

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante et
antibactérienne des extraits des épines de
*Cedrus atlantica manetti***

Présenté par :

Kacher Asma & Kedjar Hanane

Soutenu le : **23 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^{me} Bougoffa-Sadaoui. K

MCB

Présidente

M^r Belkacem. N

MAA

Encadreur

M^r Hamoum. M

MAB

Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Au dessus de tout nous remercions le bon Dieu tout puissant de nous avoir incarné le courage et la foi afin de réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier notre promoteur Mr BELKACEM pour avoir accepté de nous encadrer ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils et ses orientations.

Nous tenons à remercier vivement :

Mme SADAOUI-BOUGOFFA de présider ce présent jury.

Mr HAMOUM pour avoir accepté d'examiner notre travail.

On remercie tout particulièrement Mr HARFI de l'aide qu'il nous a apporté, sans oublier l'ingénieure de laboratoire Melle TABTI pour son aide.

Nous remercions également l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.

Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux vont, également, à toutes les personnes qui ont cru en nous et qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, le tous puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour,

A ceux qui m'ont encouragé dans mes moments les plus difficiles,

A ceux qui m'ont fait confiance

« Mes très chers parents »

Sans eux je ne suis pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, de leurs précieux conseils, leurs amours, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont fait.

A mon cher frère et mes adorables sœurs.

A ceux que je porte dans mon cœur.

A ma chère ingénieure du laboratoire BPC

A ma binôme et sa famille.

A mes copines

Ainsi à tous qui m'ont aidé de près ou de loin.

Hanane

Dédicace

*Au terme de toutes ces années d'études je dédie ce modeste travail en
signe et de remerciement.*

*A ceux qui ont donné un sens pour mon existence, qui mon soutenu
jours et nuits durant tout mon parcours.*

A vous mes chères et adorables parents.

A qui j'ai partagé avec eux tous les moments de ma vie.

A ma chère grand-mère et mon frère Lyes, ma sœur Kaouthar.

*A mes chères copines : Masillia, Imane, Baya, Noria, Khalissa, Teldja et
Katia.*

A l'ingénieure du laboratoire BPC Naima

*A ma binôme Hanane pour sa patience, de m'avoir partagé les moments
de ce travail et à toute sa famille.*

*A Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire de près ou
de loin.*

A tout la promotion pharmacotoxicologie 2018.

Asma

Liste des abréviations

ABTS : Acide 2, 2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique.

A-brut : acétone brut.

Abs : Absorbance.

Aceth : fraction acétate d'éthyle.

ADN : acide désoxyribonucléique.

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium.

Aq : fraction aqueuse.

ATB : antibiotique.

ATCC: American Type Culture Collection.

BaCl₂ : chlorure de baryum.

BHA: Butylated hydroxyanisole.

Chl : fraction chloroforme.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

DMSO: Dimethyl sulfoxyde.

EAA : Equivalent en Acide ascorbique.

EAG : Equivalent en Acide gallique.

E-brut: éthanol brut.

EC : Equivalent Catéchine.

EQ : Equivalent Quercétine.

ERN : Espèces Réactives de l'Azote.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

Fe²⁺ : Ion ferreux.

Fe³⁺: Ion ferrique.

FeSO₄ : sulfate de fer.

FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power.

GPx : glutathion peroxydase.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Hex : fraction hexane.

HCl : chlorure d'hydrogène.

HNO₂: Nitrous acid.

HO•: Radical hydroxyl.

HO₂•: Hydroperoxyl.

HOCl: Hypochlorous acid.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50% d'une activité.

K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium.

M-brut: méthanol brut.

MHB : Muller Hinton Broth.

Na : sodium.

NaCl : chlorure de sodium.

Na₂CO₃: Carbonate de sodium.

n-But: fraction n-butanol.

NO• : Nitric Oxide

N₂O₄: Dinitrogen tetroxide

NO•: Nitroxyl anion

NO⁺: Nitrosyl cation

NO₂Cl: Nitryl chloride

NO₂⁺: Nitronium anion

NO₂•: Nitrogen dioxide

O₃: Ozone

O₂^{-•} : Anion superoxide

¹O₂ : Oxygène singulet

PH : potentiel d'hydrogène.

R%: pourcentage de rendement.

RNS : Reactive Nitrogen Species.

ROS: Reactive Oxygen Species.

ROOH: Hydroperoxyde

ROONO: Alkyl peroxyntrites

RO•: Alkoxy

ROO•: Radical peroxy

R² : coefficient de corrélation.

SOD : Super Oxyde Dismutase.

TROLOX: 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid.

TPTZ : 2, 4, 6-tris 2-pyridyl-1, 3, 5-s-triazine.

Liste des tableaux

<i>N° tableau</i>	<i>Titre de tableau</i>	<i>Page</i>
I	Les différents radicaux libres et leurs dérivés.	07
II	Les caractères biologiques des différentes souches utilisées.	11
III	La liste des appareils, produits chimiques et milieu de cultures utilisés.	13
IV	Rendement et caractéristiques de l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux.	26
V	Rendement et caractéristiques de l'extrait méthanolique brut et ses fractions, acétonique et éthanolique.	28
VI	Concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque échantillon ($\mu\text{g/ml}$) pour chaque souche bactérienne.	43
VII	Concentration minimale bactéricide (CMB) de chaque échantillon ($\mu\text{g/ml}$) pour chaque souche bactérienne.	45

Liste des figures

<i>N° Figure</i>	<i>Titre de figure</i>	<i>Page</i>
01	Photographie de cèdre de l'atlas.	03
02	Répartition actuelle du cèdre de l'Atlas en Algérie.	04
03	Parties botaniques de <i>Cedrus atlantica manetti</i> .	05
04	Facteurs intervenants dans le stress oxydatif.	08
05	(1) épine de cèdre fraîches, (2) épines de cèdre séchées, (3) broyage, (4) broyas (5) tamisage, (6) poudres fines des épines de <i>Cedrus atlantica manetti</i> .	12
06	Protocole expérimental de macération.	14
07	Photographie originale de soxhlet.	15
08	Protocole de fractionnement par extraction liquide-liquide.	16
09	Protocole de dosage des polyphénols.	17
10	Protocole de dosage des flavonoïdes.	18
11	Protocole de dosage des tannins condensés.	19
12	Protocole d'étude de l'activité « scavenging » du DPPH [•] .	20
13	Protocole d'étude de l'activité « scavenging » de l'ABTS ^{•+} .	21
14	Protocole de FRAP.	22
15	Schéma d'utilisation d'une microplaque.	25

16	Teneur en polyphénols de l'extrait A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions.	30
17	Teneur en flavonoïdes de l'extrait A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions.	32
18	Teneur en tanins condensés de l'extrait A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions.	33
19	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par les standards, la Vit C et la BHA.	34
20	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par les extraits A-brut, E-brut et M-brut.	35
21	Pourcentage d'inhibition de radical DPPH• par les différentes fractions.	36
22	Valeurs des IC ₅₀ de Vit C, BHA et les extraits A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions.	36
23	Courbe de pourcentage d'inhibition du radical ABTS ^{•+} .	38
24	Pourcentage d'inhibition de radical ABTS ^{•+} des l'extraits A-brut, E-brut et M-brut.	38
25	Pourcentage d'inhibition de radical ABTS ^{•+} des fractions.	39
26	Valeur des IC ₅₀ des échantillons, Vit C et BHA.	39
27	Le pouvoir réducteur des différents extraits et fractions comparativement au vit C.	41
28	Le pouvoir réducteur des différents extraits et fractions comparativement au sulfate de fer.	41

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur *Cedrus atlantica manetti*.....3

I.1.1.Systématique du Cèdre de l'Atlas3

I.1.2. Historique et aire de répartition.....3

I.1.3.Caractères botaniques.....4

I.1.4.Phytochimie de l'espèce *Cedrus atlantica*.....5

I.1.5.Propriétés thérapeutiques.....5

I.1.6. Les métabolites secondaires.....5

I.1.6.1. Les Composés phénoliques6

I.2.Activité antioxydante et stress oxydative.....6

I.2.1.Les antioxydants.....8

I.2.2.Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes.....9

I.2.2.1.Test de DPPH[•]9

I.2.2.2.Test d'ABTS^{•+}9

I.2.2.3.Test de FRAP9

I.3.Activité antimicrobienne.....9

I.3.1.Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne10

I.3.1.1.Méthode des disques.....10

I.3.1.2.Méthodes des puits10

I.3.1.3 Méthode de dilution en milieu liquide11

I.3.4.Description des bactéries étudiées.....11

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel.....12

II.1.1.Matériel végétal.....12

II.1.2.Matériel biologique.....13

II.1.3. Appareils et produits chimiques.....	13
II.2.Méthodes.....	14
II.2.1.Extraction.....	14
II.2.1.1.Extraction par macération	14
II.2.1.2.Extraction par soxhlet.....	15
II.2.2.Fractionnement.....	15
II.2.3. Analyses phytochimiques.....	16
II.2.4.1. Dosage des polyphénols.....	17
II.2.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	18
II.2.4.3. Dosage des tanins condensés.....	18
II.2.4. Détermination de potentiel antioxydant.....	19
II.2.4.1. Méthode de réduction des radicaux libres DPPH•.....	19
II.2.4.2. Méthode de réduction de radicaux-cation ABTS• ⁺	20
II.2.4.3. Méthode de réduction du fer FRAP.....	22
II.2.5.Activité antibactérienne.....	23
II.2.5.1 Préparation de milieu de culture.....	23
II.2.5.2.Isolement des souches.....	23
II.2.5.3.Préparation de l'étalon 0.5Mc Farland.....	24
II.2.5.4.Préparation des suspensions bactériennes.....	24
II.2.5.5.Préparation des solutions mères.....	24
II.2.5.7 Mise en test.....	24
II.3.Analyse statistique.....	25

Chapitre III : résultats et discussion

III.1. Rendement d'extraction.....	26
III.1.1.Rendement d'extraction par macération.....	26
III.1.2.Rendement d'extraction par soxhlet.....	27
III.2. Etudes phytochimiques.....	29
III.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	29
III.2.2. Teneur en flavonoïdes	31
III.2.3. Teneur en tanins condensés	33
III.3. Evaluation de activité antioxydante.....	34
III.3.1. Activité scavenger du radical DPPH•.....	34

III.3.2. Activité scavenger du radical ABTs ⁺	37
III.3.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	40
III.4. Activité antimicrobienne.....	42
III.4.1.résultats des CMI.....	42
III.4.1.résultats des CMB.....	44

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Introduction

Introduction

L'histoire des plantes médicinales est très ancienne. Depuis l'antiquité, elles ont toujours fait partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines (**Bettaieb, 2017**). Un accroissement de leurs utilisations a été constaté dans le monde entier pour le maintien et l'amélioration de la santé et pour le traitement de diverses maladies (**Olabinri et al., 2009**). Elles constituent une source importante de molécules bioactives qui font généralement partie des métabolites secondaires (**Haddouchi et al., 2016**) : les polyphénols, les alcaloïdes et les huiles essentielles...etc.

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica manetti*) qui est une essence endémique des montagnes de l'Afrique du Nord (**M'hirit, 1999**). Le peu d'études réalisées sur les extraits de *Cedrus atlantica manetti* telle que l'étude de **Murgan et Parimelazhagan, (2014)** ont montré que les flavonoïdes extraits des graines de *Cedrus atlantica manetti* possèdent une activité puissante à piéger les radicaux libres DPPH[•]. D'après notre recherche bibliographique minutieuse, aucune étude n'a été publiée sur les polyphénols des épines de *Cedrus atlantica manetti*.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont les objectifs principaux :

- L'extraction par macération et Soxhlet de la poudre des épines de *Cedrus atlantica manetti*.
- L'analyse phytochimique des extraits acétonique, éthanolique et méthanolique et ses fractions.
- L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits acétonique, éthanolique et méthanolique et ses fractions.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique et ses fractions.

Pour atteindre ces objectifs, notre travail a été effectué dans le laboratoire biologie physico-chimique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira Bejaia (Targa Ouzemour).

Le travail présenté dans le cadre de ce mémoire, est subdivisé en deux parties dont :

- Une première partie consacrée à une synthèse bibliographique, constituée de trois chapitres, l'un sur la présentation de la plante étudiée, l'autre sur l'activité antioxydante et la dernière sur l'activité antibactérienne.

- Une seconde partie concerne la partie expérimentale, qui comporte deux chapitres, l'un sur le matériel et les différentes méthodes utilisées ; le deuxième chapitre regroupe l'ensemble des résultats qui seront suivis d'une discussion.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur *Cedrus atlantica manetti*

Le genre *Cedrus*, nom d'origine grec « kedros » (**Derridj, 1991**), Arz el Atlas en arabe ou Bignoun ou Idil en berbère, est une essence caractéristique des montagnes de l'Afrique du nord et plus précisément du Maroc et l'Algérie (**Boudy, 1950**).

I.1.1. Systématique du Cèdre de l'Atlas

Le Cèdre de l'Atlas (Figure 01) répond à la systématique suivante :

Règne: Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Gymnospermes

Classe : Vectrice

Ordre : Coniférales

Famille : Pinacées

Sous – famille : Abiétés

Genre : *Cedrus*

Espèce: *Cedrus atlantica manetti*



(**Quezel et Santa, 1962**).

Figure 01 : Photographie originale de cèdre de l'Atlas.

I.1.2. Historique et aire de répartition

La présence de *Cedrus atlantica* en Afrique du nord est très ancienne. Il y est établi depuis le Pléistocène moyen, voire inférieur. Cependant sa répartition ne fut pas toujours celle que nous connaissons actuellement. Aux pays du Maghreb il a été identifié par le pollen dans le Hoggar, au sud et au nord-ouest de la Tunisie, dans le Rif, le Moyen Atlas et le Haut Atlas oriental (Maroc), montrant ainsi la vaste distribution des lointains ancêtres des cèdres (**Nadjahi, 1988**).

