a montré que les huiles essentielles de *Cupressus arizonica* Greene, riches en α -pinène (feuilles (20,0%), branches (58,6%), cônes (60,5%)), possèdent une faible activité vis-à-vis de différentes souches bactériennes, à savoir : *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, et *S. pneumoniae*, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 8 et 17 mm.

L'activité antibactérienne plus ou moins importante des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* par rapport à celle de *C. sempervirens* est due probablement à la présence d'autres composés en quantité appréciable, à savoir : le β -phellandrène (22,37%) et l'acétate d' α -terpényle (14,68%) (huile essentielle de *J. phoenicea*), et le D-germacrène (8,88%) (huile essentielle de *J. oxycedrus*).

En effet, il a été démontré que l'huile essentielle de *Chamaecyparis obtusa*, riche en acétate d' α -terpényle (13,71%), possède une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *B. cereus*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. monocytogenes*, *S. pyogenes* et *S. mutans* (**Yang et al., 2007**). Par ailleurs, l'huile essentielle de *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. & Kotschy, riche en β -phellandrène (17,6%), est très active vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* (**Demirci et al., 2007**).

Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'une huile essentielle a un potentiel antimicrobien si elle présente des CMI's inférieurs à 2000 μ g/mL (**Teixeira et al., 2005**).

Ainsi, les huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus*, présentent une très faible activité vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis*, ayant des CMI's très élevées : 7 μ L/mL et 5 μ L/mL respectivement pour les deux huiles.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *J. phoenicea* a montré que cette huile a une faible activité vis-à-vis de *Klebsiella oxytoca* et *Lactobacillus plantarum*. Ceci confirme nos résultats (**Bouzouita et al., 2006**).

Concernant le pouvoir antifongique, les différentes huiles agissent de la même manière vis-à-vis de chaque souche testée, à l'exception de l'huile essentielle de *J. oxycedrus*, qui se révèle très active vis-à-vis de la souche *Penicillium* ssp.

En comparant les résultats obtenus avec nos huiles à ceux des antibiotiques, nous pouvons en conclure que nos huiles essentielles ont une activité antibactérienne très faible, à l'exception des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* vis-à-vis de la souche *Enterococcus faecalis*. Les diamètres des zones d'inhibition de ces deux huiles relatifs à cette souche sont comparables à ceux trouvés respectivement avec l'Amoxicilline-Ac Clavulanique et le Triméthoprime-Sulfaméthoxazole.

De même, nos huiles ont une activité antifongique très faible par rapport à l'amphotéricine B, à l'exception de l'huile essentielle de *J. oxycedrus* vis-à-vis de la souche *Penicillium* ssp., qui présente un pourcentage d'inhibition (76,08%) proche de celui de l'amphotéricine B (79,64%).

III-2 Pouvoir antioxydant des flavonoïdes

Dans le but de déterminer l'activité antioxydante des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes de nos plantes, une méthode a été adoptée qui est celle de piégeage du radical libre DPPH.

Afin de comparer cette activité antioxydante avec celle de l'acide ascorbique, une courbe d'étalonnage réalisée par ce dernier (figure 36) a été tracée.

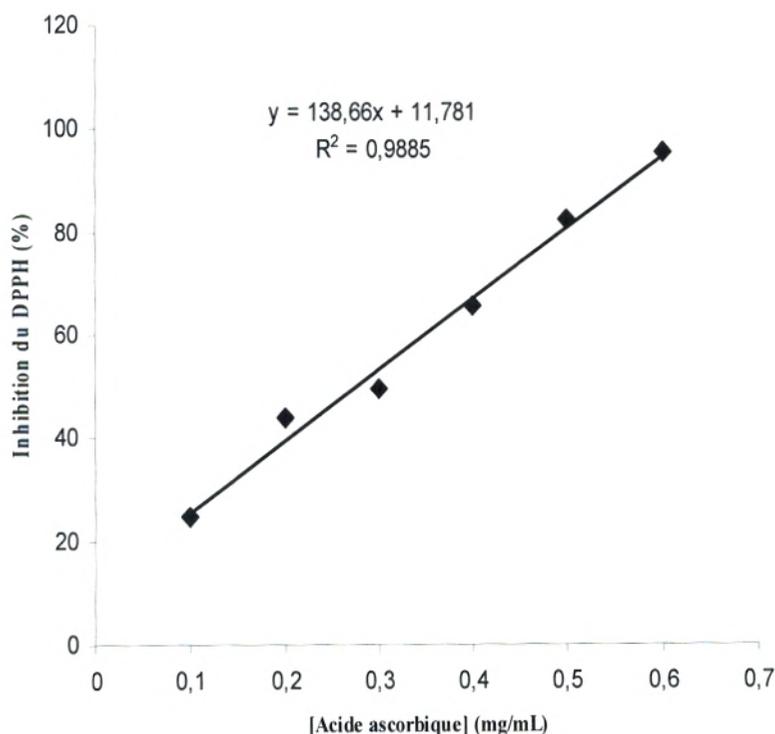


Figure 36 : Activité antioxydante de l'acide ascorbique

Les résultats obtenus ont montré que toutes les fractions de nos espèces possèdent des capacités de réduction du radical libre DPPH. Ainsi, toutes ces fractions présentent une variation linéaire du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH avec l'augmentation de la concentration de l'extrait (**figure 37-42**). Ces résultats montrent que nos extraits possèdent une activité antioxydante, ce qui est confirmé par la littérature que les plantes contenant les flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydantes (**Larson, 1988 ; Raj et Shalini, 1999 ; Badami et al., 2003**).

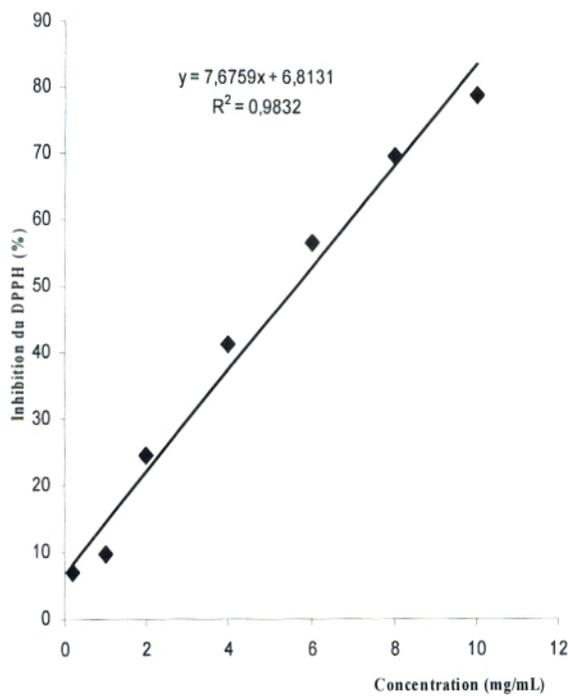


Figure 37 : Activité antioxydante de la fraction AcOEt de *J. phoenicea* L.

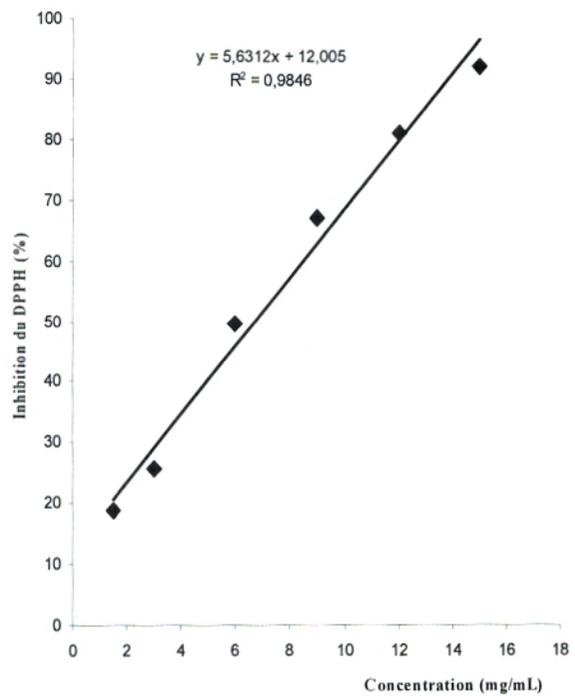


Figure 38 : Activité antioxydante de la fraction n-buOH de *J. phoenicea* L.

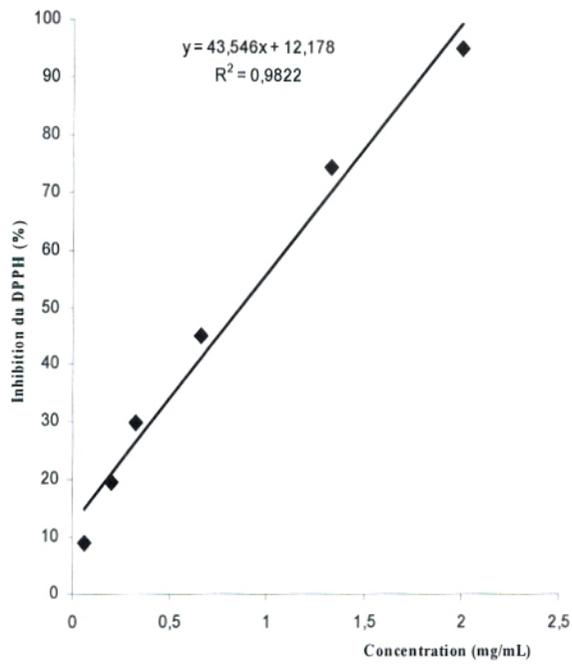


Figure 39 : Activité antioxydante de la fraction AcOEt de *J. oxycedrus* L.

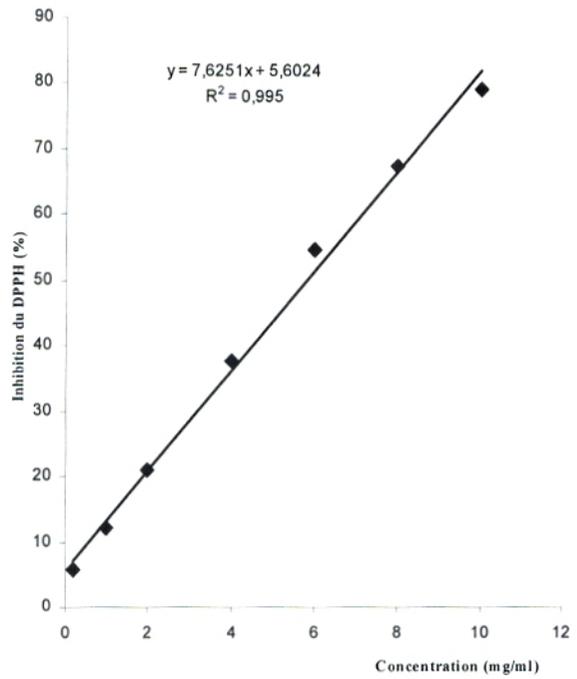


Figure 40 : Activité antioxydante de la fraction n-buOH de *J. oxycedrus* L.

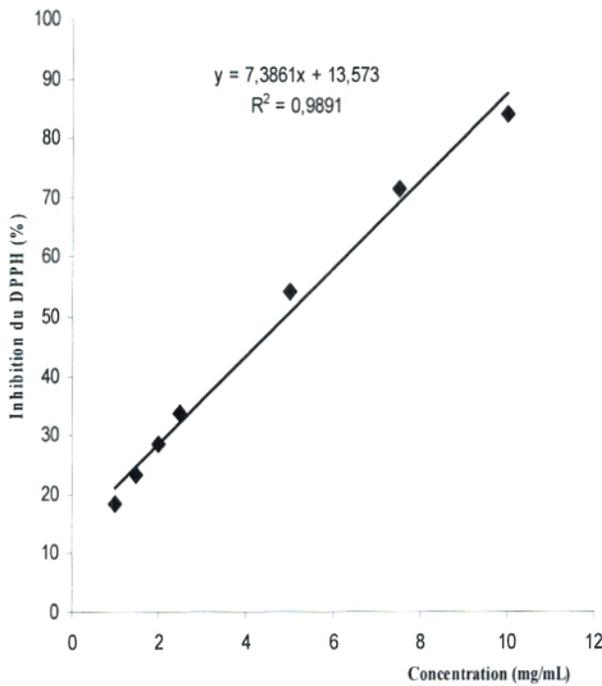


Figure 41 : Activité antioxydante de la fraction AcOEt de *C. sempervirens* L.

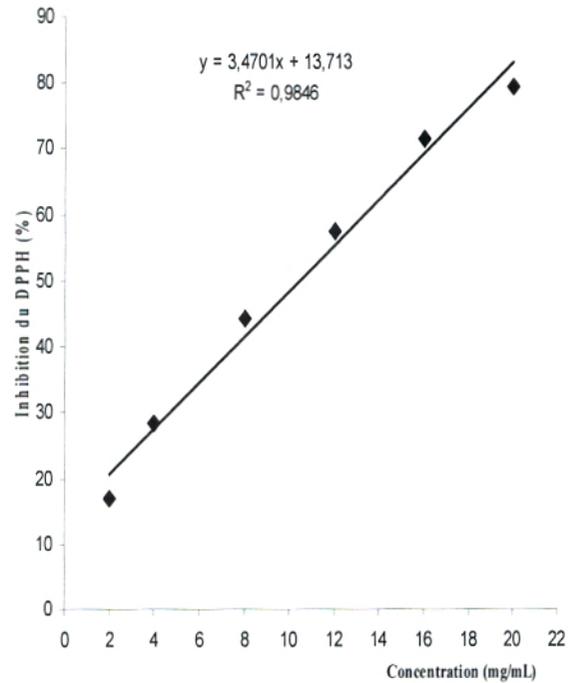


Figure 42 : Activité antioxydante de la fraction n-buOH de *C. sempervirens* L.

Afin de comparer l'activité antioxydante des deux fractions obtenues pour chaque plante, nous avons exprimé cette dernière en EC₅₀ (**tableau 25**), un paramètre qui définit la concentration efficace du substrat qui cause une réduction de 50% de la concentration initiale de DPPH. Ces EC₅₀ sont déterminées graphiquement dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait flavonoïdique et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

Un autre paramètre exprimant la puissance antiradicalaire « ARP » a été calculé, il est égal à 1/ EC₅₀ (**tableau 25**).

Tableau 25 : EC₅₀ et puissance antiradicalaire (ARP) des extraits naturels et du standard.

plante standard	Fraction	EC ₅₀ (mg/mL)	ARP
<i>J. phoenicea</i>	Fraction AcOEt	5,62	0,17
	Fraction n-buOH	6,74	0,14
<i>J. oxycedrus</i>	Fraction AcOEt	0,86	1,16
	Fraction n-buOH	5,82	0,17
<i>C. sempervirens</i>	Fraction AcOEt	4,93	0,20
	Fraction n-buOH	10,45	0,09
Acide ascorbique		0,27	3,70

♣ Acide ascorbique

L'acide ascorbique, connu par son pouvoir antioxydant puissant (Frei et al., 1990), présente une EC₅₀ de l'ordre de 0,27 mg/mL, ce qui correspond à une puissance antiradicalaire de 3,70.

♣ *J. phoenicea*

Selon les résultats obtenus, on note que la fraction AcOEt est un peu plus antioxydante que la fraction n-buOH, dont les valeurs de la EC₅₀ sont respectivement de 5,62 et 6,74 mg/mL.

♣ *J. oxycedrus*

Pour cette espèce, la fraction AcOEt possède une EC₅₀ (0,86 mg/mL) six fois plus faible que celle de la fraction n-buOH (5,82 mg/mL), ce qui se traduit par une meilleure activité antioxydante.

♣ *C. sempervirens*

De même la fraction AcOEt obtenue à partir de cette espèce possède une capacité plus importante de piégeage du radical libre DPPH que celle de la fraction n-buOH. La

concentration nécessaire pour réduire à 50% le radical libre DPPH est de 4,93 mg/mL pour la fraction AcOEt, deux fois plus faible que celle de la fraction n-buOH (10,45 mg/mL).

Vu l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons en déduire que la fraction AcOEt reste la fraction la plus antioxydante de nos espèces.

Selon les résultats représentés dans les **figures 43** et **44**, nous pouvons en conclure que toutes les fractions (à l'exception de la fraction AcOEt de *J. oxycedrus*) obtenues à partir de nos plantes possèdent une activité antioxydante faible par comparaison avec celle de l'acide ascorbique.

Nos résultats obtenus avec l'espèce *J. oxycedrus* concordent à ceux reportés par les travaux de **Djeridane et al. (2006)**. Cette étude a montré que l'extrait phénolique de *J. oxycedrus* présente une activité antioxydante significative quant au piégeage du cation radical $ABTS^{\cdot+}$.

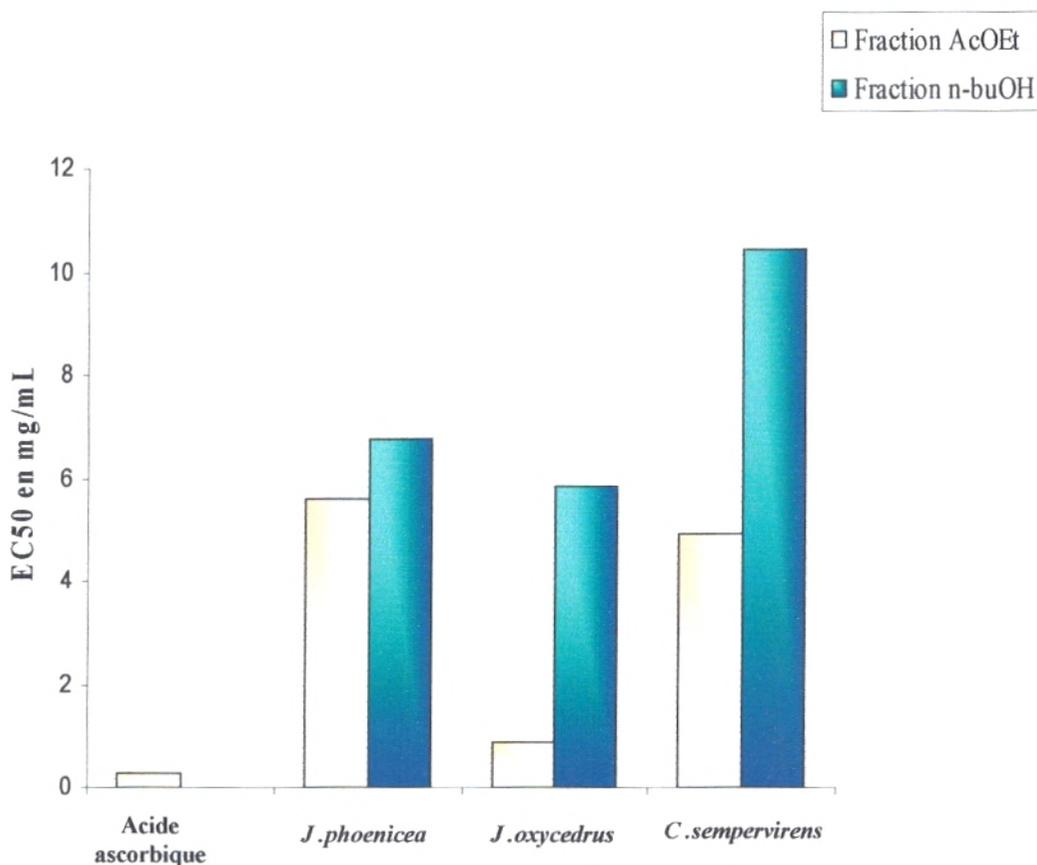


Figure 43 : EC₅₀ des extraits flavonoïdiques et du standard.

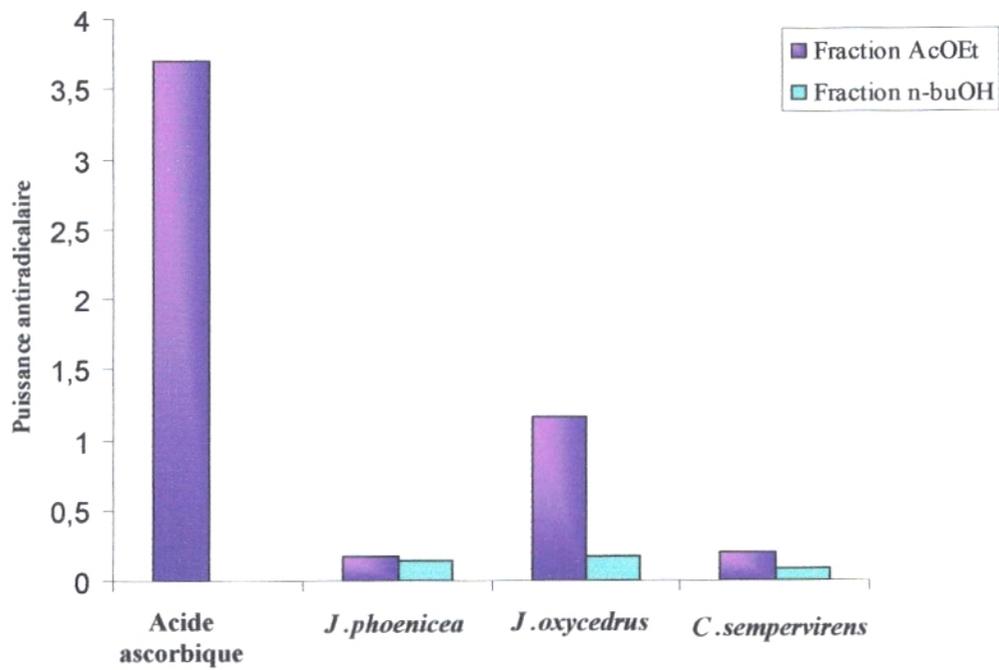


Figure 44 : ARP des extraits flavonoïdiques et du standard.

Conclusion générale

Notre étude réalisée au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), nous a permis de mettre en évidence la présence des différentes familles de composés chimiques dans les feuilles de *Juniperus phoenicea* L., de *Juniperus oxycedrus* L. et de *Cupressus sempervirens* L., ainsi que l'évaluation des activités biologiques de ces plantes.

Les tests phytochimiques ont montré la présence dans l'organe étudié des plantes, des huiles essentielles, des flavonoïdes, et des tanins en quantité importante.

Au cours de l'extraction des huiles essentielles, le plus fort rendement a été obtenu pour l'espèce *Juniperus phoenicea* L., soit 0,52%. Les deux espèces *Juniperus oxycedrus* L. et *Cupressus sempervirens* L. ont donné les plus faibles rendements d'extraction avec 0,11% et 0,26% respectivement.

L'analyse des huiles essentielles de ces espèces végétales a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette dernière a permis d'identifier 36 composés représentant 97,28% de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* L. Les composés majoritaires mis en évidence dans cette huile essentielle sont : l' α -pinène (34,51%), le β -phellandène (22,37%) et l'acétate d' α -terpényle (14,68%). Dans l'huile essentielle de *Juniperus oxycedrus* L., 41 composés ont été identifiés, qui représentent 75,04% de la composition globale. Cette huile est caractérisée par une prédominance en α -pinène (39,32%), suivi du D-germacrène (8,88%). Pour l'espèce *Cupressus sempervirens* L., 35 composés ont été identifiés représentant 91,64% de la composition totale. L' α -pinène est le composé majoritaire de cette huile essentielle avec un pourcentage de 60,51%, suivi du cédrol (8,32%).

L'extraction des composés phénoliques a permis d'obtenir des rendements proches en extraits bruts voire même égaux pour les deux premières espèces : *Juniperus phoenicea* L. (24,2%), *Cupressus sempervirens* L. (24,2%) et *Juniperus oxycedrus* L. (25,4%).

Le dosage des phénols totaux a révélé une teneur élevée dans les feuilles du genévrier oxycèdre (39,1 mg/g). Alors que, les deux autres espèces présentent des teneurs proches : 30,5 mg/g et 29,7 mg/g respectivement pour le genévrier rouge et le cyprès.

Le dosage des flavonoïdes a montré que le genévrier oxycèdre possède une teneur élevée de 2,70 mg/g, par rapport aux deux autres espèces qui présentent des teneurs de 2,03 mg/g et 1,66 mg/g respectivement pour le genévrier rouge et le cyprès.

Le fractionnement de l'extrait méthanolique a permis d'obtenir un même rendement en fraction AcOEt des flavonoïdes (4%) pour les deux espèces *Juniperus phoenicea* et *Cupressus sempervirens*. Par contre, *Juniperus oxycedrus* présente un rendement faible de 2,66%.

En ce qui concerne la fraction n-buOH des flavonoïdes, l'espèce *Juniperus oxycedrus* présente le rendement le plus élevé (14%), en comparaison avec les autres plantes : (7%) pour *Cupressus sempervirens* et (4,5%) pour *Juniperus phoenicea*.