Le cèdre de l'Atlas est une essence forestière endémique des montagnes de l'Afrique du nord et dont l'aire naturelle se situe au Maroc et en Algérie. Il joue un rôle considérable

dans le haut massif de berbère. En Algérie, les cédraies algériennes (Figure 02) occupent une superficie de 30 400 ha et sont réparties sur deux blocs (**Boudy, 1950**) :

- ✓ Au niveau de l'Atlas Tellien
 - Les cédraies de Djurdjura (Tala Guilef, Tikjda et Ait Ouabaine) avec 2000ha ;
 - La cédraie des Babors, avec 500 ha ;
 - La cédraie de Chrea avec 1000 ha ;
 - La cédraie de Theniet-El-Had avec 1000 ha.
- ✓ Au niveau de l'Atlas saharien

Le cèdre est en régression drastique dans les Monts de Hodna (8000 ha), à Belezma avec (5000 ha) et dans les Aurès (5000 ha).



Figure 02 : Répartition actuelle du cèdre de l'Atlas en Algérie (**Bentouati, 2006**).

I.1.3. Caractères botaniques

- **Le port** : c'est un arbre de haute taille, dépassant souvent 50m, et en moyenne 40m. Le port de l'arbre est pyramidal (**Boudy, 1950 ; Toth, 1980**).
- **Racines** : le système racinaire est développé, mais rarement pivotant (**Boudy, 1950**).
- **Ecorce** : quand il est jeune l'écorce est lisse et brune, avec l'âge les écailles deviennent grises foncés, crevasses et sinueuses (**Toth, 1980**).
- **Feuilles** : aiguilles persistantes 3-4 ans, aiguës, assez rigides, 15 à 20mm, leur couleur allant du vert clair foncé jusqu'au bleu (**Boudy, 1950 ; Toth, 1980**).
- **Fruit** : la maturité des cônes dure 2ans après la floraison, de couleur brune violacée, ils ont 5-8 cm de dimension. Atteignent au plus 10cm (**Riou-nivert, 2007; Toth, 1980**).

- **Graine** : grosse, triangulaire, 10-15 mm, marron roux se termine par une large aile, très résineuse (**Toth, 1980**).



Figure 03 : Parties botaniques de *Cedrus atlantica manetti*.

I.1.4. Phytochimie de l'espèce *Cedrus atlantica*

Plusieurs études ont montré que l'espèce *Cedrus atlantica* renferme les composés suivants : simples cétones, terpenoïdes, les stéroïdes, plus précisément le sitostérol a été identifié dans les oléorésines des cônes de *Cedrus atlantica* ainsi les caroténoïdes tels que: α -carotène, adonixanthin...etc. Les aiguilles et les rameaux sont riches en vitamine C et en flavonoïdes. Les bourgeons sont riches en pinène. L'essence est riche en phénol (**Rhafouri et al., 2014**).

I.1.5. Propriétés thérapeutiques

L'huile essentielle de *Cedrus atlantica* possède des propriétés anti-inflammatoires et antiseptiques, cicatrisantes, antifongiques, il est également utilisé en parfumerie et cosmétologie (**Rhafouri et al., 2014**) et antimicrobiens, la cellulose et ses dérivées extraite de l'écorce est utilisée dans le traitement des bronchites, de la toux et des indigestions (**Rached, 2009**).

I.1.6. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes. Ils sont répartis en trois grandes familles chimiques : les composés phénoliques, les terpenoïdes et les alcaloïdes (**Boudjouref, 2011**). Notre intérêt dans cette étude est essentiellement focalisé sur les composés phénoliques.

I.1.6.1. Les composés phénoliques

Appelés également les polyphénols, sont des molécules spécifiques du règne végétal, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc (**Bruneton, 2009**). Les principales classes de ces derniers sont: les acides phénoliques, les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols et les tanins (**Tapiero et al., 2002**).

➤ Les acides phénoliques

Ils sont la forme la plus simple des composés phénoliques. Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (**Bruneton, 2009**).

➤ Les flavonoïdes

Ils sont le plus grand groupe de composés phénoliques contenant deux cycles aromatiques liés par un pont de trois atomes de carbone (C6-C3-C6). Il existe plusieurs classes de flavonoïdes dont les principales sont les flavones, flavanols, les flavane-3-ols et les anthocyanidines (**Basli et al., 2017**).

➤ Les tanins

Ils sont solubles dans l'eau, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da. En outre, ils ont certaines propriétés spéciales telles que l'aptitude à précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Reed, 1995 ; Sereme et al., 2010**). Les tanins sont classés en deux catégories : les tanins hydrolysables ou gallotanins, et les tanins condensés ou catéchines (**Bruneton, 2009**).

I.2. Activité antioxydante et stress oxydative

Le stress oxydant est devenu un réel problème de santé, très fréquent dans notre vie moderne. Ce dernier est à l'origine de plusieurs maladies humaines (**zhang et al., 2015**).

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (**Jacques et André, 2004**). Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche

en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

Les oxydants regroupent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN) (Tableau I).

Tableau I : Les différents radicaux libres et leurs dérivés (Halliwell et Whiteman, 2004).

RNS		ROS	
Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires	Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
NO^\bullet NO_2^\bullet	ONOO^- ROONO N_2O_3 N_2O_4 HNO_2 NO_2^+ NO^- NO^+ NO_2Cl	$\text{O}_2^{\bullet-}$ HO^\bullet ROO^\bullet RO^\bullet HO_2^\bullet	H_2O_2 ROOH $^1\text{O}_2$ O_3 HOCl

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à une situation de stress chronique comme c'est le cas dans de nombreuses pathologies (Pencemail *et al.*, 2009).



Figure 04: Facteurs intervenant dans le stress oxydatif (Koechlin.Ramonatxo, 2006).

I.2.1. Les antioxydants

Pour contourner les dommages causés par les espèces oxydatives, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (**Durand et al., 2013**). Ainsi que, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (**Tang et Halliwell, 2010**).

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défense très efficaces contre la surproduction des ERO. Ces systèmes peuvent être exogènes ou endogènes.

➤ Les antioxydants endogènes

La production physiologique des ERO est contrôlée au sein des cellules par deux types de mécanismes de protection; les systèmes de défenses enzymatiques et non enzymatiques (**Salim, 2016**). L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (**Mika et al., 2004**).

➤ Les antioxydants exogènes

De nombreuses molécules issues de notre alimentation sont dotées d'un pouvoir antioxydant, parmi-elles: les vitamines (la vitamine C et la vitamine E), certains métabolites secondaires végétaux (les caroténoïdes, les polyphénols et les alcaloïdes) (**Lehucher et al., 2001**).

I.2.2. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP, ABTS^{•+} et DPPH[•]....etc (**Georgieva et al., 2010**).

I.2.2.1. Test de DPPH[•]

Le DPPH[•] (2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle) possède un électron célibataire sur un atome d'azote, est un radical libre stable qui est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule.

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH[•] de couleur violette se réduit en DPPH-H de couleur jaune pâle. Cette décoloration représente donc la capacité de l'échantillon

de piéger ce radical, et qui peut être suivi par spectrophotométrie à 517nm (**Annie et al., 2006 ; Molyneux, 2004**).

I.2.2.2. Test d'ABTS^{•+}

La méthode de radical ABTS^{•+} (Acide 2, 2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est l'un des tests les plus utilisés ainsi il est caractérisé par un spectre UV avec des maximums d'absorbance 734 nm, il est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleue verte en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant (**Re et al., 1999**).

I.2.2.3. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La réduction de fer est une méthode facile et reproductible, étudiée pour déterminer la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) du complexe ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe²⁺). Cette réduction se traduit par une coloration bleue mesurée à 593 nm (**Thaipong et al., 2006**).

I.3. Activité antibactérienne

Dès la naissance, l'Homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu (**Kaufmann, 1997**).

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires) (**Fekih, 2014**).

Un antibiotique est une substance antibactérienne produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique capable d'inhiber la multiplication ou détruire les micro organismes (**Aouni et al., 2013**).

Les agents antimicrobiens détruisent les bactéries en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique et ADN) et/ou en perturbant leurs métabolismes et par conséquent leurs fonctions (**Tortora et al., 2003**). Depuis leur apparition, les antibiotiques sont restés le moyen privilégié de lutte contre les infections bactériennes (**Toty et al., 2013**).

I.3.1. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide (Inouye, 2003).

I.3.1.1. La méthode des disques

Appelée également la méthode par diffusion en milieu gélosé ou antibiogramme. Actuellement, cette méthode est la plus connue et la plus utilisée, qui consiste à déterminer la sensibilité et la résistance aux antibiotiques d'une bactérie isolée dans un prélèvement (Fontanay *et al.*, 2015).

I.3.1.2. Méthodes des puits ou cylindre ou diffusion en milieu solide

Cette méthode consiste à créer un trou circulaire vertical dans la gélose de Mueller-Hinton coulée dans des boîtes de Pétri après avoirensemencées par une suspension bactérienne, suivit d'une incubation à 37°C pendant 18 à 24 h (Biyiti *et al.*, 2004).

I.3.1.3. Méthode de dilution en milieu liquide

La méthode en milieu liquide peut se faire en microplaque à 96 puits fond en « U », appelée « microméthode en milieu liquide ». La gamme de concentrations est réalisée par dilution sériée dans l'eau et/ou le dispersant. Après cette dilution, l'inoculum bactérien est ajouté dans les puits correspondants. Les microplaques ainsi préparées sont incubées 24h à 35°C. La croissance bactérienne, si elle a lieu, se traduit par l'apparition d'un trouble dans le puits (Fontanay *et al.*, 2015).

I.3.4. Description des bactéries étudiées

Les souches utilisées et les caractéristiques de chacune sont présentées dans le Tableau II.

Tableau II : Les caractères biologiques des différentes souches utilisées.

Bactéries	Caractéristiques
<i>Escherichia coli</i>	C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif des mammifères, non sporulée, généralement mobile, elle représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës (Laure et Guillou, 2016).
<i>Staphylococcus aureus</i>	C'est une bactérie à Gram positif de forme non sporulée, qui tend à se grouper en paires, non capsulée, représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, intoxication alimentaire (Velomalala et al., 2013).
<i>Bacillus subtilis</i>	C'est une bactérie à Gram positif, aérobic, de forme bâtonnets, présente dans les sols, mobile par des flagelles peritriches (Velomalala et al., 2013).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Cette étude s'est intéressée aux épinettes d'une espèce de la famille des Pinacées qui est *Cedrus atlantica manetti*.

Les épinettes de *Cedrus atlantica manetti* ont été récoltées dans la région d'ADEKAR "LAC NOIR" ou AGUELMIME ABERKANE en berbère dans la wilaya de Bejaia, pendant le mois de Mai 2017. Elles ont été nettoyées et lavées avec l'eau courante afin de se débarrasser de toute poussière et matières étrangères et autres impuretés ensuite égouttées, puis mise à sécher à l'ombre et à l'air ambiant pendant 15 jours.

Après le séchage, elles sont ensuite broyées à l'aide d'un moulin à café. La poudre obtenue est soumise au tamisage à l'aide d'un tamiseur automatique (Retsch, Germany) dont le diamètre des pores est de 125 µm pour avoir une poudre homogène prête à l'extraction, puis conservée dans des flacons en verre à l'abri de la lumière pour éviter la photo-oxydation des substances actives présentes dans la poudre jusqu'à l'utilisation (Figure 05).

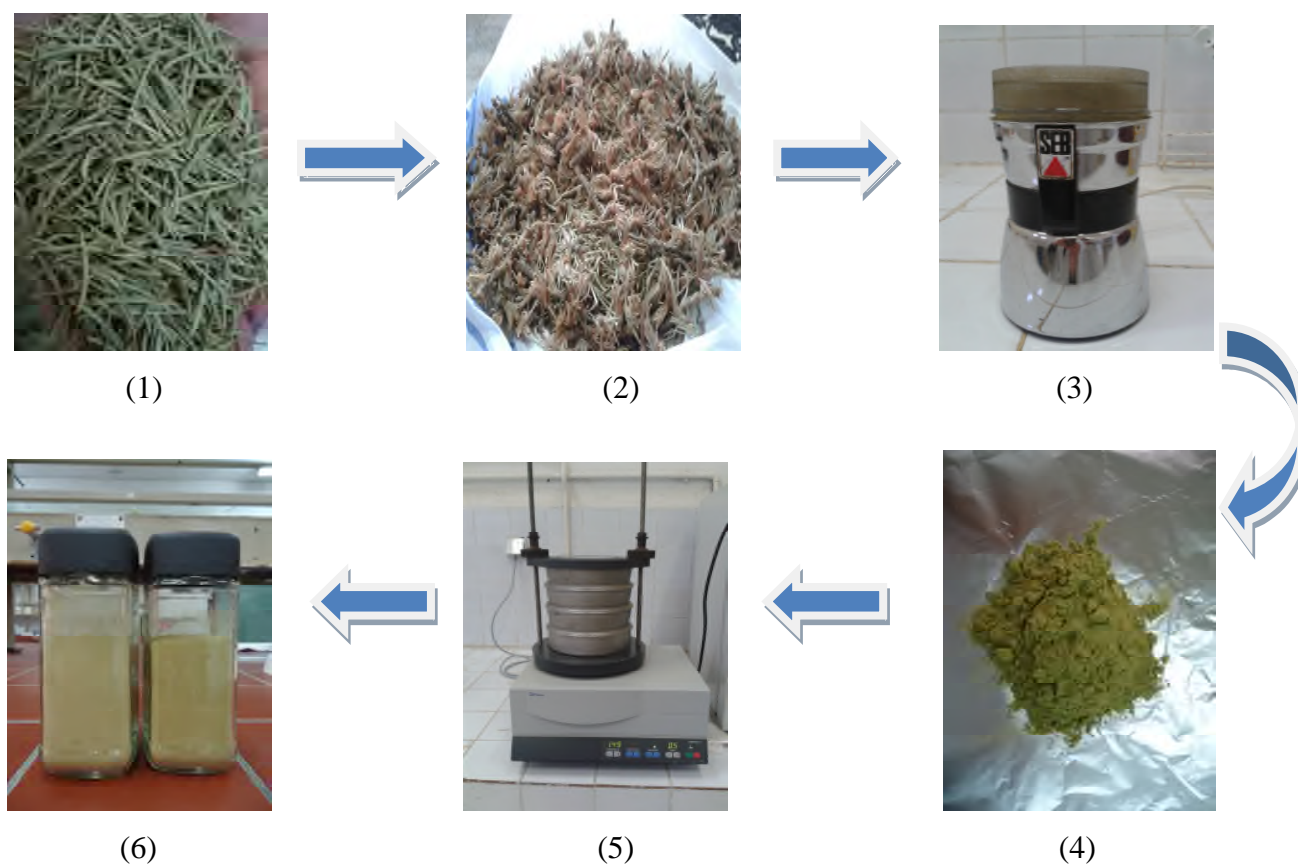


Figure 05: (1) épinettes de cèdre fraîches, (2) épinettes de cèdre séchées, (3) broyage, (4) broyat (5) tamisage, (6) poudres fines des épinettes de *Cedrus atlantica manetti*.

II.1.2. Matériel biologique

Les souches bactériennes qui ont été testées pour déceler l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des épines de *Cedrus atlantica manetti* et ses fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) sont des souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC): il s'agit d'une bactéries à Gram⁻ : *Escherichia coli* ATCC et deux bactérie à Gram⁺ : *Bacillus subtilis* ATCC et *Staphylococcus aureus* ATCC, gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie puis conservées à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

I.1.3. Appareils et produits chimiques

Tableau III: La liste des appareils, produits chimiques et milieux de cultures utilisés.

Appareillages	Produits chimiques et réactifs	Milieux de culture
<ul style="list-style-type: none"> • Balance analytique ; • Moulin à café ; • Tamis électrique ; • Etuve ; • Agitateur magnétique ; • Autoclave ; • Bec benzène ; • Soxhlet ; • Ph mètre ; • Spectrophotomètre ; • Centrifugeuse ; • Rotavapor ; • Bain marie ; • Thermomètre ; • Vortex. 	<ul style="list-style-type: none"> • Acétone • Ethanol • Méthanol ; • Hexane • Chloroforme ; • Acétate d'éthyle • n-Butanol ; • DMSO • HCL • Acide acétique ; glaciale • Folin-Ciocalteu ; • Acide gallique ; • Catéchine • Quercétine ; • Trolox • Vit C • BHA • DPPH ; • ABTS • TPTZ • Vanilline ; • Chlorure de fer • Acétate de sodium • Carbonate de sodium ; • Chlorure d'aluminium; • Acide sulfurique ; • Chlorure de baryum ; • Persulfate de potassium ; • Eau physiologique ; • Eau distillée. 	<ul style="list-style-type: none"> • Gélose Muller Hinton ; • Bouillon Muller Hinton ; • Antibiotique injectable GENTAXYN.

II.2.Méthodes

II.2.1.Extraction

II.2.1.1.Extraction par macération

Une extraction solide-liquide a été réalisée en utilisant les solvants suivants : eau distillée et éthanol (25%, 50%, 70% et 96%). Le protocole d'extraction est résumé dans la Figure 06.

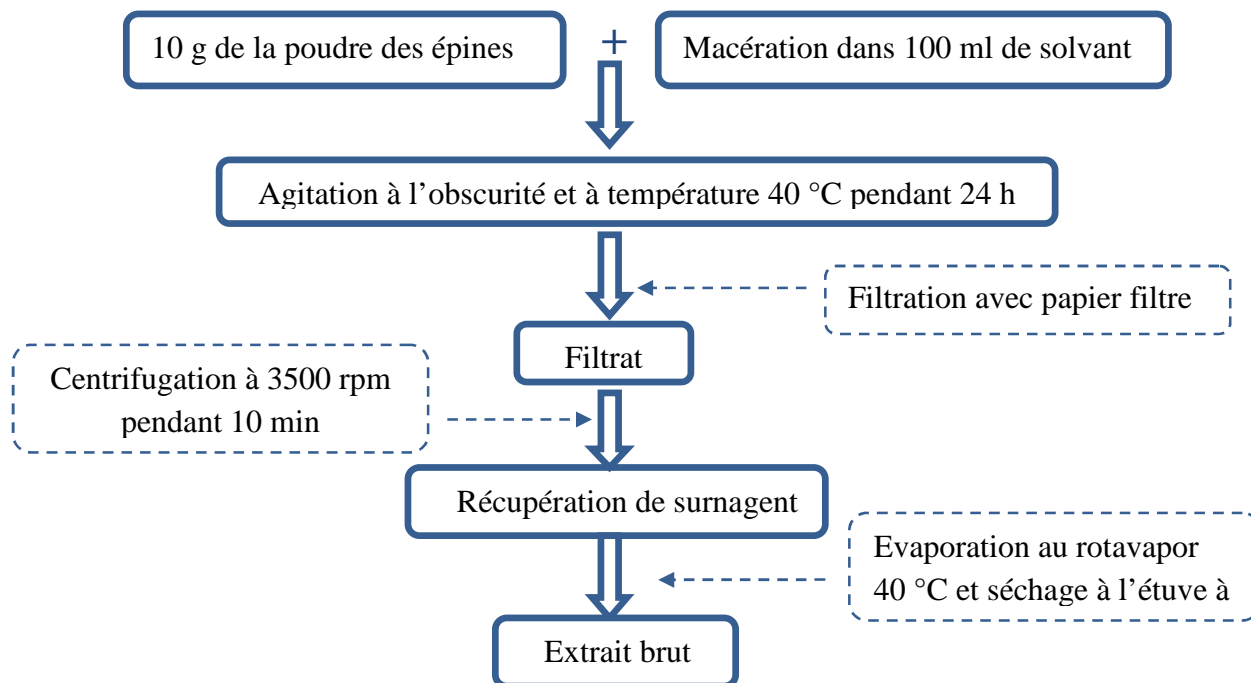


Figure 06 : Protocole expérimental de macération.

Ce protocole est répété trois fois jusqu'à épuisement de la poudre. Les extraits bruts obtenus sont pesés en vue d'évaluer leur rendement. Ce dernier est calculé selon la formule suivante :

$$R\% = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

Sachant que :

R% : Rendement d'extraction en pourcentage ;

P₀ : Poids de bécher vide en gramme ;

P₁ : Poids de bécher après évaporation en gramme ;

E : Poids de l'échantillon en gramme.

II.2.1.2.Extraction par soxhlet

Une extraction solide-liquide a été opérée par Soxhlet (Reihenheizgerät 4, Allemagne) afin d'extraire les polyphénols des épines de *Cedrus atlantica manetti*.

Une quantité de 26 g de poudre végétale a été introduite dans une cartouche de cellulose et soumise à une extraction en utilisant 200 ml de différents solvants (méthanol, éthanol et acétone) à une température de 60 °C, jusqu'à épuisement de la poudre (solvant clair). L'extrait est récupéré par évaporation du solvant à l'aide d'un rotavapor, puis placé dans l'étuve à 40°C pendant 48 heures pour compléter le séchage et éliminer toutes traces de solvant. L'extrait brut obtenu est conservé dans des tubes recouverts par du papier aluminium à 4 °C jusqu'à l'utilisation. Le rendement en extrait brut sec a été calculé par la formule suivante :

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

Sachant que :

R%: Rendement exprimé en pourcentage ;

M : Masse en gramme de l'extrait sec obtenu ;

M₀ : Masse en gramme de l'échantillon de poudre utilisée.

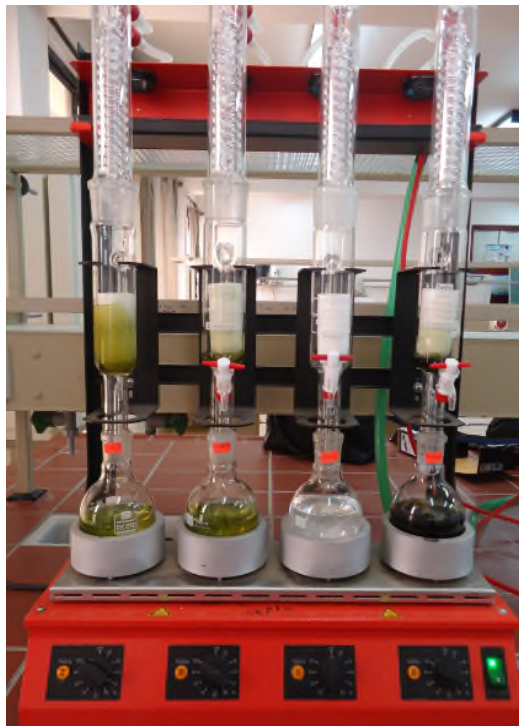


Figure 07: Photographie originale de soxhlet.

II.2.2.Fractionnement

L'extrait méthanolique brut et sec obtenu est soumis à une deuxième extraction de type liquide /liquide qui s'effectue selon la méthode de **Rached, (2008)** afin de pouvoir séparer les fractions de polyphénols avec une succession de solvants organiques par ordre de polarité croissante: délipidation par l'hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. Une masse de 2 grammes de l'extrait méthanolique sont repris dans 150 ml de méthanol 5% suivi d'une agitation vigoureuse. Toutes les étapes d'extraction sont résumées dans la Figure 08.

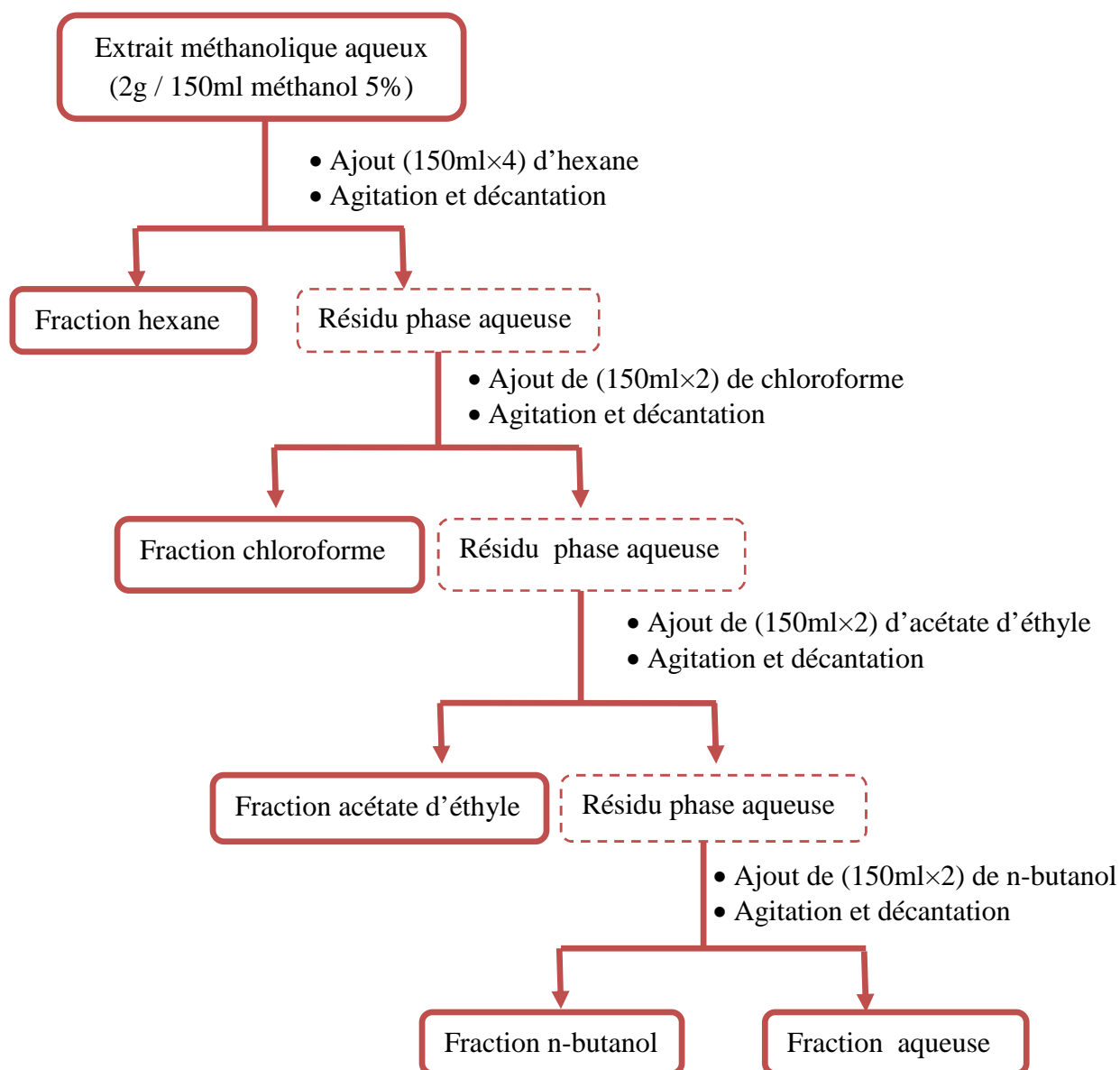


Figure 08: Protocole de fractionnement par extraction liquide-liquide (Rached, 2008).

Les fractions obtenues sont filtrées et séchées à l'aide d'un évaporateur rotatif puis ont été mises dans l'étuve à 40°C pendant 48h.

II.2.3. Analyses phytochimiques

Des analyses phytochimiques des principaux groupes de métabolites secondaires ont été effectuées sur les extraits : acétonique, éthanolique et méthanolique, ainsi sur les différentes fractions de l'extrait méthanolique : chloroforme (Chl), acétate d'éthyle (Aceth), n-Butanol (n-But) et l'aqueuse (Aq).

II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols des épinettes de *Cedrus atlantica manetti* a été déterminée par la méthode du réactif de Folin-ciocalteu décrite par **Wong, (2006)**.

- **Mode opératoire**

La concentration testée pour les extraits : acétonique, éthanolique et méthanolique est la 1000 µg/ml et une concentration de 500µg/ml pour les fractions Chl, Aceth, n-But et Aq. Le protocole expérimental est résumé dans la Figure 09.