La chromatographie sur couche mince que nous avons effectuée sur les fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes, nous a permis de mettre en évidence deux flavones qui sont : la morine et l'apigénine, et un acide phénolique soit l'acide *o*-coumarique dans la fraction AcOEt de *J. phoenicea* ; la morine dans celle de *J. oxycedrus*. Alors que, cinq flavones ont été mise en évidence dans la fraction AcOEt de *Cupressus sempervirens*, qui sont : la morine, le 6'-Hydroxyflavone ou le 3,6-Dihydroxyflavone, la Chrysine, le 3-Hydroxyflavone et une flavone.

Concernant l'évaluation du rendement en tanins des feuilles des différentes plantes étudiées, l'extraction sélective nous a permis d'obtenir un taux élevé chez l'espèce *Juniperus oxycedrus* L., de l'ordre de 1.05% en poids. Les deux autres espèces présentent des rendements de 0,76% et 0,91% respectivement pour le genévrier rouge et le cyprès. L'analyse par CCM de ces extraits a permis de mettre en évidence le pyrogallol dans l'extrait de *J. phoenicea* ; le pyrogallol, le résorcinol et le catéchol dans l'extrait de *J. oxycedrus* ; le pyrogallol et le catéchol dans l'extrait de *C. sempervirens*.

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de nos plantes vis-à-vis des différentes souches pathogènes nous conduit aux conclusions suivantes :

- Les huiles essentielles des trois espèces végétales ont une faible activité antibactérienne, à l'exception des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus*, qui se révèlent actives vis-à-vis de la souche *Enterococcus faecalis*, avec des diamètres d'inhibition de 15,6 mm et 20,6 mm respectivement ;
- Ces différentes huiles possèdent une très faible activité antibactérienne en comparaison avec les antibiotiques testés, à l'exception des huiles essentielles des deux plantes *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* sur la souche *Enterococcus faecalis* ;
- L'effet de l'huile essentielle de *J. phoenicea* sur *Enterococcus faecalis* est comparable à celui de l'Amoxicilline-Ac Clavulanique ;

- L'effet de l'huile essentielle de *J. oxycedrus* sur *Enterococcus faecalis* est comparable à celui de Triméthoprime-Sulfaméthoxazole.

Pour ce qui est de l'activité antifongique, les différentes huiles essentielles possèdent une faible activité antifongique, à l'exception de l'huile essentielle de *J. oxycedrus*, qui se révèle très active vis-à-vis de la souche *Penicillium* ssp. Le pourcentage d'inhibition de cette huile essentielle (76,08%) relatif à cette souche, est proche de celui de l'amphotéricine B (79,64%).

L'étude de l'activité antioxydante des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes de nos plantes nous a montré que toutes ces fractions possèdent des capacités de réduction du radical libre DPPH.

La comparaison de cette activité avec celle de l'acide ascorbique nous a permis de déduire que toutes les fractions possèdent une faible activité antioxydante, à l'exception de la fraction AcOEt de *J. oxycedrus*, qui possède une EC_{50} (0,86 mg/mL) proche de celle de l'acide ascorbique (0,27 mg/mL).

Ainsi, il serait intéressant de compléter ce travail par le fractionnement, la purification et l'identification des molécules isolés des phases acétate d'éthyle et n-butanol par divers techniques chromatographiques, dont la chromatographie liquide haute performance (HPLC analytique et préparative) et des méthodes adaptées de RMN pour l'élucidation structurale, puis de s'orienter vers les composés phénoliques qui possèdent de nombreuses propriétés thérapeutiques en réalisant des tests d'activités biologiques in vitro et éventuellement in vivo.

Vu l'importance économique et thérapeutique des plantes médicinales, il serait donc intéressant d'approfondir les investigations phytochimique et biologique sur ces plantes afin d'isoler les molécules responsables des activités thérapeutiques, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de plantes, à moindre coût, pour une population à faible pouvoir économique.

D'ores et déjà, nous venons de prouver une fois de plus, que les plantes médicinales regorgent d'énormes potentialités thérapeutiques vérifiables par des méthodes simples et fiables sur le plan scientifique.

Nous invitons enfin les populations à une utilisation à bon escient des plantes médicinales, car un usage abusif de ces plantes conduira sans doute à une raréfaction, voire leur totale disparition.

Références Bibliographiques

- **Adams R. P.; 1995.**
In identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography (Mass Spectroscopy Allured).
Publishing : Carol Stream, IL.
- **Akrout A. ; 1999.**
Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie).
Institut des régions arides, 4119 Medecine, Tunisie 289-292.
- **Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. ; 1995.**
Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse.
Ed. Masson, Paris.
- **Association Française de Normalisation NF T75-006 ; 1998.**
Les huiles essentielles-vocabulaire-1ere liste.
- **Atik Bekkara F., Benhammou N., Panovska K. T.; 2008.**
Biological activity of essential oil and the extract of the phenolic compounds of *inula viscosa* of the area of Tlemcen (Algeria).
Advances in Food Science (AFS), **30**, 132-139.
- **BACIS (Boelens Aroma Chemical Information Service), 1999.**
ESO 2000, the complete database of essential oils.
M. H. Boelens : the Netherlands.
- **Badami S., Gupta M. K., Suresh B., 2003.**
Antioxidant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*.
J. Ethnopharmacol., **85**, 227-230.
- **Bagchi D., Sen C. K., Ray S. D., Das D. K., Bagchi M., Preuss H. G., Vinson J. A.; 2003.**
Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract.
Mut. Res., **523-524**, 87-97.
- **Barrero A. F., Herrador M. M., Arteaga P., Quílez del Moral J. F., Sánchez-Fernández E.; 2006.**
Chemical Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Juniperus phoenicea* L. from North Africa.
J. of Essent. Oil Res., **18**, 168-169.
- **Becker M., Picard J.-F., Timbal J.; 1982.**
Larousse des arbres et arbustes.
Librairie Larousse, 151-152 et 194-195.
- **Bekhechi C., Atik Bekkera F., Abdelouahid D. E.; 2007.**
Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. From Algeria.
J. Essent. Oil Res., **19**, 594-596.

- **Bekhechi C., Atik Bekkera F., Abdelouahid D. E.; 2008.**
Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie.
Phytothérapie, **6**, 153-159.
- **Bekkara F., Jay M., Viricel M. R., Rome S.; 1998.**
Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations.
J. Plant and Soil, **203**, 27-36.
- **Belarbi M., Vassilev N., Mashev N. ; 2007.**
Contribution to the investigation of food and antioxidant value of acorns of various oak species in the Algerian region.
Oxidation Communication, **29(3)**, 35-42.
- **Bellakhder J. ; 1997.**
La pharmacopée marocaine traditionnelle.
Ilbiss Press, Paris, 271-272 et 764.
- **Bello R., Moreno L., Beltrán B., Primo-Yúfera E., Esplugues J.; 1997.**
Effects on arterial blood pressure of methanol and dichloromethanol extracts from *Juniperus oxycedrus* L.
Phytotherapy Research, **11**, 161-162.
- **Bendimerad N., Taleb Bendiab S.A. , Benabadji A. B., Fernandez X., Valette L., Lizzani-Cuvelier L. ; 2005.**
Composition and antibacterial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) Rehder essential oil from Algeria.
J. Agric. Food Chem., **53**, 2947-2952.
- **Bendimerad N., Taleb Bendiab S.A. , Breme K., Fernandez X.; 2007.**
Essential oil composition of aerial parts of *Sinapis arvensis* L. from Algeria.
J.E.O.R., **19**, 206-208 (May/June)
- **Benhammou N., Atik Bekkara F., Panovska K. T.; 2007.**
Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* Desf.
Advances in Food Science (AFS), **29(3)**, 155-161.
- **Benhammou N., Atik Bekkara F., Panovska K. T.; 2008.**
Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts.
African Journal of Pharmacy and Pharmacology, **2**, 022-028.
- **Bergogne-Bérézin E., Brogard J. M. ; 1999**
Bases biologiques de l'antibiothérapie.
Ed. Masson, 27.
- **Blumberg J.; 1997.**
Nutritional Needs of seniors.
Journal of the American College of Nutrition, **16 (6)**, 517-523.

- **Bonnier G. ; 1990.**
La grande flore en couleurs. Tome 4.
Ed. Belin, Paris, 1353-1355.
- **Boullard B. ; 2001.**
Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances.
Ed. Estem, Paris, 290.
- **Bouzouita N., Kachouri F., Halima M. B., chaabouni M. M. ; 2006.**
Composition chimique, activités antioxydante antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*.
Revue des Régions Arides - Numéro spécial - Actes du séminaire international « les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales ». Maroc, El Jadida, 330-336.
- **Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.; 1995.**
Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.
Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, **28**, 25–30.
- **Bravo L.; 1998.**
polyphenols; dietary source, metabolism, and nutritional significance.
Nutrition, **56**, 317-333.
- **Boti B. J., Bighelli A., Cavaleiro C., Salgueiro L., Casanova J.; 2006.**
Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC-MS and ¹³C-NMR.
Flavour and Fragrance Journal, **21**, 268–273.
- **Brigelius-Flohe R., Traber M. G.; 1999.**
Vitamin E: function and metabolism.
FASEB J., **13**, 1145–55.
- **Bruneton J. ; 1999.**
Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales.
Techniques et documentation. Lavoisier 3^{ème} édition, Paris.
- **Buettner G. R., Jurkiewicz B. A.; 1996.**
Catalytic metals, ascorbate and free radicals : combinations to avoid.
Radiat. Res., **145**, 532-41.
- **Burits M., Bucar F.; 2000.**
Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil.
Phytother. Res., **14**, 323–328.
- **Careaga M., Fernández E., Dorantes L., Mota L., Jaramillo M. E., Hernandez-Sanchez H.; 2003.**
Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat.
International J. of Food Microbiology, **83**, 331-335.
- **Carr A., Frei B.; 1999.**
Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?
FASEB J., **13**, 1007–24.

- **Carré P. ; 1953.**
Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome 3.
Ed. Ballière J.B. et fils. France, Paris.
- **Cavaleiro C., Rezzi S., Salgueiro L., Bighelli A., Casanova J., Cunha A. P.; 2001.**
Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal.
Biochemical Systematics and Ecology, **29**, 1175–1183.
- **Chaumont J.P., Leger D.; 1989.**
Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin.
Relation structure –activité.
Plant Med. Phyto., **23(2)**, 124-126.
- **Chen Z. Y., Chan P. T.; 1996.**
Antioxydative Activity of Green Tea Catechins in Canola Oil.
Chemistry and Physics of Lipids, **82**, 163-172.
- **Cheng T. O.; 1999.**
Antioxydants in Wine and Tea.
J. Royal Soc. Med., **92**, 157.
- **Chéraif I., Jannet H. Ben, Hammami M., Khouja M.L., Mighri Z.; 2007.**
Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonica* Greene.
Biochemical Systematics and Ecology, **35**, 813-820.
- **Clifford M., Scalbert A.; 2000.**
Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden.
J. Sci. Food Agric., **80**, 1118-1125.
- **Constantin E. ; 1996.**
Spectrométrie de masse.
Ed. Lavoisier Tech. Et Doc., Paris, 1-14.
- **Cooke J. P.; 1998.**
Nutriceuticals for Cardiovascular Health.
Am. J. Cardiol., **82(10)**, 43-46.
- **Cu J.Q. ; 1990.**
Extraction de composés odorants végétales par divers solvants organiques.
Thèse de Doctorat n° 393. Institut Nationale Polytechnique. Toulouse, France.
- **Curtay J.-P., Robin J.-M.; 2000.**
Intérêt des complexes antioxydants.
Centre d'Etude et de Développement de la Nutrithérapie. Nutrithérapie INFO. Institut de Phytonutrition.
- **Davies N. W.; 1990.**
Gas chromatographic retention indexes of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases.
J. Chromatogr., **503**, 1-24.