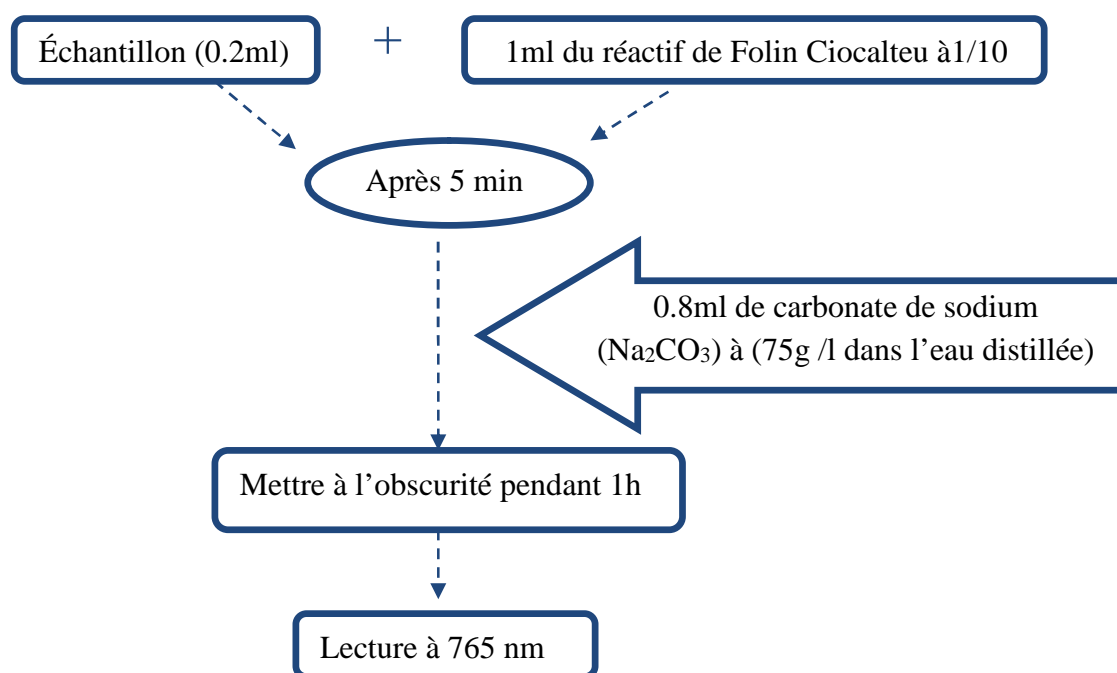


Figure 09 : Protocole de dosage des polyphénols (**Wong, 2006**).

- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.
- Le blanc : est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par 0.2ml de méthanol + 1ml de Folin-Ciocalteu + 0.8ml de carbonate de sodium.
- L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu, le taux de polyphénols totaux sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g) à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (25-100µg /ml), utilisé comme standard dans les mêmes conditions.

II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes des épines de *Cedrus atlantica manetti* a été effectuée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) selon **Djeridane et al., (2006)**.

- **Mode opératoire**

Une concentration de $1000\mu\text{g/ml}$ a été testée pour les trois extraits, la concentration de $500\mu\text{g/ml}$ pour les différentes fractions méthanoliques (Chl, Aceth et n-But) et $5000\mu\text{g/ml}$ pour la fraction Aq. Le protocole expérimental est résumé dans la Figure 10.

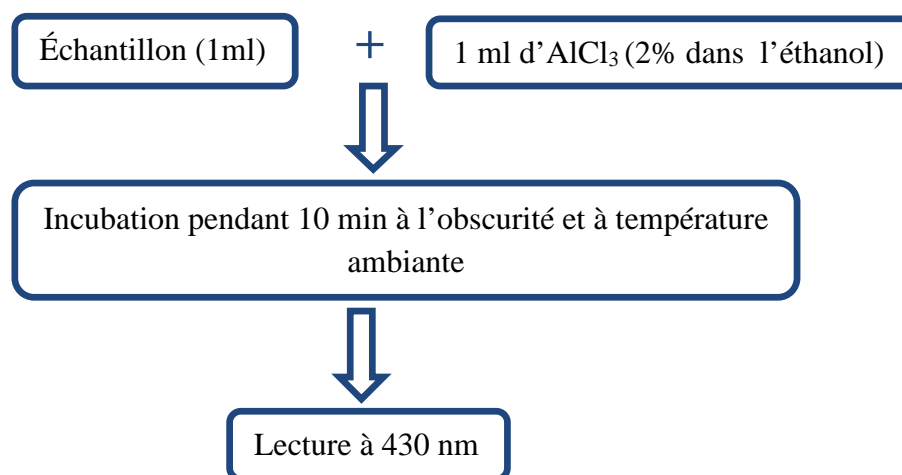


Figure 10 : Protocole de dosage des flavonoïdes (**Djeridane et al., 2006**).

- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.
- Le blanc : est préparé dans les mêmes conditions que l'échantillon (1ml méthanol + 1ml AlCl_3).
- La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire obtenue avec différentes concentrations ($1,625\text{-}30\mu\text{g/ml}$) de la Quercétine utilisée comme standard. La teneur en flavonoïde est exprimée en milligramme d'équivalent de la Quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g).

II.2.3.3. Dosage des tanins condensés

La quantification des tannins condensés de *Cedrus atlantica manetti* sont estimées en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide décrite par **Ba et al., (2010)**.

- **Mode opératoire**

Une concentration de $1000\mu\text{g/ml}$ a été testée pour les trois extraits ainsi que pour les fractions (Chl, Aceth, n-But et Aq). Le protocole expérimental est résumé dans la Figure 11.

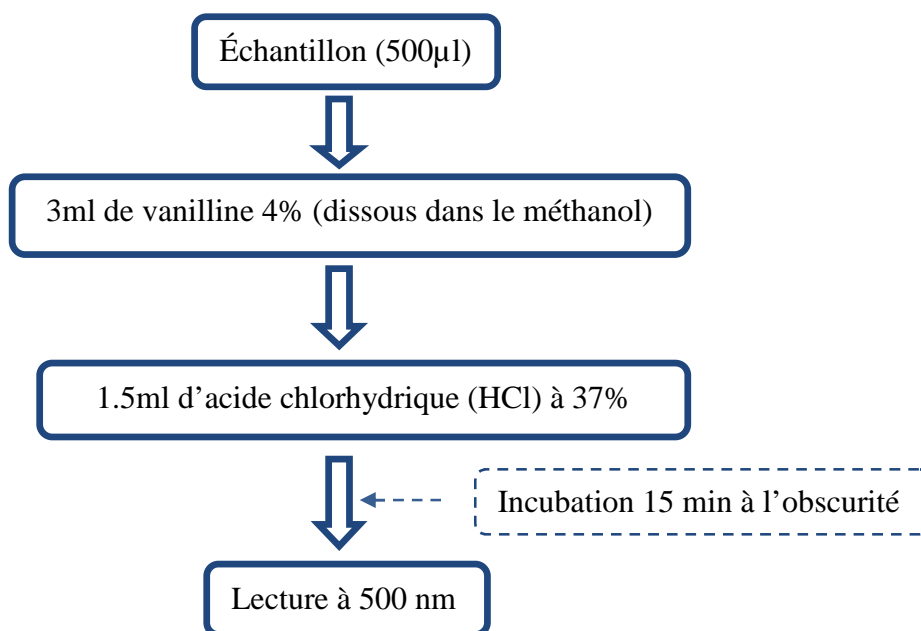


Figure 11: Protocole de dosage des tannins condensés (Ba *et al.*, 2010).

- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.
- Le Blanc : est préparé dans les mêmes conditions que l'échantillon (500µl méthanol+ 3ml vanilline+1,5 HCl).
- La teneur en tannins condensés est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la Catéchine (25-300µg/ml) comme standard. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) d'équivalent de la Catéchine par gramme de l'extrait (**mg EC/g**).

II.2.4. Détermination de potentiel antioxydant

II.2.4.1. Méthode de réduction des radicaux libres DPPH[•]

Le protocole expérimental utilisé décrit par Annie *et al.*, (2006).

- **Mode opératoire**

Le pouvoir antioxydant des échantillons a été évalué sur des concentrations de (12,5 à 400µg/ml) et pour les fractions avec des concentrations de (6,25 à 200µg/ml). Le protocole expérimental est résumé dans la Figure 12.

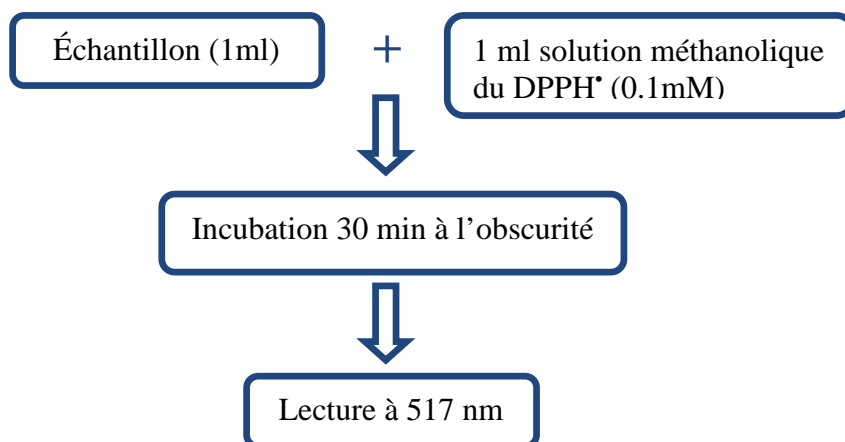


Figure 12 : Protocole d'étude de l'activité «scavenging » du DPPH* (Annie *et al.*, 2006).

- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.
- Le blanc : est préparé avec (1ml de DPPH + 1ml de méthanol).
- Le pourcentage de réduction du radical DPPH* est donné par l'équation suivante :

$$\% \text{ scavenging de radical DPPH}^* = \frac{Ac - AE}{Ac} \times 100$$

Sachant que :

AC : Absorbance du contrôle (DPPH+méthanol).

AE : Absorbance de l'échantillon [Absorbance du test (échantillon +DPPH) - Absorbance du blanc].

- Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus par l'acide ascorbique et Butyl Hydroxy Anisol (BHA) pris comme antioxydants standards.
- Les concentrations inhibitrices à 50% « IC₅₀ » sont calculées graphiquement par un logiciel GraphPad Prism 5.

II.2.4.2. Méthode de réduction des radicaux-cation ABTS^{•+}

La méthode de détermination de l'activité scavenger du radical ABTS^{•+} a été rapportée par Le *et al.*, (2007), la solution ABTS^{•+} a été préparée selon Re *et al.*, (1999).

• Mode opératoire

Des concentrations de (62,5-1000 µg/ml) ont été testées pour les trois extraits et des concentrations de (12,5-400 µg/ml) pour les fractions, le protocole expérimental est résumé dans la Figure 13.

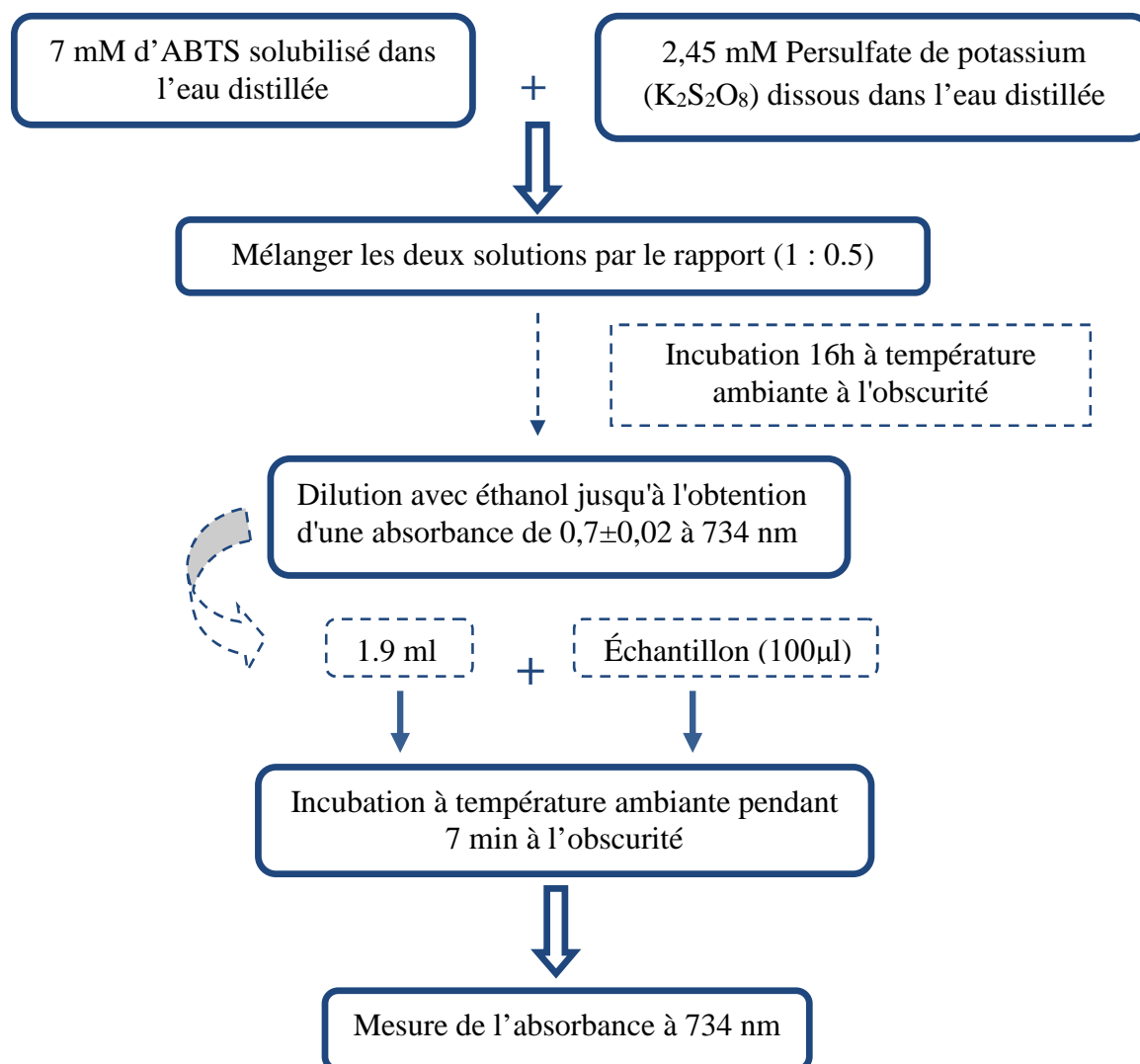


Figure 13 : Protocole d'étude de l'activité « scavenging » de l'ABTS^{•+} (Le *et al.*, 2007 ; Re *et al.*, 1999).

- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.
- Contrôle : (1.9ml ABTS^{•+} + 100µl méthanol).
- Blanc : méthanol.
- Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS^{•+} est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ scavenging de radical ABTS }^{\bullet+} = \frac{Ac - AE}{Ac} \times 100$$

Sachant que :

Ac : Absorbance du contrôle.

AE : Absorbance de l'échantillon (Absorbance du test « échantillon + ABTS^{•+} » - Absorbance du blanc du test « méthanol »).

- Dans les mêmes conditions le Trolox® comme standard à des concentrations comprises entre 0.031-0.5 mM/ml a servi pour tracer la courbe d'étalonnage.

II.2.4.3.Méthode de réduction du fer FRAP

La méthode utilisée pour la mesure de la puissance des substances des extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} est la méthode de FRAP décrite par **Thaipong et al.,(2006)**. La solution de FRAP est préparée selon **Benzie et al., (1996)**.

- **Mode opératoire**

Une concentration de 500 μ g/ml a été testée pour les trois extraits et 200 μ g/ml pour les fractions (Chl, Aceth, n-But et Aq). Le protocole expérimental est résumé dans la Figure 14.

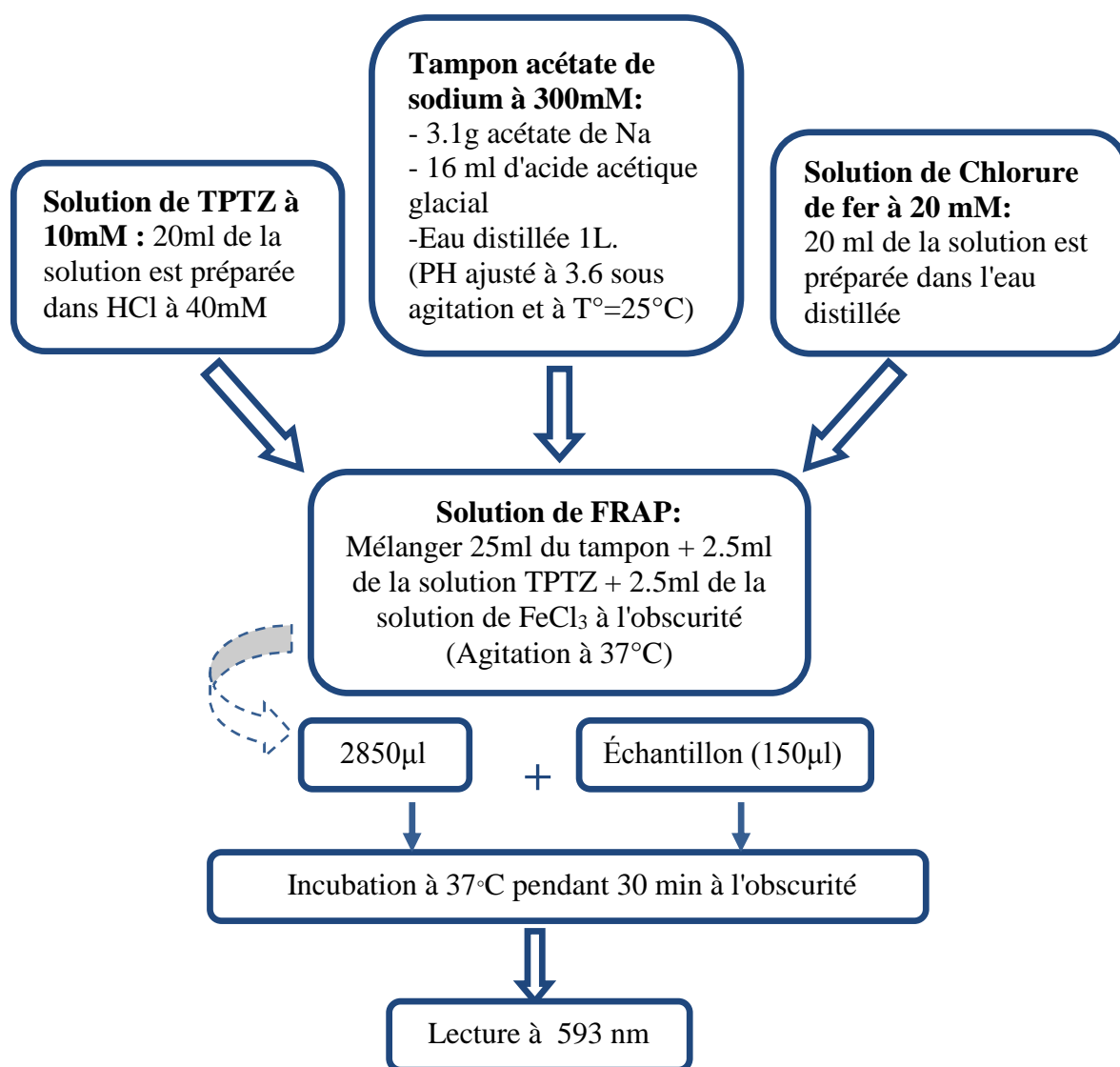


Figure 14 : Protocole de FRAP (Thaipong et al., 2006 ; Benzie et al., 1996).

- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.
- Le blanc : est préparé avec (150µl de méthanol+ 2850µl de FRAP).
- L'acide ascorbique a été utilisé comme un antioxydant standard dont la courbe d'étalonnage a été tracée selon une série de concentrations (**100, 50, 25 et 12µg/ml**).
- Le persulfate de fer (FeSO₄) est utilisé comme standard dans le test, afin de tracer sa courbe d'étalonnage. On a utilisé les concentrations suivantes : **62.5, 125, 250, 500, 750 et 1000 µM/ml**.
- Les résultats sont exprimés par milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de l'échantillon (mg EAA/gE), et par micromole équivalent de FeSO₄ par gramme d'échantillon (mM EFeSO₄/gE).

II.2.5. Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches de références est réalisée par des techniques différentes et complémentaires : Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu liquide (méthode de dilution par des microplaques) et la Méthode de détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) sur un milieu gélosé.

II.2.5.1. Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont :

- Muller Hinton Agar pour l'étude de la sensibilité des bactéries à l'échantillon, est préparé comme suit : Dissoudre 38g de la gélose Muller-Hinton dans 1L d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, avec un PH=7.4±0.2, puis auto-claver pendant 20 minutes à 180°C et finalement couler le milieu dans les boites de Pétri, après refroidissement de milieu.
- Muller Hinton Broth est préparé de la même manière comme le milieu précédent: Dissoudre 21g de Muller Hinton Broth dans 1L d'eau distillée.

II.2.5.2. Isolement des souches

Les différentes souches microbiennes isolées des pré-cultures ont été repiquées par la méthode de stries sur gélose Muller Hinton dans des boites de pétri puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24heures pour optimiser leur croissance.

II.2.5.3. Préparation de l'étalon 0.5 Mc Farland

Pour préparer l'étalon 0.5 Mc Farland on ajoute 0.5 ml d'une solution de BaCl₂ déshydraté à 1% à 9.5ml du H₂SO₄ à 1%, une fois préparé, l'absorbance doit être comprise entre 0.08 à 0.1 à une longueur d'onde 625nm.

II.2.5.4. Préparation des suspensions bactériennes

À partir de cultures jeunes des différentes souches, on prélève quelques colonies isolées et identifiées sur le milieu de culture à l'aide d'un écouvillon puis le décharger dans un tube de 10 ml de l'eau physiologique stérile (NaCl 0.9%). La suspension bactérienne a été bien agitée à l'aide d'un vortex. L'opacité de ces suspensions est équivalente à 0.5 Mc Farland.

II.2.5.5. Préparation des solutions mères

- **Échantillon**

L'extrait méthanolique brut et ses fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) sont dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO), le test antibactérien a été effectué avec des dilutions 1/2 sachant que la concentration de la solution mère de chaque échantillon est 1000µg/ml.

- **Antibiotique**

L'antibiotique injectable « GENTAXYN » avec une dose 40mg est préparé comme suit : 975µl de DMSO + 25µl d'ATB.

II.2.5.6. Mise en test

La méthode utilisée est celle des microplaques en matière plastique de 96 puits à fond « U » (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12). Le protocole antibactérien se résume dans la figure 15.

Les microplaques sont ensuite incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24h. Ensuite, la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu (CMI) est déterminé par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque puits.

Après la lecture de la CMI, et dans le but de déterminer la CMB, un écouvillon est imprégné dans les puits sans croissance visible à l'œil nu (extrait les plus actifs), ensuite l'ensemencement est fait en stries serrés de haut en bas sur une gélose des boites de pétri. Les

boîtes sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Après l'incubation, la CMB correspond à la plus petite concentration qui ne donne aucune croissance bactérienne.

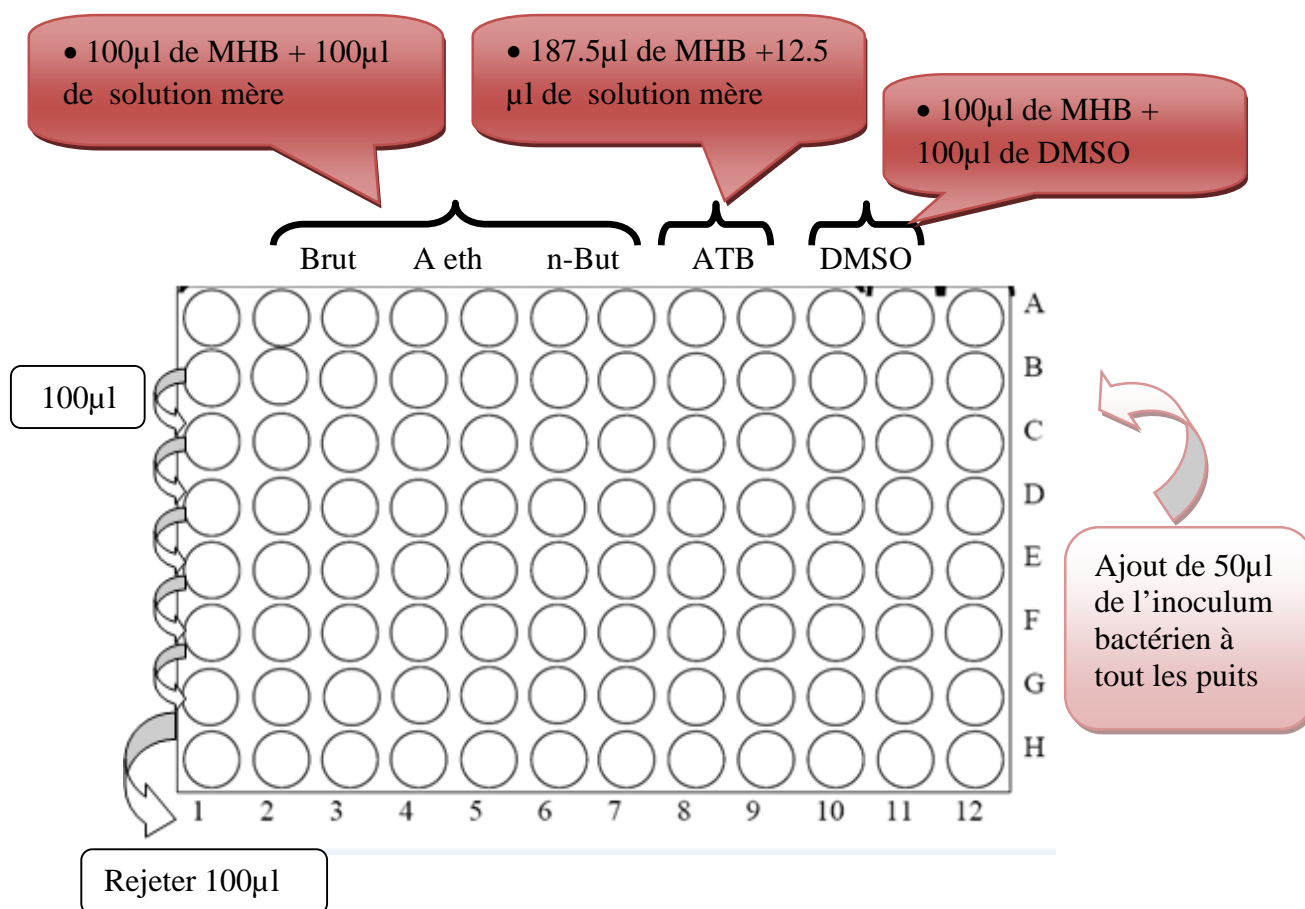


Figure 15 : Schéma d'utilisation d'une microplaque.

Le DMSO est utilisé comme étant un témoin négatif et l'antibiotique comme témoin positif.

II.3. Analyse statistique

Une analyse descriptive des résultats est réalisée à l'aide du programme Microsoft Office Excel 2007, afin de déterminer les moyennes, les écart-types et les coefficients de corrélation. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le Paired T-Test par le logiciel GraphPad Prism 5. Les différences ont été significatives à $P \leq 0.05$.

Chapitre III
Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

Dans cette partie de notre travail, nous allons exposer tout d'abord l'ensemble des résultats obtenus dans les études phytochimiques, ensuite ceux relatifs aux activités antioxydante et antibactérienne de l'extrait d'épine de *Cedrus atlantica manetti*.

III.1. Rendement d'extraction

III.1.1. Rendement d'extraction par macération

La macération est une extraction de type solide-liquide, c'est-à-dire le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide-liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur. La plupart des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion (Basli *et al.*, 2012 ; Ribereau- Gayon, 1968).