- **Dean R. T., Fu S., Stocker R., Davies M. J.; 1997.**
Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.
J. Biochem., **324(1)**, 1–18.
- **Demirci B., Kosar M., Demirci F., Dinc M., Baser K.H.C. ; 2007.**
Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy.
Food Chemistry, **105**, 1512–1517.
- **Digrak M., İlçim A., Alma M. H.; 1999.**
Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*.
Phytotherapy Research, **13**, 584-587.
- **Dixon R. A., Paiva N. L. ; 1995.**
Stress-induced phenylpropanoid metabolism.
Plant cell, **7**, 1085-1097.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N.; 2006.**
Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds.
Food Chemistry, **97**, 654–660.
- **Duke J.A.; 1998.**
Phytochemical Database.
Ed. USDA-ARS-NGRL. Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland.
- **Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Striegl G., Waeg G.; 1991.**
Role of Vitamin E in Preventing the Oxidation of Low-Density Lipoprotein.
The American Journal of Clinical Nutrition, **53**, 314-321.
- **Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G.; 1992.**
The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.
Free Rad. Biol. Med., **13**, 341.
- **Fandohan P., Gbenou J.D., Gnonlofin B. ; 2004.**
Effet of essential oils on the growth of Fumonisin contamination in corn.
J. Agric. Food Chem., **52**, 6824-6829.
- **Favier A. ; 2003.**
Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
L'actualité chimique, **11-12**, 108-115.
- **Feng Q., Tori Y., Uchida K., Nakamura Y., Hara Y., Osawa T.; 2002.**
Black tea polyphenols, theaflavins, prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome P450 in cell cultures.
J. Agric. Food Chem., **50**, 213-220.

- **Fernández A., Ortuño I., Martos A., Fernández C.; 1996.**
Saber y utilización de plantas en la provincia de Jaén. Campaña de 1993.
Boletín del Instituto de Estudios Giennenses, **161**, 199-318.
Flavonoids in Health and Disease, **10**, 253-276.
- **Fleuriet A., Uhel C., Dédaldéchamp F.; 1996.**
Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme.
Acta Bot. Gallica, **143**, 493-500.
- **Fontaine E., Barnoud D., Schwebel C., Leverve X. ; 2002.**
Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique.
Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, **11**, 411-420.
- **Fourneau C., Laurens A., Hocquemiller R., Cavé A. ; 1996.**
Radical Scavenging Evaluation of Green Tea Extracts.
Phytotherapy Research, **10**, 529-530.
- **Frei B., Stocher R., Angletterre I., Ames B.N.; 1990.**
Ascorbate : Antioxydant le plus efficace dans le plasma sanguine humain.
Biol. D'Exp. Médi. D'Adv., **264**, 63-155.
- **Gabor M., Cody V., Middleton E. J., Harborne J. B., Beretz A., Liss A. R.; 1988.**
Plants Flavonoids in biology and Medecine II.
Biochemical, Cellular and Medecinal properties, New York, 1-15.
- **Ganou L. ; 1993.**
Contribution a l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles.
Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique. Toulouse, France.
- **Ganther H. E.; 1999.**
Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase.
Carcinogenesis, **20(9)**, 1657.
- **Garnier G., Bézanger-Beauquesne L., Debraux G. ; 1961.**
Ressources médicinales de la flore française. Tome 1.
Vigot Frères Éditeurs, Paris, 124-133.
- **Gate L., Paul J., Ba G. N., Tew K. D., Tapiero H.; 1999.**
Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants.
Biomed. Pharmacother., **53**, 169-80.
- **Girre L. ; 2001.**
Les plantes et les médicaments, l'origine végétale de nos médicaments.
Ed. Ouest France, 100.
- **Guignard J.-L., Cosson L., Henry M.; 1985.**
Abrégé de phytochimie.
Ed. Masson, Paris ; 175.

- **Guingard J. ; 1996.**
Biochimie végétale.
Ed. Lavoisier, Paris, 175-192.
- **Hadi M. ; 2004.**
La quercétine et ces dérivés: molécules à caractères pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques.
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur domaine : Pharmacochimie, Milane, 155.
- **Halliwell B., Gutteridge J. M. C.; 1990.**
The antioxidants of human extracellular fluids.
Arch. Biochem. Biophys., **280**, 1–8.
- **Harman D.; 2003.**
The free radical theory of aging.
Antioxid Redox Signal, **5**, 557–561.
- **Haslam E.; 1989.**
Plant polyphenols, Vegetable tannis revisited.
University Press, Cambridge, 230.
- **Hayouni E. A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M.; 2007.**
The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts.
Food Chemistry, **105**, 1126-1134.
- **Hernandez Ochoa I. R. ; 2005.**
Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « Solvant/Actif » d'origine végétale.
Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse Ecole Doctorale : Spécialité Sciences de procédés des Agroressources.
- **Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Katan M. B., Kromhoft D.; 1993.**
Intake of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids and Their Determinants in Adults in The Netherlands.
Nutrition and Cancer, **20** (1), 21-29.
- **Hitchon C. A., El-Gabalawy H. S.; 2004.**
Oxidation in rheumatoid arthritis.
Arthritis Res. Ther., **6(6)**, 265–278.
- **Hostettmann K., Potterat O., Wolfender J.-L.; 1998.**
The Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs.
Chimia, **52**, 10-17.
- **Hughes D.A., Wright A.J., Finglas P.M., Peerless A.C., Bailey A.L., Astley S.B., Pinder A.C., Southon S.; 1997.**
The effect of beta-carotene supplementation on the immune function of blood monocytes from healthy male nonsmokers.
J. Lab. Clin. Med., **129**, 309-317.

- **Jeller A. H., Silva D. H., Liao L. M., Bolzani Vda, S., Furlan M.; 2004.**
Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*.
Phytochemistry, **65**, 1977–1982.
- **Jennings W., Shibamoto T. ; (1980).**
In qualitative analysis of flavor and fragrance volatils by Glass Capillary Gas chromatography.
Academic Press. New York.
- **Joffin J. N., Leyral G. ; 2001.**
Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques.
3^{ème} Ed. Biologie Technique, 58.
- **Johnson F., Giulivi C.; 2005.**
Superoxide dismutases and their impact upon human health.
Mol. Aspects Med., **26**, 340–52.
- **Joulain D., König W. A.; 1998.**
The atlas of spectra data of sesquiterpene hydrocarbone.
E. B.-Verlag : Hambourg.
- **Joulain D., König W.A., Hochmuth D.H. ; 2001.**
Terpenoids and related constituents of essential oils.
Library of Mass Finder, 21.
- **Karaman I., Sahin F., Güllüce M., Ögütçü H., Sengül M., Adıgüzel A.; 2003.**
Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L.
Journal of Ethnopharmacology, **85**, 231–235.
- **Kim D.O., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H.Y., Lee C.Y.; 2003.**
Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums.
J. Agric. Food Chem., **51**, 6509-6515.
- **Koechlin-Ramonatxo C. ; 2006.**
Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires.
Nutrition clinique et métabolisme, **20**, 165–177.
- **Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y., Ichimura K.; 1979.**
Antimicrobial activity of dalmatian sage oil from differents regions of the Yugoslav Adriatic coast.
Agric. Biol. Chem., **43 (11)**, 2365.
- **Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y.; 1981.**
Antifungal activity of components of essential oils.
Agric. Biol. Chem., **45(4)**, 945.
- **Lacaille-Dubois M. A., Wagner H.; 1996.**
Importance pharmacologique des dérivés polyphénoliques.
Acta Bot. Gallica, **143**, 555-562.

- **Lafferty F. W. Mc, Stauffer D. B.; 1989.**
The Wiley NBS Registry of Mass Spectral Data.
J. Wiley & Sons. New York.
- **Landrum J. T., Bone R. A., Joa H., Kilbum M. D., Moore L. L., Sprague K. E.; 1997.**
A One Year Study of the Macular Pigment : The Effect of 140 Days of a Lutein Supplement.
Exp. Eye Res., **65**, 57-62.
- **Lapidot T., Harel S., Akiri B., Granit R., Kanner J.; 1999.**
pH- Dependent Forms of Red Wine Anthocyanins as Antioxidants.
J. Agric. Food Chem., **47(1)**, 67-70.
- **Larousse ; 2001.**
Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, préparations, soins.
Ed. Larousse, Londres, 14-29.
- **Larson R.A.; 1988.**
The antioxidants of higher plants.
Phytochemistry, **27**, 969–978.
- **Le Floc’h E. ; 1983.**
Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne.
Publi. Sci. Tunisiennes, Programme “Flore et Végétation Tunisiennes”. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, 402.
- **Lea A. G. H.; 1978.**
The phenolics of ciders : oligomeric and polymeric procyanidins.
J. Sci. Food and Agr., **29**, 471-479.
- **Leake D. S.; 1997.**
Phytochemistry of Fruit and Vegetables.
Eds. Tomás-barberán F.A. et Robins R.J., Clarendon Press, Oxford, 287-311.
- **Leake D. S.; 1998.**
Effects of Flavonoids on the Oxidation of Low-Density Lipoproteins, in Flavonoids in Health and Diseases (Rice-Evans C. and Packer L. eds.). Marcel Dekker, New York, 213-276.
- **Lebham S. ; 2005.**
Thèse au Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)-Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- **Leong L. P., Shui G.; 2002.**
An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets.
Food Chemistry, **76**, 69–75.
- **Leung A. Y., Foster S.; 1996.**
Encyclopedia of Common Natural Ingredients.
Ed. Wiley, New York, 109.

- **Lesueur D., Rocca Serra de D., Bighelli A., Hoi T. M., Ban N. K., Thai T. H., Casanova J. ; 2007.**
Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Michelia faveolata* Meryll ex Dandy from Vietnam.
Flavour and Fragrance Journal, **22**, 317 – 321.
- **Loizzo M. R., Tundis R., Conforti F., Saab A. M., Statti G. A., Menichini F. ; 2007.**
Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon.
Food Chemistry, **105**, 572–578.
- **Longevialle P. ; 1981.**
Spectrométrie de masse des substances organiques.
Ed. Masson, Paris, 3-14 ; 83-98.
- **Lugasi A., Hovari J., Sagi K. V., Biro L.; 2003.**
The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.
Acta Biologica Szegedensis, **47**, 119-125.
- **Macheix J.-J., Fleuriet A., Billot J.; 1990.**
Fruit phenolics.
Eds. CRC Press INC., Boca Raton, Florida, 378.
- **Macheix J.-J., Fleuriet A., Jay-Allemand C.; 2005.**
Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.
Ed. Parution, Monterial, Canada, 101-121.
- **Madar Z., Gottlieb H. E., Cojocar M., Riov J., Solel Z., Satejnberg A. ; 1995.**
Antifungal terpenoids produced by Cypress after infection by *Diplodia Pinea* f. sp. *Cupressi*.
Phytochemistry, **38**, 351-354.
- **Mangena T., Muyima N.Y.O.; 1999.**
Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of artemisia afra, pteronia incana and rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains.
Lett. Appli. Microbiol., **28(4)**, 291-296.
- **Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P.; 2004.**
Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments.
Médecine/Sciences, **20**, 458-63.
- **Marfak A. ; 2003.**
Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur reactive avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides.
Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges. Spécialité : biophysique. 187.

- **Marongiu B., Porcedda S., Caredda A., Gioannis B., Vargiu L., Colla P.; 2003.**
Extraction of *juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity.
Flavour and Fragrance Journal, **18**, 390-397.
- **McCord J. M., Edeas M. A.; 2005.**
SOD, oxidative stress and human pathologies : a brief history and a future vision.
Biomed. Pharmacol., **59**, 139-42.
- **Medić-Šarić M., Jasprica I., Smoleić-Bubalo A. et Mornar A.; 2004.**
Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids.
Croatica Chemica Acta., **77 (1-2)**, 361-366.
- **Mensor L.I., Menezes F.S., Leitao G.G., Reis A.S., dos Santos T., Coube C.S., Leitao S.G.; 2001.**
Screening of Brazillian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method.
Phytother. Res., **15**, 127-130.
- **Middleton E., Kardasnam C.; 1993.**
The Flavonoids, Advances in research since 1986.
Ed. Harborne J. B., Chapman and Hall, London, 617-652.
- **Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C.; 2000.**
The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease, and cancer.
Pharmacol. Rev., **52**, 673-51.
- **Milos M., Radonic A.; 2000.**
Gas chromatography mass spectral analysis of free and glycosidically bound volatile compounds from *Juniperus oxycedrus* L. growing wild in Croatia.
Food Chemistry, **68**, 333-338.
- **Molyneux P.; 2004.**
The use of the stable free radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.
Songklanakar J. Sci. Technol., **26(2)**, 211-219.
- **Montagnier L., Olivier R., Pasquier C.; 1998.**
Oxidative stress in cancer, AIDS, and Neuro-Degenerative Diseases. Marcel Dekker, INC., New York.
- **Monties B. ; 1980.**
Les polymères Végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés.
Ed. Gauthier-Villars, Paris, 66-288.
- **Moreira P. L., Zhu X., Nunomura A., Smith M. A., Perry G.; 2006.**
Therapeutic options in Alzheimer's disease.
Expert Rev. Neurother., **6 (6)**, 897-910.