Le Tableau IV résume les résultats de rendement des extraits éthanoliques et de l'extrait aqueux obtenus par macération, exprimées en pourcentage (%) par rapport au poids de la poudre des épines de *Cedrus atlantica manetti* utilisée (10g), ainsi que les caractéristiques de chacun.

Tableau IV : Rendement massique et caractéristiques de extraits éthanoliques et de l'extrait aqueux.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
<i>Eth96°</i>	visqueux	Vert	14.99±3.78
<i>Eth 70°</i>	Brillant	Vert foncé	32.17±2.77
<i>Eth 50°</i>	Brillant	Marron foncé	12.13±1.58
<i>Eth25°</i>	Brillant	Marron claire	8.89±1.61
<i>Aqueux</i>	visqueux	jaune	1.26±0.65

D'après les résultats représentés dans le Tableau IV, la méthode d'extraction par macération, en utilisant l'eau et l'éthanol à des degrés différents, permet d'obtenir des

pourcentages de rendement d'ordre suivant : l'éthanol 70° > éthanol 96° > éthanol 50° > éthanol 25° > l'extrait aqueux. Les différences sont significatives ($p < 0.05$) sauf l'éthanol.

L'éthanol est reconnu comme un excellent solvant d'extraction de métabolites secondaires tels que les polyphénols, avec une faible toxicité par rapport aux autres solvants tel que le méthanol (Contini *et al.*, 2008).

Les résultats révèlent un rendement plus élevé en utilisant l'éthanol 70° (32.17 ± 2.77 %) par rapport aux autres extraits, il est aussi plus élevé par rapport à celui obtenu dans l'étude sur la partie aérienne de *Cedrus atlantica manetti* de Fadel *et al.*, (2016), qui ont réalisé une macération avec l'éthanol 70 % avec un rendement de l'ordre de 9.8 %. Cette variabilité du rendement de peut être due à l'origine géographique de la plante, aux facteurs climatiques et à la technique d'extraction, mais également à la période de cueillette de la matière végétale (Smith *et al.*, 2005).

D'après Quy *et al.*, (2014), l'utilisation combinée de l'eau et du solvant organique peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et / ou dans le solvant organique. L'extraction avec l'eau a montré un rendement plus faible qui est $1.26 \pm 0.65\%$ car l'eau a moins d'affinité avec les composés polaires (Soltanie, 2017).

III.1.2. Rendement d'extraction par soxhlet

L'extraction solide-liquide est réalisée par soxhlet pour obtenir initialement l'extrait brut contenant les polyphénols totaux. L'extrait méthanolique brut obtenu subit par la suite une extraction liquide-liquide par fractionnement avec des solvants à polarité croissante.

Le Tableau V résume les résultats de rendement des extraits obtenus par le Soxhlet : acétonique, éthanolique et méthanolique, exprimés en pourcentage (%) par rapport au poids de la poudre des épines de *Cedrus atlantica manetti* utilisée (26g) et celui de chaque fraction est exprimé en pourcentage par rapport au poids de l'extrait méthanolique brut utilisé (2g), ainsi que les caractéristiques de chacun.

Tableau V : Rendement massique et caractéristiques de l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique brut et ses fractions.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %	
			Soxhlet	Fractionnement
<i>Meth</i>	visqueux	Vert foncé	31.64 ± 1.34	/
<i>Ac</i>	visqueux	Vert foncé	12.34 ± 0.77	/
<i>Eth</i>	visqueux	Vert foncé	26.90 ± 0.42	/
<i>Hex</i>	Huileux	Vert	/	12.8
<i>Chl</i>	Brillant	Vert foncé	/	10.2
<i>Aceth</i>	Brillant	Vert	/	4.6
<i>n-but</i>	Poudre	marron caramel	/	33.4
<i>AQ</i>	visqueux	Jaune	/	36.7

D'après les résultats représentés dans le Tableau V, le rendement d'extraction par soxhlet révèle un meilleur taux pour l'extrait méthanolique (M- brut) de l'ordre de 31.64±1.34 %, suivi par l'extrait éthanolique (E-brut) et l'extrait acétonique (A-brut) de l'ordre de 26.90±0.42% et 12.34±0.77%, respectivement. L'analyse statistique montre une différence significative ($p < 0.05$). Cette variation de rendement est probablement due à la différence de polarité existante entre les solvants utilisés (Nacz et Shahidi, 2004).

Le taux d'extrait méthanolique est plus important par rapport à l'étude de Ait Baziz et Chemali, (2017), réalisée sur les tiges de *Cedrus atlantica manetti* avec le même protocole expérimental, qui est de l'ordre de 18.7±3.22 %. En effet, ce taux peut varier selon la partie de la plante, aussi, le taux d'extraction des composés phénoliques est influencé par la taille des

particules de l'échantillon et la meilleure extraction est obtenue avec le plus petit diamètre **(Naczk et Shahidi, 2004)**.

Les résultats de rendement des fractions exprimés par rapport au poids de l'extrait brut méthanolique des épines de *Cedrus atlantica manetti*, révèlent un pourcentage plus élevé pour les fractions aqueuse (Aq) et butanolique (n-But) de l'ordre de 36.7% et 33.4%, respectivement; suivi par les fractions hexanique (Hex) et chloroformique (Chl) avec un rendement de 12.8% et 10.2% ; respectivement, et en dernier, la fraction acétate d'éthyle (Aceth) qui a entraîné une faible quantité de molécules avec un taux de 4.6%.

Cette différence peut être liée à la nature du solvant ainsi qu'à la méthode d'extraction utilisée. Puisque la solubilité des composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanolique et ses fractions est affectée par la polarité des solvants utilisés **(Garcia-Salas et al., 2010)**.

La macération et le soxhlet sont considérés comme étant des méthodes conventionnelles d'extraction des composés phénoliques approuvées par divers auteurs pour leurs efficacités **(Bourgou et al., 2016)**. Selon les résultats de ce présent travail, l'extrait éthanolique obtenu par soxhlet en utilisant l'éthanol à 96°, a donné un meilleur rendement que celui obtenu par macération, ce qui démontre que l'extraction par soxhlet a une efficacité plus importante. La méthode d'extraction influence significativement le rendement et les teneurs en composés phénoliques **(Bourgou et al., 2016)**, ainsi que le volume de solvant, le nombre de cycles d'extraction et le poids initial de la poudre influencent l'extraction **(Mompou et al., 1998 ; Hadj Salem, 2009)**.

III.3. Etudes phytochimiques

L'étude phytochimique consiste à réaliser une analyse chimique qualitative et quantitative basée sur des réactions de coloration plus au moins spécifique à chaque classe. Les groupes phytochimiques recherchés appartenant aux métabolites secondaires sont entre autres : les polyphénols (polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés).

III.3.1. Teneur en polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols des épines du *Cedrus atlantica* est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu qui est basée sur la réduction en milieu alcalin du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue **(Talbi et al., 2015)**.

Les teneurs en polyphénols correspondant à l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique Brut et ses fractions sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (**Annexe 01**) et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de la matière végétale sèche (**mg EAG/g d'extrait**) selon l'équation suivante: $Abs = 0,008 [AG] - 0,013$; $R^2 = 0,992$.

L'apparition de la couleur bleue après 1h d'incubation confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif Folin-ciocalteu. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est fonction de la teneur en polyphénols. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 16.

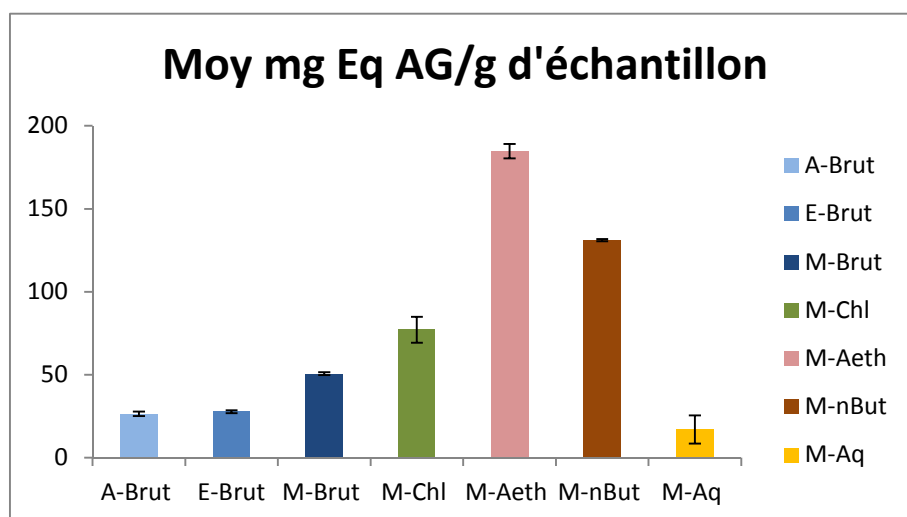


Figure 16 : Teneur en polyphénols de l'extrait A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions.

Les résultats obtenus dans la figure 16 montrent clairement que la teneur en polyphénols totaux la plus élevée dans l'extrait M-brut, suivi par l'extrait E-brut et l'extrait A-brut avec des taux : $50,58 \pm 0,85$, $27,66 \pm 0,81$ et $26,37 \pm 1,35$ mgEAG/gE ; respectivement. Ces résultats expriment ainsi la bonne capacité du méthanol à faire extraire les composés phénoliques. L'analyse statistique montre que la différence entre les teneurs en polyphénols (M-brut et E-brut) et (A-brut et M-brut) est significative ($P < 0,05$) et (A-brut et E-brut) est non significative ($P > 0,05$).

La meilleure teneur pour les fractions de méthanol brut a été obtenue avec la fraction Aceth suivi par la fraction n-But et la fraction Chl tandis que la fraction Aq révèle la plus faible teneur en polyphénols qui sont d'ordre de $184,75 \pm 4,33$, $131,08 \pm 0,76$, $77,08 \pm 7,74$, $17 \pm 8,5$; respectivement. Les différences sont toutes significatives ($P < 0,05$).

Selon **Macheix *et al.*, (2005)**, les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et peu solubles dans les solvants organiques apolaires. Cette variation de la quantité en polyphénols peut s'expliquer par les facteurs climatiques, les conditions de séchage ou de stockage, par la méthode d'extraction et ses conditions (temps, température) et le type de solvant d'extraction (**Hamia *et al.*, 2014**).

III.3.2. Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante. La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (**Talbi *et al.*, 2015**).

La teneur en flavonoïdes correspondant à l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique brut et ses fractions est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec la Quercétine (**Annexe 01**) et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent Quercétine par gramme d'extrait de la matière végétale sèche (**mg EQ/g d'extrait**) selon l'équation suivante : $\text{Abs} = 0,023 [\text{Q}] + 0,005$; $\text{R}^2=0,999$.

Une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits après l'addition de la solution de chlorure d'Aluminium (AlCl_3) sauf la fraction Aq. Cette coloration révèle la présence des flavonoïdes dans les extraits analysés et dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait en flavonoïdes. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes. Les résultats du dosage des flavonoïdes sont représentés dans la figure 17.

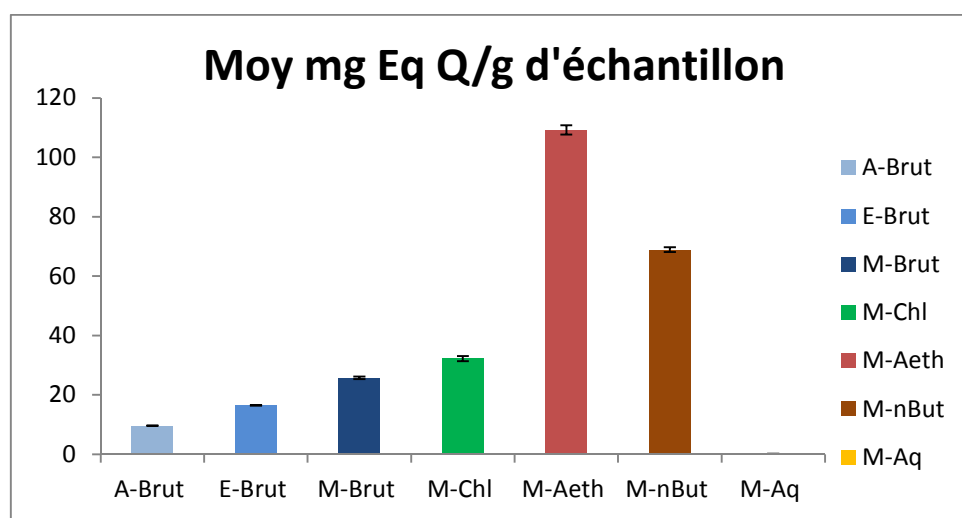


Figure 17 : Teneur en flavonoïdes de l'extrait A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions.

Les résultats de dosage des flavonoïdes révèlent, pour les trois extraits : M-brut, E-brut et A-brut les valeurs suivantes : 25.79 ± 0.43 , 16.47 ± 0.09 et 9.6 ± 0.06 mgEQ/gE, respectivement. On constate d'après les résultats obtenus, une différence de la teneur en flavonoïdes ; en effet, l'extrait M-brut est plus riche en flavonoïdes par rapport à E-brut et A-brut. Les différences sont toutes significatifs ($p < 0.05$).

La quantité des flavonoïdes dans l'extrait M-brut est supérieure à celle trouvée par **Fadel et al., (2016)**, une étude réalisé par macération avec l'éthanol 70% qui est de l'ordre $16.86 \pm 5.318 \mu\text{g EQ/mgE}$, et supérieure à celle trouvée par **Ait Baziz et Chemali, (2017)** qui est de l'ordre $5.27 \pm 0.38 \mu\text{g EQ/mgE}$.

Les résultats de dosage des flavonoïdes pour les fractions Aceth, Chl, n-But et Aq sont d'ordre de : 109.27 ± 1.56 , 68.92 ± 0.84 , 32.23 ± 0.84 , 0.2 ± 0.04 ; respectivement. Toutes les différences sont significatives ($p < 0.05$). La fraction Aceth est la plus riche en flavonoïdes par rapport aux autres fractions, ainsi que par rapport à celle trouvée par **Ait Baziz et Chemali, (2017)** qui est de l'ordre $20.75 \pm 0.58 \mu\text{g EQ/mgE}$. Cependant la fraction Aq représente la plus faible teneur.