- **Moreno L., Bello R., Primo-Yúfera E., Esplugues J.; 1997.**
In vitro studies of methanol and dichloromethanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L.
Phytotherapy Research, **11**, 309-311.
- **Moreno L., Bello R., Beltrán B., Calatayud S., Primo-Yúfera E., Esplugues J.; 1998.**
Pharmacological screening of different *Juniperus oxycedrus* L. extracts.
Pharmacology and Toxicology, **82**, 108-112.
- **Motiejūnaitė O., Peičulytė D. ; 2004.**
Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality.
Medicina (Kaunas), **40 (8)**, 787-794.
- **Murias M., Jager W., Handler N., Erker T., Horvath Z., Szekeres T., Nohl H., Gille L.; 2005.** Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: Structure–activity relationship.
Biochemical Pharmacology, **69**, 903–912.
- **Norris E. H., Giasson B. I.; 2005.**
Role of oxidative damage in protein aggregation associated with Parkinson’s disease and related disorders.
Antioxid Redox Signal, **7(5–6)**, 672–684.
- **Osakabe N., Yasuda A., Natsume M., Takizawa T., Terao J., Kondo K.; 2002.**
Catechins and their oligomers linked by C4-C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro.
Exp. Biol. Med. (Maywood), **227**, 51–6.
- **Paris M., Hurabielle M.; 1981.**
Abrégé de matière médicale “ Pharmacognosie ”. Tome 1, Généralités, Morphologies.
Ed. Masson, Paris ; 256-266.
- **Pellecuer J., Roussel J.L., Andary C. ; 1980.**
Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles.
Rivista Italiana Essenzo (EPPOS), **23**, 45-50.
- **Pessini G. L., Prado Dias Filho Celso B., Nakamura V., Cortez D. A. G.; 2003.**
Antibacterial activity of extracts and neolignans from Piper Regnelli (Miq.) C. DC. Var. *pallenscens* (C. DC.) yunk.
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 98.
- **Puppo A.; 1992.**
Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type Reactions; Influence of the Iron Chelator.
Phytochemistry, **31(1)**, 85-88.
- **Quezel P., Santa S. ; 1962.**
Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1.
Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 34-36.
- **Raj, K. J., Shalini, K., 1999.**
Flavonoids-a review of biological activities.
Indian Drugs, **36**, 668–676.

- **Raskin I., Ribnicky D., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D., Ripoli C., Yakobi N., Cornwell T., Pastor L., Fridlender B. ; 2002.**
Plants and human health in the twenty-first century.
Trends biotechnol., **20**, 522-531.
- **Rathee J. S., Patro B. S., Mula S., Gamre S.; 2006.**
Chattopadhyay S. Antioxidant activity of piper betel leaf extract and its constituents.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, **54**, 9046–9054.
- **Ré D. B., Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goff L., Had-Aissouni L. ; 2005.**
Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale.
Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation, **24**, 502–509.
- **Rezzi S., Cavaleiro C., Bighelli A., Salgueiro L., Cunha A. P., Casanova J.; 2001.**
Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica.
Biochemical Systematics and Ecology, **29**, 179-188.
- **Rice-Evans C. A., Packer L.; 1998.**
Flavonoids in health and disease.
Eds. Marcel Dekker, New York, 199-219.
- **Rice-Evans C. A., Packer L.; 2003.**
Flavonoids in health and disease.
Eds. Marcel Dekker, New York, 205-231.
- **Rossi P. G.; 2003.**
Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse : activité biologique des huiles essentielles.
Université de Corse, 2.
- **Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R.; 2005.**
Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods.
Food Chemistry, **91**, 621–632.
- **Salido S., Altarejos J., Nogueras M., Sánchez A., Pannecouque C., Witvrouw M., Clercq E. D.; 2002.**
Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *badia*.
Journal of Ethnopharmacology, **81**, 129- 134.
- **Sanchez de Medina F., Gamez M. J., Jimenez I., Jimenez J., Osuna J. I., Zarzuelo A.; 1994.**
Hypoglycemic activity of juniper berries.
Planta Medica, **60**, 197–200.
- **Sanchez-Moreno C.; 2002.**
Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.
Food Science and International Technology, **8**, 121–137.

- **Santos-Buelga C., Scalbert A.; 2000.**
Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health.
J. Sci. Food Agric., **80**, 1094-1117.
- **Sen C. K., Packer L., Hanninen O.; 2000.**
Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise.
Amsterdam: Elsevier, 3–53.
- **Stassi V., Verykokidou E., Loukis A., Harvala C., Philianos S. ; 1996.**
The antimicrobial activity of the essential oil of four *Juniperus* species growing wild in Greece.
Flavour and Fragrance Journal, **11**, 71-74.
- **Swanston-Flatt S. K., Day C., Bailey C. J., Flatt P. R.; 1990.**
Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice.
Diabetologia, **33**, 462–464.
- **Tapondjou A. L., Adler C., Fontem D. A., Bouda H., Reichmuth C.; 2005.**
Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val.
Journal of Stored Products Research, **41**, 91–102.
- **Teixeira Duarte M. C., Mara Figueira G., Sartoratto A., Rehder V. L. G., Delarmelina C.; 2005.**
Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants.
J. of Ethnopharmacology, **97**, 305-311.
- **Tognolini M., Barocelli E., Ballabeni V., Bruni R., Bianchi A., Chiavarini M., Impicciatore M.; 2006.**
Comparative screening of plant essential oils : Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity.
Life Sciences, **78**, 1419-1432.
- **Valentini G., Bellomaria B., Maggi F., Manzi A.; 2003.**
The Leaf and Female Cone Oils of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus* and *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Sibth. et Sm.) Ball. From Abruzzo.
J. Essent. Oil Res., **15**, 418-421.
- **Vergé S., Soulet S., Lacan F., Mas T., Arnaudinaud V., Nay B. ; 1999.**
Les polyphénols du vin : de la chimie pour la vie.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, **138**, 75-90.
- **Viollon C., Chaumont J.P. ; 1994.**
Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*.
Mycopathologia, **128 (3)**, 151-153.
- **Wong S. P., Leong L. P., William Koh J. H.; 2006.**
Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants.
Food Chemistry, **99**, 775–783.

- **Yang J.-K., Choi M.-S., Seo W.-T., Rinker D. L., Han S. W., Cheong G.-W.; 2007.**
Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtusa* leaf essential oil
Fitoterapia, **78**, 149–152.
- **Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., Toyokuni S.; 2000.**
Free radicals in chemistry, *Biology and Medicine*.
Ed. Oica International, Londres.
- **Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A. ; 2004.**
Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of *thymus vulgaris* L.
J. Essent. Oil Res., **16(1)**, 69-74.

Annexes

ANNEXES

Annexe A : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud.

Annexe B : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol.

Annexe C : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique.

Annexe D : Réactifs de caractérisation.

Annexe E : Réactions de caractérisation.

Annexe F : Rendements en huiles essentielles des différentes plantes.

Annexe G : Rendements des extraits bruts secs.

Annexe H : Rendements des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes.

Annexe I : Rendements des extraits des tanins.

Annexe J : Valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage des phénols totaux.

Annexe K : Valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Annexe L : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes.

Annexe M : Antibiogramme : sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques testés.

Annexe N : Aromatogramme : moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles relatives aux différentes souches bactériennes.

Annexe O : Pourcentages d'inhibition de l'amphotéricine B relatifs aux différentes souches fongiques.

Annexe P : Pourcentages d'inhibition des huiles essentielles relatifs aux différentes souches fongiques.

Annexe Q : Pouvoir antioxydant des flavonoïdes.

Annexe R : Structure des composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles des différentes espèces végétales.

Annexe S : Appareillage d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau).

Annexe T : Photos montrant l'effet des trois huiles essentielles sur la culture de *Fusarium oxysporum*.

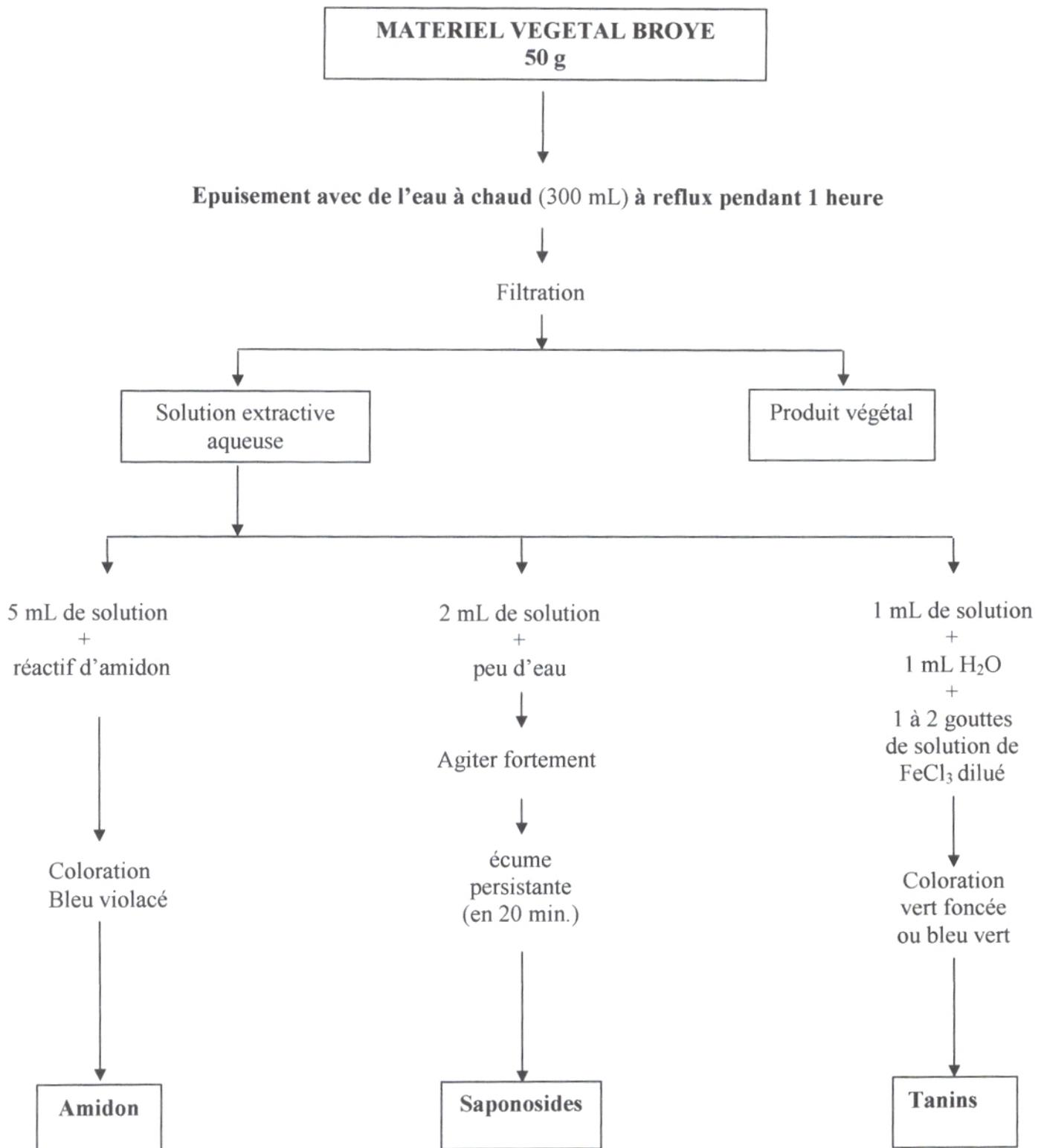
Annexe U : Photos montrant l'effet des trois huiles essentielles sur la culture de *Rhizopus stolonifer*.

Annexe V : Photos montrant l'effet des trois huiles essentielles sur la culture
d'*Aspergillus flavus*.

Annexe W : Photos montrant l'effet des trois huiles essentielles sur la culture
de *Penicillium* ssp.

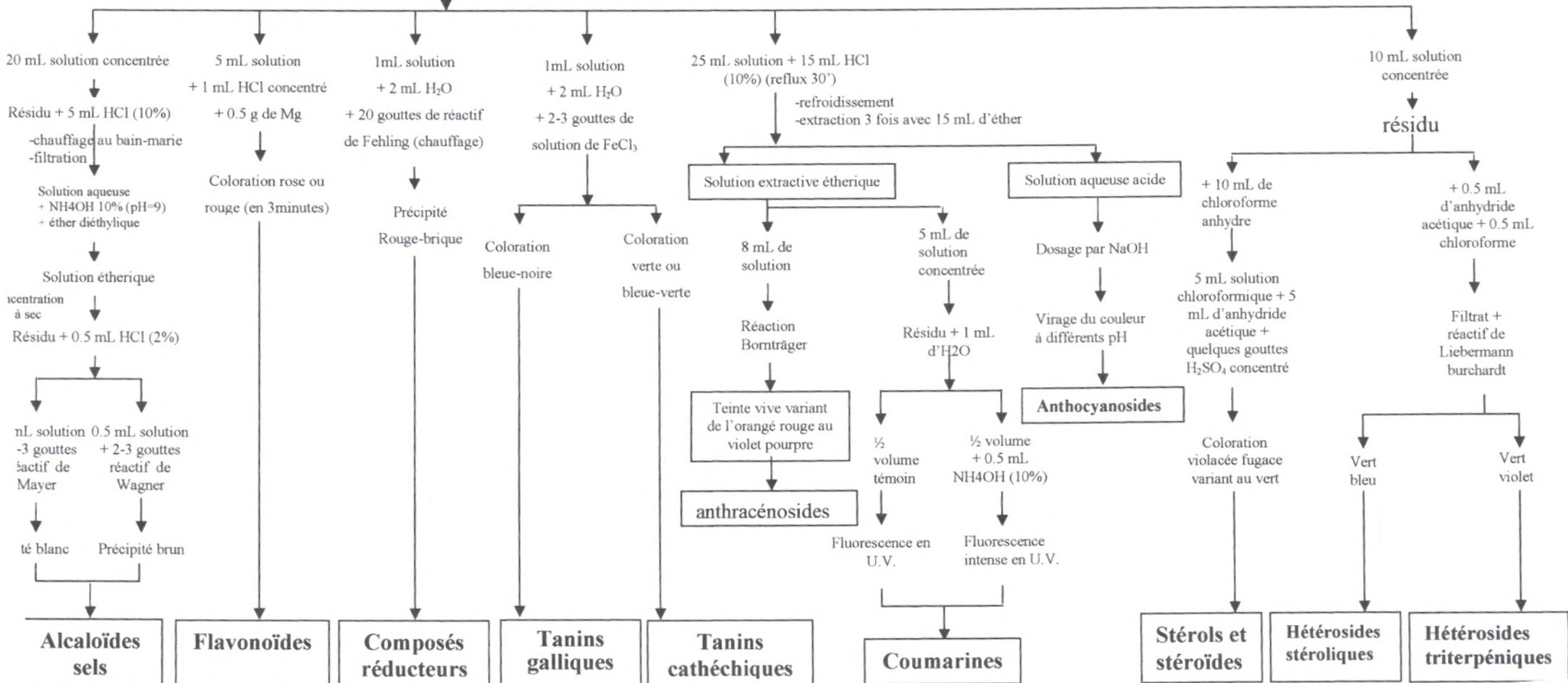
Annexe A : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud.



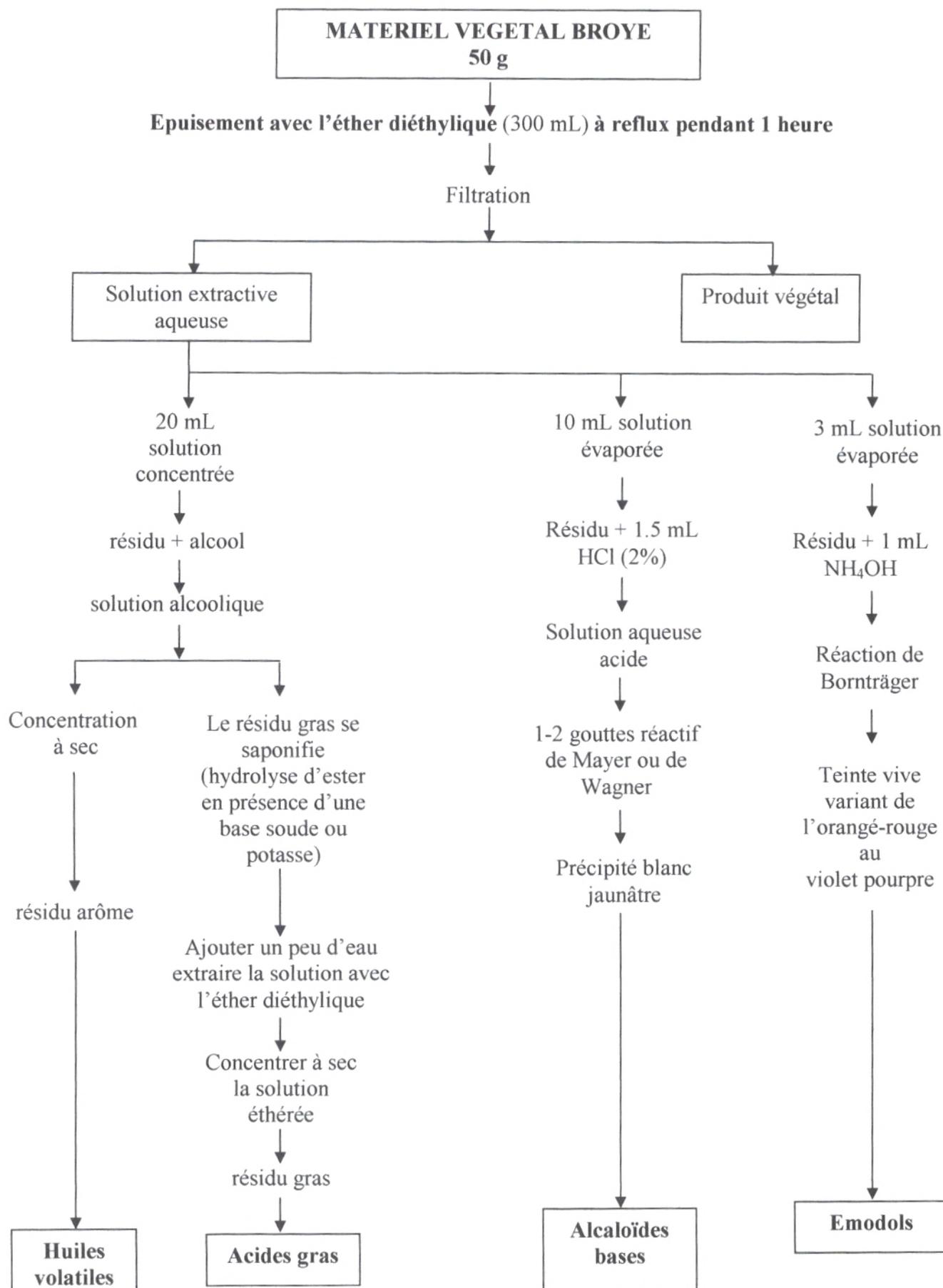
MATERIEL VEGETAL BROYE**50 g****Annexe B : Tests phytochimiques**

Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol.

Epuisement avec l'éthanol (300 mL) à reflux pendant 1 heure**Filtration****Solution extractive alcoolique****Produit végétal**

Annexe C : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique.



Annexe D : Réactifs de caractérisation.**Amidon**

L'amidon est caractérisé par un réactif spécifique connu sous le nom de réactif d'amidon. Ce dernier a été préparé comme suit :

- ✓ Dissoudre 1.2 g d'iode dans 50 mL d'eau distillée contenant 2.5 g d'iodure de potassium ;
- ✓ Chauffer pendant 5 minutes ;
- ✓ Diluer jusqu'à 500 mL.

La détection de l'amidon s'effectue comme suit :

- ✓ Chauffer 5 mL de la solution à tester avec 10 mL d'une solution de NaCl saturée dans un bain- marie jusqu'à ébullition ;
- ✓ Ajouter le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue- violacée.

Alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes se fait par :

- **Réactif de Mayer** : La préparation de ce réactif s'effectue comme suit :
 - ✓ dissoudre 1,358 g de HgCl_2 dans 60 mL d'eau ;
 - ✓ Dissoudre 5 g de KI dans 10 mL d'eau ;
 - ✓ Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 mL d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc.

- **Réactif de Wagner** : Ce réactif a été préparé comme suit :
 - ✓ dissoudre 2 g de KI et 1,27 g de I_2 dans 75 mL d'eau ;
 - ✓ Ajuster le volume total à 100 mL d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

Annexe E : Réactions de caractérisation.

♣ Stéroïdes, hétérosides stéroïdiques et triterpéniques

Leur caractérisation est basée sur la réaction de **Liebermann Burchardt**. Cette dernière consiste à :

- ✓ Mélanger 5 mL de solution à tester avec 5 mL d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ;
- ✓ agiter, puis laisser la solution reposer 30 minutes à 21°C ;

Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert. D'autre part, cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement des colorations verte – bleue et verte – violette.

♣ Anthracénosides et Emodols

Leur caractérisation fait appel à la réaction de **Bornträger**. En milieu alcalin aqueux (NH₄OH), ces composés donnent à la solution une teinte vive variant de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

Annexe F : Rendements en huiles essentielles des différentes plantes.

La plante	Origine	Rendement (%)
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	Sidi Safi	0,52
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Khemis	0,11
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Maghnia	0,26

Annexe G : Rendements des extraits bruts secs.

La plante	Rendement (%)
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	24,2
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	25,4
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	24,2

Annexe H : Rendements des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes.

La plante \ La fraction	Fraction AcOEt	Fraction n-buOH
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	4	4,5
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	2,66	14
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	4	7

Annexe I : Rendements des extraits des tanins.

La plante	Rendement (%)
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	0,76
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	1,05
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	0,91

Annexe J : Valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage des phénols totaux.

Dose mg/L	40	70	130	190	250	500
Abs (725nm)	0,150	0,214	0,347	0,508	0,646	1,249
	0,152	0,247	0,354	0,510	0,649	1,244
	0,154	0,229	0,349	0,511	0,651	1,254
Abs moyenne	0,152 ± 0,002	0,230 ± 0,016	0,350 ± 0,003	0,509 ± 0,001	0,648 ± 0,002	1,249 ± 0,005

Annexe K : Valeurs de l'absorbance pour la courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Dose µg/mL	5	10	20	30	40	50
Abs (510nm)	0,125	0,131	0,151	0,159	0,168	0,191
	0,122	0,136	0,150	0,157	0,166	0,184
	0,119	0,132	0,153	0,161	0,170	0,183
Abs moyenne	0,122 ± 0,003	0,133 ± 0,002	0,151 ± 0,001	0,159 ± 0,002	0,168 ± 0,002	0,186 ± 0,004

Annexe L : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes.

La plante	Quantité des phénols totaux en mg éq. acide gallique/g	Quantité des flavonoïdes en mg éq. catéchine/g
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	30,5	2,03
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	39,1	2,70
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	29,7	1,66

Annexe M : AntibioGramme : sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques testés.

Souches \ ATB	AMC	TE	SXT	CL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	R	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	R	R	R	R
<i>St. Aureus</i> ATCC 25923	I	R	S	S
<i>E. feacalis</i> ATCC 29212	I	S	S	S
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	R	S	R	R

Annexe N : Aromatogramme : moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles relatives aux différentes souches bactériennes.

Souches bactériennes	H.E. de <i>J. phoenicea</i>	H.E. de <i>J. oxycedrus</i>	H.E. de <i>C. sempervirens</i>	Témoin
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9,6	9,6	9,3	6,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6,8	6,6	7,0	6,0
<i>St. Aureus</i> ATCC 25923	10,3	7,3	10,3	6,0
<i>E. feacalis</i> ATCC 29212	15,6	20,6	9,0	6,0
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	7,0	9,3	7,6	6,0

Annexe O : Pourcentages d'inhibition de l'amphotéricine B relatifs aux différentes souches fongiques.

ATF \ Souche	<i>A. flavus</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. stolonifer</i>
AB	88,10	79,64	88,12	68

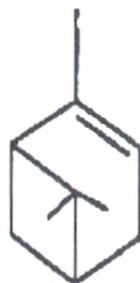
Annexe P : Pourcentages d'inhibition des huiles essentielles relatifs aux différentes souches fongiques.

Souches fongiques	H.E. de <i>J. phoenicea</i>	H.E. de <i>J. oxycedrus</i>	H.E. de <i>C. sempervirens</i>
<i>A. flavus</i> (O₂)	39,96	34,23	39,29
<i>Penicillium ssp.</i> (B.T₂)	45	76,08	27,60
<i>F. oxysporum</i> (F₁₆)	46,71	51,42	55,28
<i>R. stolonifer</i> (O₁)	0	0	0

Annexe Q : Pouvoir antioxydant des flavonoïdes.