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques, dont certains sont solubles dans les solvants polaires, tandis que d'autres sont solubles dans les solvants apolaires (**Macheix et al., 2005**).

III.3.3. Teneur en tanins condensés

Afin de déterminer la contenance en tannins des extraits des épines de *Cedrus atlantica manetti*, la méthode de la vanilline en milieu acide est utilisée.

La teneur en tanins condensés correspondant à l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique brut et ses fractions est déterminée en se référant à une courbes d'étalonnage établie avec la Quercétine (**Annexe 01**) et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent catéchine par gramme d'extrait de la matière végétale sèche (**mg EC/g d'extrait**) selon l'équation suivante : $\text{Abs} = 0,002 [\text{C}] + 0,011$; $R^2 = 0,995$.

Une couleur rose claire est formée dans les extraits après l'addition de la solution de vanilline sauf dans la fraction aqueuse, cette coloration révèle la présence des faibles teneurs

en tanins dans les extraits analysés et dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'extrait en tanins. Les résultats du dosage des tanins sont représentés dans la Figure 18.

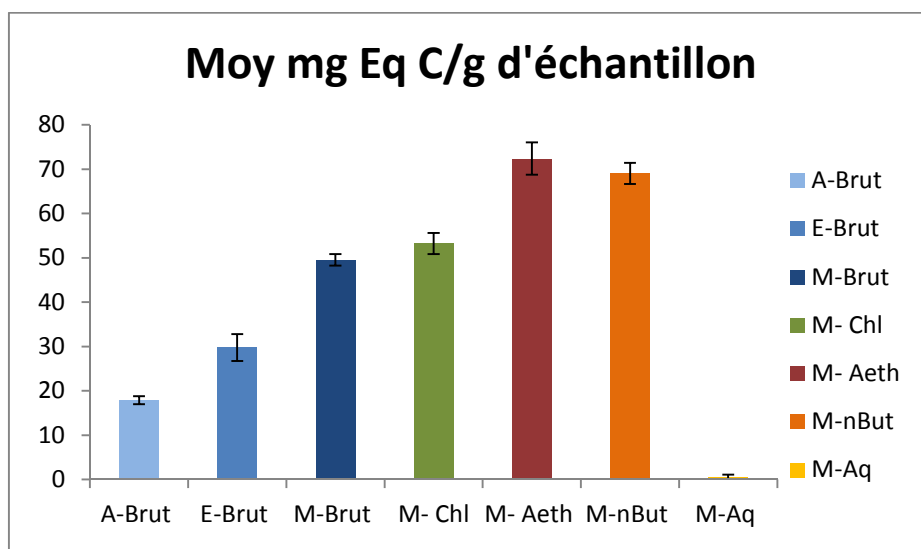


Figure 18 : Teneur en tanins condensés de l'extrait A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions.

Les résultats de dosage des tanins révèlent pour les trois extraits : M-brut, E-brut et A-brut les valeurs suivantes : 49.77 ± 1.28 , 29.77 ± 3.03 et 17.86 ± 0.89 mgEC/g E ; respectivement. Toutes les différences sont significatifs ($p < 0.05$).

Les résultats de dosage des tanins condensés révèlent que l'extrait M-brut contient plus de tanins comparativement à E-brut et A-brut, mais reste très faible par rapport à la valeur trouvée par **Ait Baziz et Chemali, (2017)** qui est de l'ordre 308 ± 4.71 mgEC/g E. Ce qui indique que les extraits d'épines de *Cedrus atlantica manetti* sont pauvres en tanins.

Les résultats de dosage des tanins pour la fraction Aceth, n-But, Chl et Aq ont permis d'obtenir les teneurs suivantes: 72.39 ± 3.62 , 69.05 ± 2.37 , 53.22 ± 2.37 et 0.54 ± 0.54 mgEC/g E ; respectivement. Toutes les différences sont significatives sauf (Aceth-n-But). La teneur la plus élevée a été enregistrée par la fraction Aceth et n-But et sont par ailleurs plus faibles que celles trouvées par **Ait Baziz et Chemali, (2017)** qui sont de l'ordre 165.5 ± 1.03 , 574 ± 27.86 mgEC/g.

D'après cette étude le méthanol et l'acétate d'éthyle et n-butanol peuvent être considérés de meilleurs solvants pour l'extraction des polyphénols.

III.4. Evaluation de l'activité antioxydante

Différentes méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des épines de *Cedrus atlantica manetti*, le test DPPH•, ABTS•⁺ et le test de FRAP.

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée avec les différents extraits : A-brut, E-brut et M-brut ainsi que sur les fractions Aceth, Chl, n-But et Aq obtenues à partir de l'extrait M-brut.

III.4.1. Activité Scavenger du radical DPPH•

L'efficacité d'un antioxydant peut être définie comme étant sa capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne. Afin d'évaluer cette efficacité, on a utilisé la méthode de DPPH• (Molyneux, 2004), ce dernier est de couleur violette. En présence de donneurs de protons (antioxydants), le DPPH• vire au jaune et se réduit alors en DPPH-H (Maataoui *et al.*, 2006).

La Figure 19 représente les pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par les standards utilisés, l'acide ascorbique (Vit C) et la BHA.

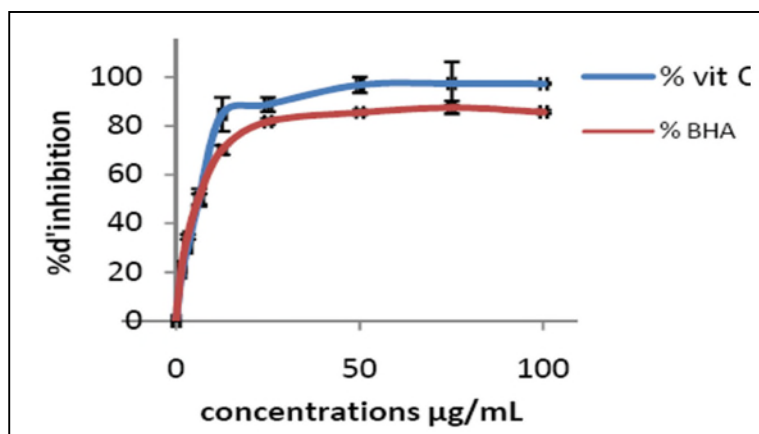


Figure 19: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les standards, la Vit C et la BHA.

D'après ces résultats, on constate que la Vit C est plus efficace que la BHA avec un taux d'inhibition maximal de l'ordre de 93.93 ± 8.46 et 81.76 ± 8.46 ; respectivement, atteints à la concentration de $25 \mu\text{g/mL}$. La concentration inhibitrice 50% (IC 50) est de l'ordre de 6.72 ± 0.07 et $7.6 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ pour le vit C et la BHA, respectivement. Ce qui indique que la Vit C est plus puissante que la BHA dans l'effet scavenger du radical DPPH•.

Après 30 mn d'incubation, la coloration violette vire vers une coloration jaune, ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH•, ce qui montre que les échantillons ont

un effet scavenger de radical DPPH•. Les résultats de l'activité scavenging du radical DPPH• des l'extraits : A-brut, E-brut et M-brut sont illustrés dans la Figure 20.

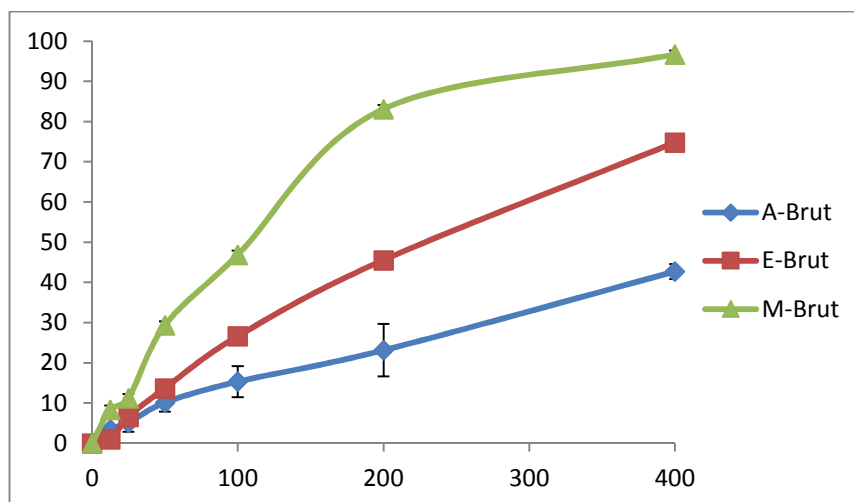


Figure 20 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par les extraits : A-brut, E-brut et M-brut.

La Figure 20 montre les pourcentages d'inhibition du radical DPPH• obtenus par les différents extraits des concentrations de 12,5-400µg/ml, On remarque que l'activité antiradicalaire des extraits évolue avec l'augmentation des concentrations et que le pourcentage d'inhibition augmente progressivement. Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH par l'extrait M-brut ($96.68 \pm 1.02\%$), E-brut ($74.81 \pm 1.76\%$) et A-brut ($42.70 \pm 1.87\%$), sont statistiquement significatifs ($p < 0.05$).

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique moins efficace comparativement aux standards à réduire le radical DPPH•.

La Figure 21 montre les pourcentages d'inhibition du radical DPPH• obtenus par les différentes fractions.

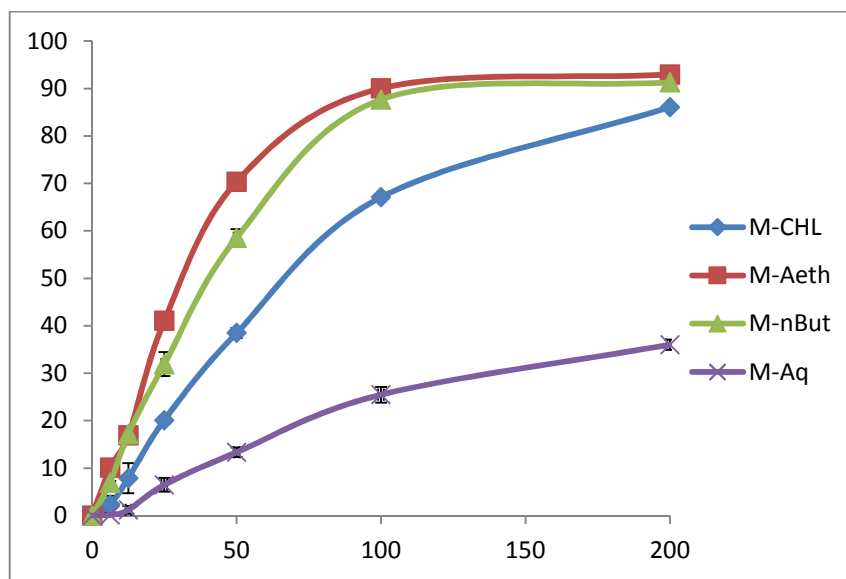


Figure 21 : Pourcentage d'inhibition de radical DPPH• par les différentes fractions.

L'activité anti-oxydante des fractions dans un ordre décroissant est comme suit : Aceth, n-But, Chl puis Aq de l'ordre de : 92.92 ± 0.56 , 91.31 ± 0.26 , 86.06 ± 0.45 et $36.01 \pm 1.09\%$; respectivement, et sont statistiquement significatifs ($p < 0.05$). Ces résultats montrent aussi l'efficacité des fractions : Aceth, n-But et Chl comparativement aux standards à réduire le radical DPPH. On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration.

Selon **Andrade *et al.*, (2009)**, l' IC_{50} est défini comme étant la concentration de l'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH•. Plus la valeur d' IC_{50} est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (**Khoudali *et al.*, 2014**). Les résultats d' IC_{50} du radical DPPH sont illustrés dans la Figure 22.

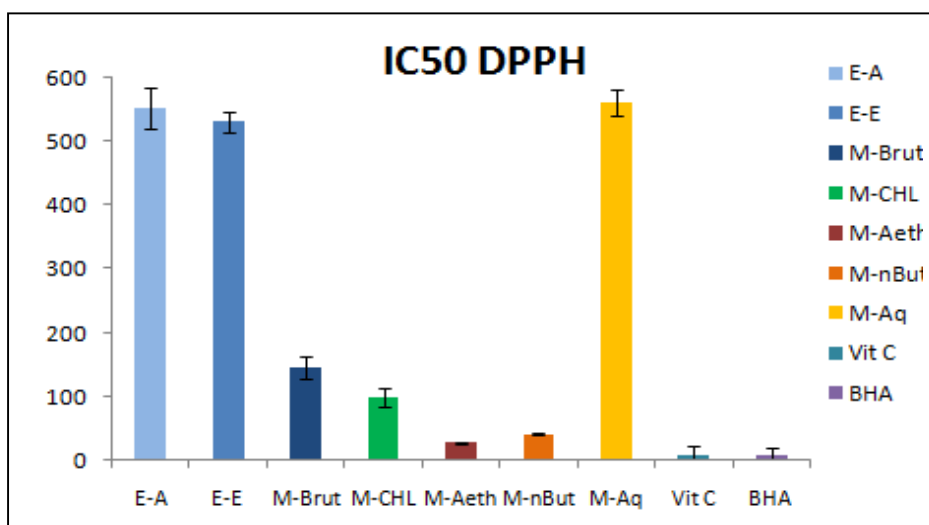


Figure 22 : Valeurs des IC_{50} de Vit C, BHA et les extraits A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions.

Les valeurs d'IC₅₀ de la Vit C et de la BHA sont respectivement de l'ordre de 6.72±14.49µg/ml et 7.6±11.36µg/ml.

D'après la figure 22 les IC₅₀ de l'extrait M-brut, E-brut et A-brut sont de l'ordre de : 144.86±17.49, 531.2±15.69 et 552.4±31.46 µg/ml ; respectivement, et les fractions Aceth, Chl, n-But et Aq sont de l'ordre de : 27.31±1.36, 41.17±0.77, 97.40±14.86 et 562.03±20.45 µg/ml ; respectivement.