La plante Standard	L'extrait	Concentration (mg/mL)	Absorbance				% d'inhibition
			Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs moyenne	
Contrôle (DPPH)		0	0,970	0,951	0,965	0,962 ± 0,009	
<i>J. phoenicea</i>	Extrait d'acétate d'éthyle	0,2	0,895	0,899	0,892	0,895 ± 0,003	6,96
		1	0,865	0,870	0,873	0,869 ± 0,004	9,66
		2	0,728	0,726	0,730	0,728 ± 0,002	24,32
		4	0,568	0,564	0,566	0,566 ± 0,002	41,16
		6	0,417	0,417	0,417	0,417 ± 0,000	56,65
		8	0,303	0,278	0,297	0,292 ± 0,013	69,64
		10	0,204	0,200	0,209	0,204 ± 0,004	78,79
Contrôle (DPPH)		0	0,813	0,815	0,814	0,814 ± 0,001	
<i>J. phoenicea</i>	Extrait du n- butanol	1,5	0,663	0,662	0,661	0,662 ± 0,001	18,67
		3	0,608	0,601	0,611	0,606 ± 0,005	25,55
		6	0,409	0,411	0,410	0,410 ± 0,001	49,63
		9	0,266	0,269	0,273	0,269 ± 0,003	66,95
		12	0,158	0,153	0,156	0,155 ± 0,002	80,95
		15	0,064	0,065	0,065	0,064 ± 0,000	92,13
Contrôle (DPPH)		0	1,089	1,077	1,082	1,082 ± 0,006	
<i>J. oxycedrus</i>	Extrait d'acétate d'éthyle	0,06	0,988	0,985	0,980	0,984 ± 0,004	9,05
		0,2	0,876	0,868	0,870	0,871 ± 0,004	19,50
		0,33	0,760	0,758	0,764	0,760 ± 0,003	29,75
		0,66	0,593	0,596	0,597	0,595 ± 0,002	45
		1,33	0,276	0,277	0,281	0,278 ± 0,002	74,3
		2	0,052	0,056	0,057	0,055 ± 0,002	94,91
Contrôle (DPPH)		0	1,174	1,172	1,173	1,173 ± 0,001	
<i>J. oxycedrus</i>	Extrait du n-butanol	0,2	1,109	1,096	1,112	1,105 ± 0,008	5,79
		1	1,030	1,030	1,031	1,030 ± 0,000	12,19
		2	0,935	0,929	0,925	0,929 ± 0,005	20,80
		4	0,732	0,731	0,735	0,732 ± 0,002	37,59
		6	0,532	0,535	0,537	0,534 ± 0,002	54,47
		8	0,385	0,386	0,379	0,383 ± 0,003	67,34
		10	0,252	0,242	0,249	0,247 ± 0,005	78,94

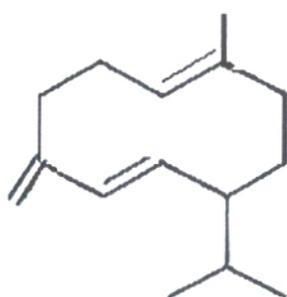
Annexe R : Structure des composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles
des différentes espèces végétales.



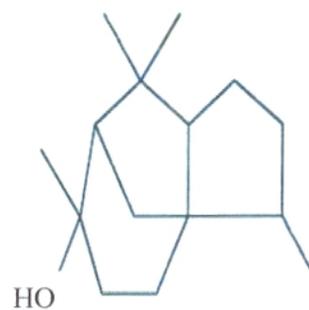
α -pinène



β -phellandrène

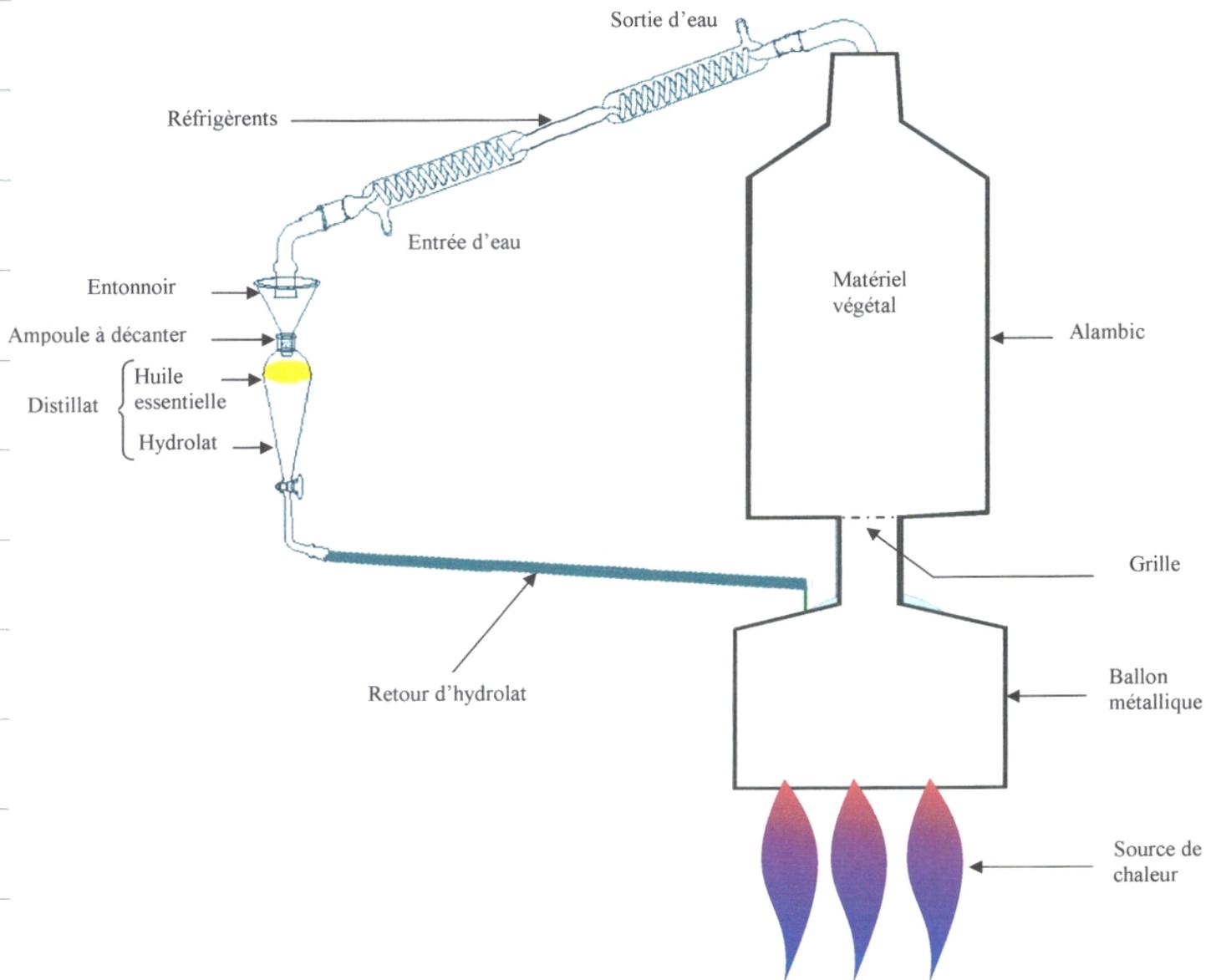


D-germacrène

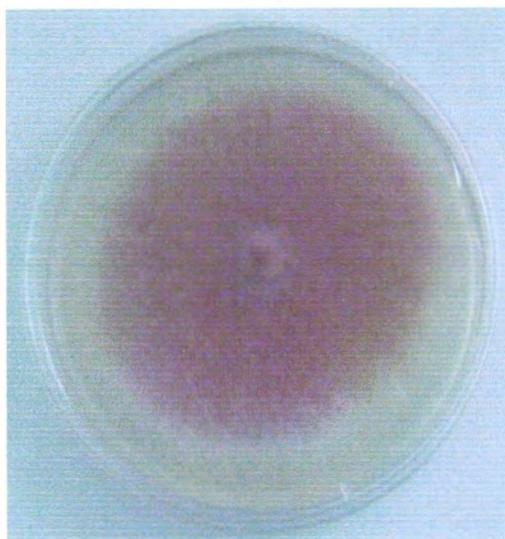


Cèdrol

Annexe S : Appareillage d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau).



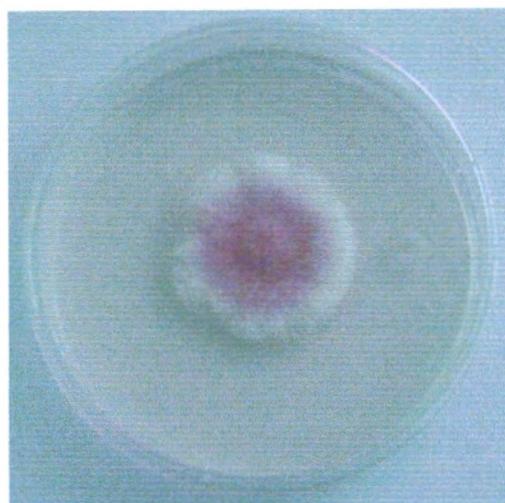
Annexe T : Photos montrant l'effet des trois huiles essentielles sur la culture de *Fusarium oxysporum*.



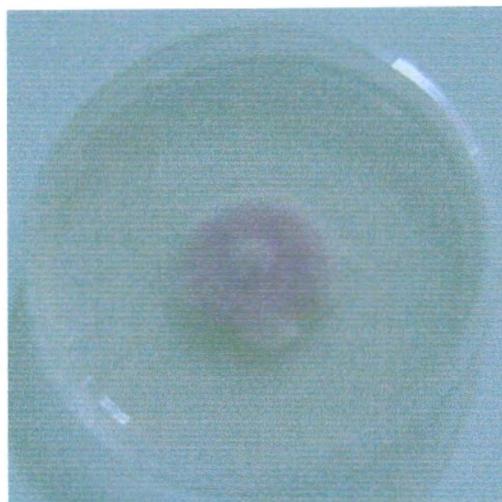
Témoin



H. E. de *J. oxycedrus*

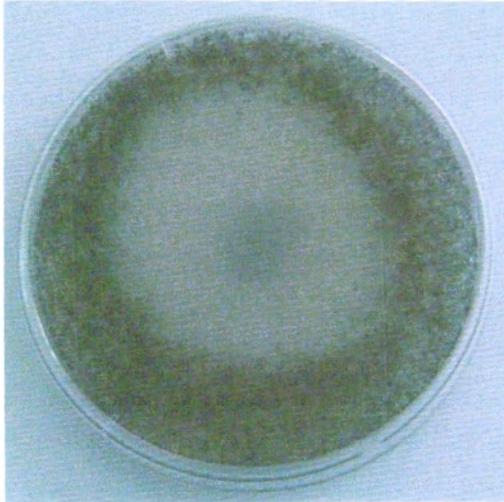


H. E. de *J. phoenicea*

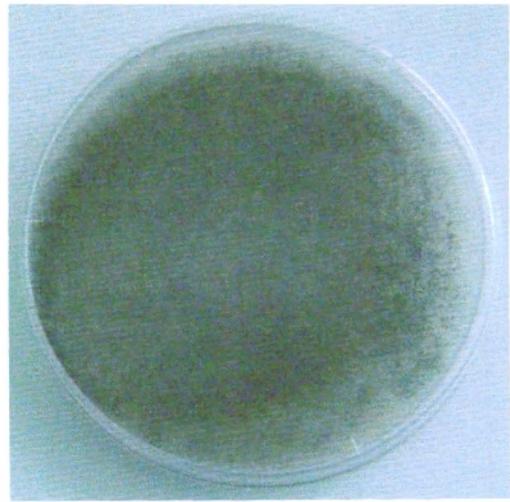


H. E. de *C. sempervirens*

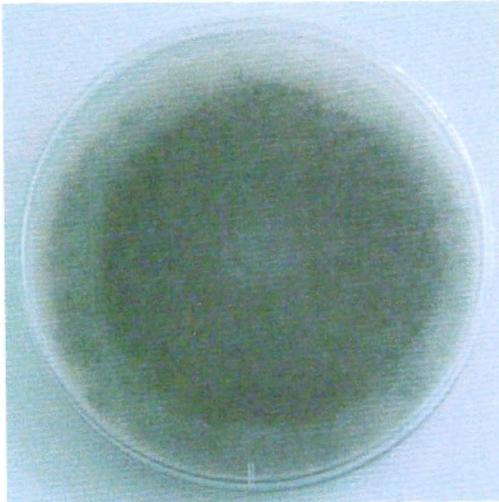
Annexe U : Photos montrant l'effet des trois huiles essentielles sur la culture de *Rhizopus stolonifer*.



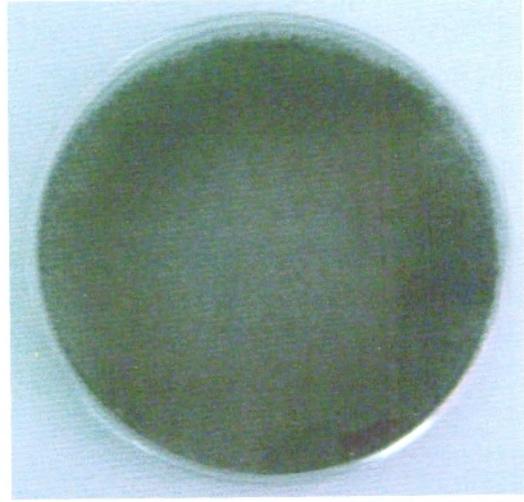
Témoin



H.E. de *J. oxycedrus*

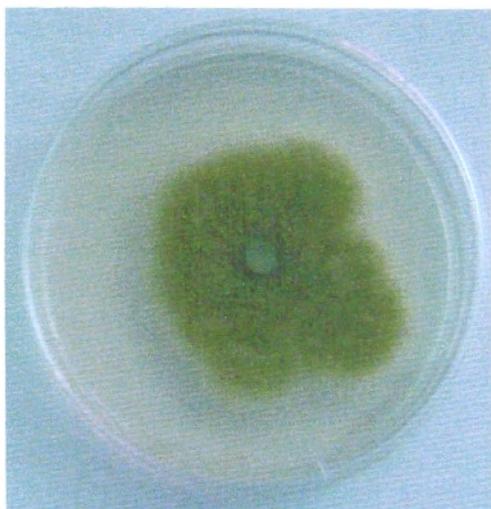


H.E. de *J. phoenicea*



H.E. de *C. sempervirens*

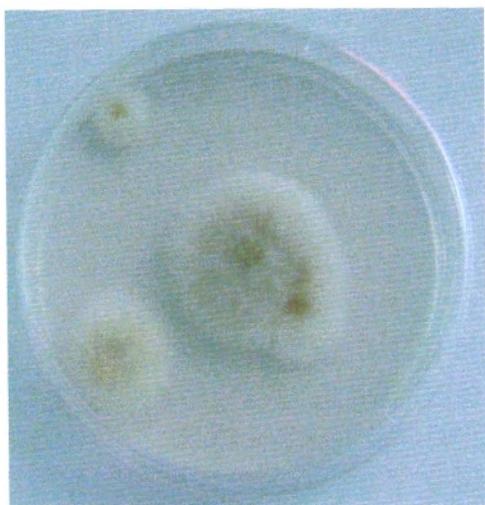
Annexe V : Photos montrant l'effet des trois huiles essentielles sur la culture
d'*Aspergillus flavus*.



Témoin



H. E. de *J. oxycedrus*



H. E. de *J. phoenicea*

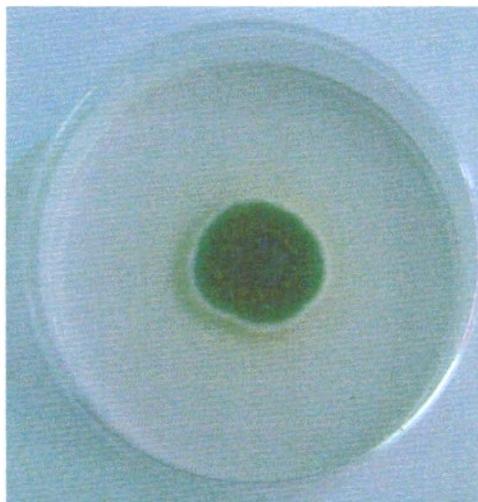


H. E. de *C. sempervirens*

Annexe W : Photos montrant l'effet des trois huiles essentielles sur la culture de *Penicillium* ssp.



Témoin



H. E. de *J. oxycedrus*



H. E. de *J. phoenicea*



H. E. de *C. sempervirens*

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de trois plantes : *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L. et *Cupressus sempervirens* L., poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen.

Des tests phytochimiques réalisés lors de cette étude ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les feuilles de ces plantes.

L'extraction des huiles essentielles nous a révélé que le rendement en huile essentielle de *J. phoenicea* (0,52%) est plus élevé par rapport à ceux de *J. oxycedrus* et *C. sempervirens*, qui présentent respectivement des rendements de 0,11% et 0,26%. La détermination de la composition chimique de ces huiles essentielles a été réalisée par CPG/SM. Les composés majoritaires mis en évidence dans l'huile essentielle de *J. phoenicea* sont : l' α -pinène (34,51%), le β -phellandène (22,37%) et l'acétate d' α -terpényle (14,68%). L'huile essentielle de *J. oxycedrus* est caractérisée par une prédominance en α -pinène (39,32%), suivi du D-germacrène (8,88%). Pour l'espèce *C. sempervirens*, l' α -pinène (60,51%) est le composé majoritaire, suivi du cédrol (8,32%).

L'extraction des composés phénoliques a permis d'obtenir un même rendement pour les deux espèces : *Juniperus phoenicea* (24,2%) et *Cupressus sempervirens* (24,2%). Quant à l'espèce *Juniperus oxycedrus*, il présente un rendement proche de ces derniers (25,4%).

Le fractionnement de l'extrait méthanolique a permis d'obtenir le même rendement de la fraction AcOEt (4%) pour les deux espèces *J. phoenicea* et *C. sempervirens*. Par contre, *J. oxycedrus* présente un rendement faible de 2,66%. En ce qui concerne la fraction n-BuOH, *Juniperus oxycedrus* présente le rendement le plus élevé (14%) en comparaison avec les autres plantes : (7%) pour *C. sempervirens* et (4,5%) pour *J. phoenicea*. L'analyse par CCM de ces fractions nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de flavonoïdes et d'acides phénoliques.

L'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de ces plantes a montré que les huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* se sont avérées actives uniquement sur la souche bactérienne *Enterococcus faecalis*. La souche fongique *Penicillium* ssp. s'est révélée sensible vis-à-vis de l'huile essentielle de *J. oxycedrus* par rapport aux huiles essentielles des deux autres plantes.

L'étude du pouvoir antioxydant des fractions AcOEt et n-BuOH des flavonoïdes de ces plantes nous a permis de déduire que toutes ces fractions (à l'exception de la fraction AcOEt de *J. oxycedrus*) possèdent une activité antioxydante faible par comparaison avec celle de l'acide ascorbique.

Mots clés : *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L., *Cupressus sempervirens* L., huiles essentielles, flavonoïdes, CPG/SM, CCM, pouvoir antimicrobien, pouvoir antioxydant.

Abstract

This work is concerned to the phytochemical and biological study for three plants, growing wild in Tlemcen region : *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupressus sempervirens* L.

The phytochemical tests, which had been done while this study enabled us to detect different families of the chemical compounds existing in leaves of these plants.

The extraction of the essential oils reveals us that the yield of essential oil of *J. phoenicea* (0,52%) has been more higher than those of *J. oxycedrus* and *C. sempervirens*, which present respectively a yield of 0,11% and 0,26%.

The determination of the chemical composition of these essential oils has been carried by GC/MS. The major components identified in the essential oil of *J. phoenicea* are : the α -pinene (34,51%), the β -phellandrene (22,37%), and the acetate d' α -terpényle (14,68%). The essential oil of *J. oxycedrus* is characterized by a predominance of α -pinene (39,32%), followed by the D-germacrene (8,88%). For the species *C. sempervirens*, the α -pinene (60,51%) is the major component, followed by the cedrol (8,32%).

The extraction of phenolic compounds enabled to obtain a same yield for the two species : *Juniperus phoenicea* (24,2%) and *Cupressus sempervirens* (24,2%). As for the species *J. oxycedrus*, he presents a yield close to these latter's (25,4%).

The fractionation of the methanol extract enabled to obtain the same yield of the fraction AcOEt (4%) for both species *J. phoenicea* and *C. sempervirens*. However, *J. oxycedrus* present a weak yield of 2,66%. With regard to fraction n-BuOH, *J. oxycedrus* present the highest yield (14%) compared to the other plants : (7%) for *C. sempervirens* and (4,5%) for *J. phoenicea*. The analysis by TLC of these fractions enabled us to make it possible to highlight a certain number of flavonoids and phenolic acids.

The study of antimicrobial activity of essential oils of these plants has shown that the essential oils of *J. phoenicea* and *J. oxycedrus* have proved active only on the bacterial strain *Enterococcus faecalis*. The fungal strain *Penicillium* ssp. has been susceptible to the action of essential oil of *J. oxycedrus* compared to the essential oils of both other plants.

The study of antioxidant activity of flavonoids' fraction AcOEt and n-BuOH of these plants enabled us to deduce that all these fractions (with exception of fraction AcOEt of *J. oxycedrus*) possess a weak antioxidant activity compared to that of ascorbic acid.

Keywords : *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L., *Cupressus sempervirens* L., essential oils, flavonoids, GC/MS, TLC, antimicrobial activity, antioxidant activity.

ملخص

يهدف هذا العمل حول دراسة فيسيوكيميائية وبيولوجية ثلاثة نباتات بوية شائعة لتلمسان وهي : *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L. و *Cupressus sempervirens* L. من حيث الاختبارات الفيزيوكيميائية التي تم إنجازها خلال هذه الدراسة من أبحاث مختلف المكونات الكيميائية الموجودة بأوراق هذه النباتات.

بين لنا استخلاص الزيوت الأساسية من مرودود الزيت الأساسي لـ *J. phoenicea* (0,52%) هو أعلى والنسبة لمرودودات *J. oxycedrus* و *C. sempervirens* اللذين يمثلون مرودودات 0,11% و 0,26% على التوالي.

لقد تم تحديد نسبة الكيميائية هذه الزيوت الأساسية بواسطة الكروماتوغرافية الغازية المتجانسة مع منظار طيفي كتلي. المركبات السائدة التي تم الكشف عنها في الزيت الأساسي لـ *J. phoenicea* هي : α -pinène (34,51%)، β -phellandrene (22,37%) و acétate d' α -terpényle (14,68%). الزيت الأساسي لـ *J. oxycedrus* يتميز بزيادة α -pinène (39,32%)، متبوع بـ D-germacrène (8,88%)، بالنسبة لاصنف *C. sempervirens*، α -pinène (60,51%) هو المركب السائد، متبوع بـ cedrol (8,32%).
درج استخلاص المركبات الفينولية بالمصلول على نفس المرودود للصفين : *J. phoenicea* و *C. sempervirens* (24,2%)، فيما يخص الصنف *J. oxycedrus*، فإنه يمثل مرودود لوب بالنسبة للصفين السابقين (25,4%).

وبناءً على تجربة المستخلصات الميثانولي المنقول على نفس المرودود لحزب AcOEt (4%) بالنسبة للصفين : *J. phoenicea* و *C. sempervirens*، بالعكس *J. oxycedrus* يمثل مرودود ضعيف (2,66%)، فيما يخص جزء n-BuOH، *J. oxycedrus* يمثل المرودود الأعلى (14%) مقارنة بالنباتات الأخرى (7%) لـ *C. sempervirens* و (4,5%) لـ *J. phoenicea*، الصنفين المذكورين.

درج دراسة القدرة المضادة للسرطان للزيوت الأساسية هذه النباتات بأن الزيوت الأساسية لـ *J. phoenicea* و *J. oxycedrus* نشطة فقط على السلالة البكتيرية *Enterococcus faecalis*، السلالة الفطرية *Penicillium* ssp. أصبحت أضعف لأنها حساسة نحو الزيت الأساسي لـ *J. oxycedrus* مقارنة بالزيوت الأساسية للنباتين الأخرى.
تمت لنا دراسة القدرة المضادة للاكسدة لأجزاء AcOEt و n-BuOH للفلونويدات هذه النباتات من استخلاصها بأن كل هذه الأجزاء (باعتداء جزء AcOEt لـ *J. oxycedrus*) تملك نشاط ضعيف ضد الأكسدة مقارنة بـ حمض الأسكوربيك.

كلمات مفاتيحية :

Juniperus phoenicea L., *Juniperus oxycedrus* L., *Cupressus sempervirens* L., الزيوت الأساسية، الفلونويدات، الكروماتوغرافية الغازية المتجانسة مع منظار طيفي كتلي، الكروماتوغرافية على الطبقة الرقيقة، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للاكسدة.