En comparant les IC₅₀ de l'acide ascorbique et de la BHA, on remarque qu'ils sont nettement inférieurs par rapport à ceux des extraits ce qui indique que l'activité anti-radicalaire de ces extraits est faible. Par contre, les fractions Aeth et n-But sont proches des IC₅₀ des standards ce qui indique que l'activité anti-radicalaire de ces fractions est forte.

D'après les résultats trouvés par **Fadoua et al., (2015)** sur l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Cedrus atlantica*, l'IC₅₀ est de l'ordre de 0,4 mg/ml avec un pourcentage d'inhibition maximal de 87.87±0.17% obtenu à la concentration de 2mg/ml. Ces valeurs, montrent que les extraits de poudre des épines de *Cedrus atlantica manetti* ne sont pas de puissants antioxydants.

Ces résultats sont en corrélation avec la faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes qui font parti des polyphénols présents dans ces extraits.

La corrélation entre la teneur en polyphénols et les IC₅₀ des extraits (A-brut, E-brut, M-Brut, Chl, Aceth, n-But et Aq) est faible selon le coefficient de corrélation ($R^2 = 0.687$) donné par la courbe de corrélation (**Annexe 02**), et celle entre la teneur en tanins condensés et les IC₅₀ des échantillons montre un $R^2 = 0.889$. Cette corrélation indique que la puissance de l'activité anti-radicalaire de DPPH• de nos échantillons pourrait être due aux tanins condensés.

III-4-2- Activité Scavenger du radical ABTS^{•+}

L'activité antioxydante d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu en le transformant en ABTS incolore, en présence de proton issu d'un antioxydant (**Re et al., 1999**).

La courbe d'étalonnage obtenue par le Trolox traduit le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} en fonction des concentrations allant de **0.031 à 0.4mM**, présenté dans la Figure 23.

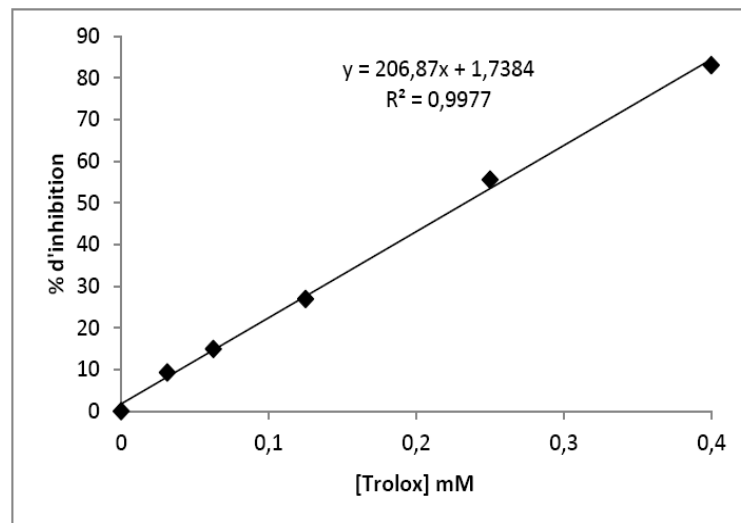


Figure 23 : Courbe de pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^{\bullet+}$.

Le pourcentage d'inhibition maximal du radical $ABTS^{\bullet+}$ par vit C et BHA est de : 99.32 ± 0.58 , 98.80% ; respectivement.

Les pourcentages d'inhibition de radical $ABTS^{\bullet+}$ des extraits : méthanolique, éthanolique et acétonique sont représentés dans la Figure 24.

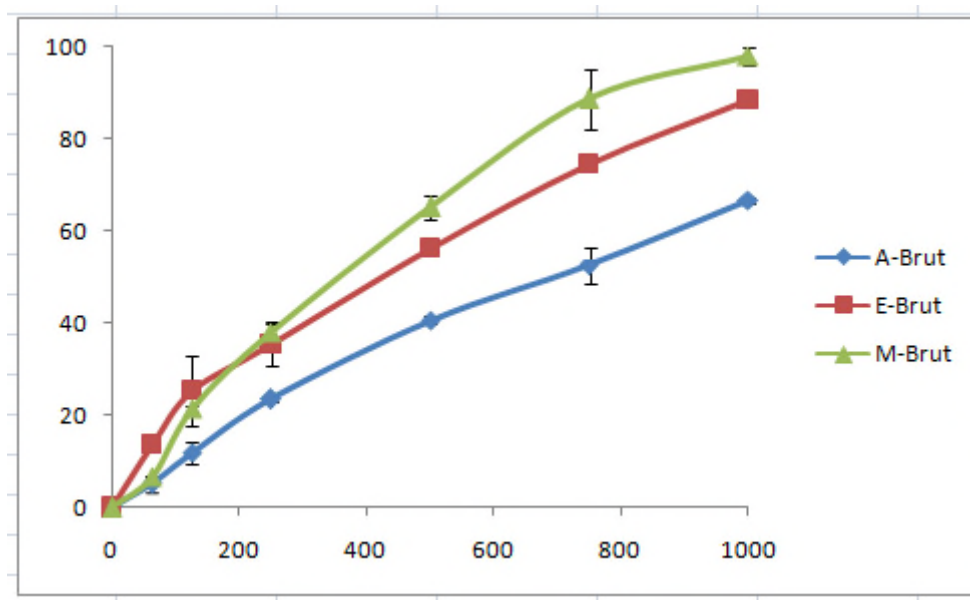


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de radical $ABTS^{\bullet+}$ des extraits A-brut, E-brut et M-brut.

D'après la figure 24, on remarque que l'activité antiradicalaire des échantillons évolue avec l'augmentation des concentrations.

Le pourcentage d'inhibition maximal du radical $ABTS^{\bullet+}$ par l'extrait M-brut, E-brut et A-brut: 98.10 ± 1.96 , 88.54 ± 0.84 , $66.68 \pm 0.81\%$; respectivement, et sont statistiquement

significatifs ($p < 0.05$). Ces résultats montrent l'efficacité de l'extrait M-brut à réduire le radical $ABTS^{\bullet+}$ moins efficace que les standards.

Les pourcentages d'inhibition de radical $ABTS^{\bullet+}$ des fractions Aceth, n-But, Chl et AQ sont représentés dans la Figure 25.

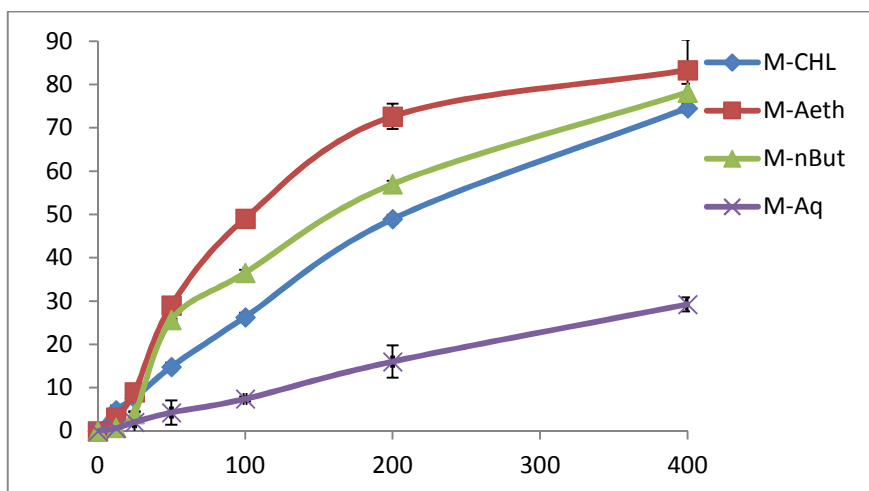


Figure 25 : Pourcentage d'inhibition de radical $ABTS^{\bullet+}$ des fractions.

Le pourcentage d'inhibition maximal du radical $ABTS^{\bullet+}$ par les fractions Aceth, n-But, Chl et Aq est de l'ordre de 83.34 ± 7.03 , 78.18 ± 1.99 , 74.53 ± 2.02 et $29.26 \pm 1.62\%$, respectivement ; et sont statistiquement non significatifs ($p > 0.05$). Ces résultats montrent aussi l'efficacité des fractions : Aceth, n-But comparativement aux standards à réduire le radical $ABTS^{\bullet+}$.

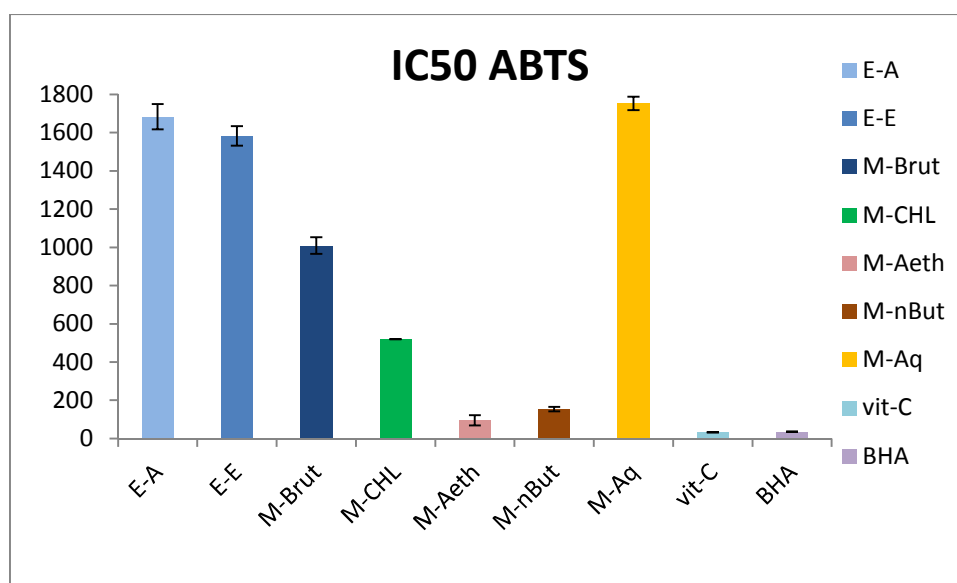


Figure 26 : Valeur des IC50 des échantillons, Vit C et BHA.

Les IC₅₀ obtenus avec la vit C et BHA sont de l'ordre de 32.60±0.7 ; 35.47±1.07%, respectivement ; et celles obtenues avec l'extrait A-brut, E-brut et M-brut et ses fractions Aceth, n-But, Chl et Aq sont de l'ordre de 1009.3±43.42, 1583.66±51.02, 1683.66±66.58, 95.66 ±26.73, 153.53±11.35, 519.56±1.25 et 1753±35,39% ; respectivement.

En comparant avec les IC₅₀ de l'acide ascorbique et de la BHA, on remarque qu'elles sont nettement inférieures par rapport à celles des extraits, ce qui indique que l'activité antiradicalaire de ces extraits est faible. Par contre, les fractions Aeth et n-But sont proches des IC₅₀ des standards, ce qui indique que l'activité anti-radicalaire de ces fractions est forte. L'étude réalisée sur les tiges de *Cedrus atlantica manetti* avec le même protocole expérimental par **Ait Baziz et Chemali, (2017)** a donné des IC₅₀ pour l'extrait M-brut et la fraction Aceth les valeurs de l'ordre de 75.58 et 98.38%, respectivement.

La courbe de corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et les IC₅₀ des échantillons (A-brut, E-brut, M-brut, Chl, Aceth, n-But et Aq) (**annexe 02**), montre un coefficient de corrélation $R^2 = 0.858$; et celle entre la teneur en tanins condensés et les IC₅₀ des échantillons montre un $R^2 = 0.910$, cette forte corrélation indique que la puissance de l'activité anti-radicalaire d'ABTS•⁺ de nos échantillons est peut être due aux polyphénols, et plus précisément aux tanins condensés. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le test anti-radical DPPH•.

III.4.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

C'est le test le plus répandu pour déterminer la capacité antioxydante des extraits végétaux à réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺ (**Thaipong et al., 2006**). Dans cette étude l'acide ascorbique et le sulfate de fer ont servi pour obtenir les courbes d'étalonnage (**Annexe 02**), ayant les équations suivantes :

$$\text{Abs} = 0,0189 [\text{Vit C}] - 0,0162 ; R^2 = 0,9992$$

$$\text{Abs} = 0,0012 [\text{FeSO}_4] - 0,0283 ; R^2 = 0,9986$$

Les résultats des composés réducteurs (antioxydants) dans nos échantillons sont exprimés en mg EAA/g E et en mM EFeSO₄/gE illustrés dans les Figures 26 et 27, respectivement.

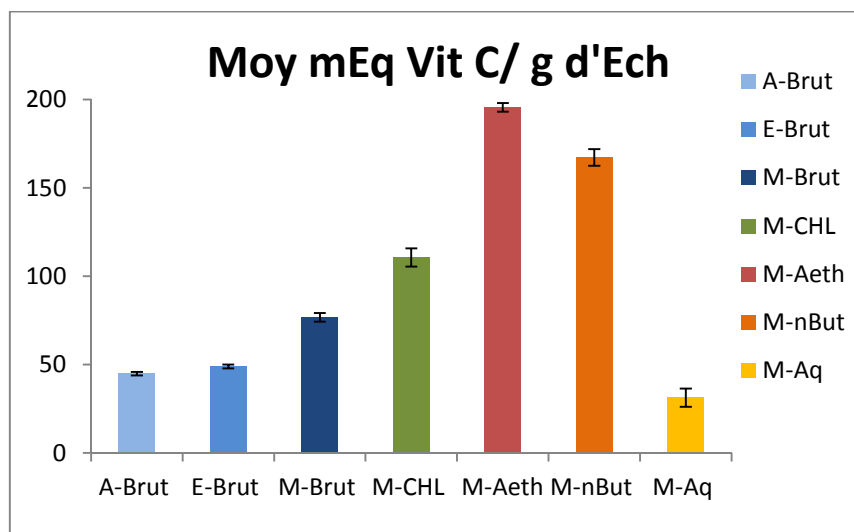


Figure 27 : le pouvoir réducteur des différents extraits et fractions comparativement au vit C.

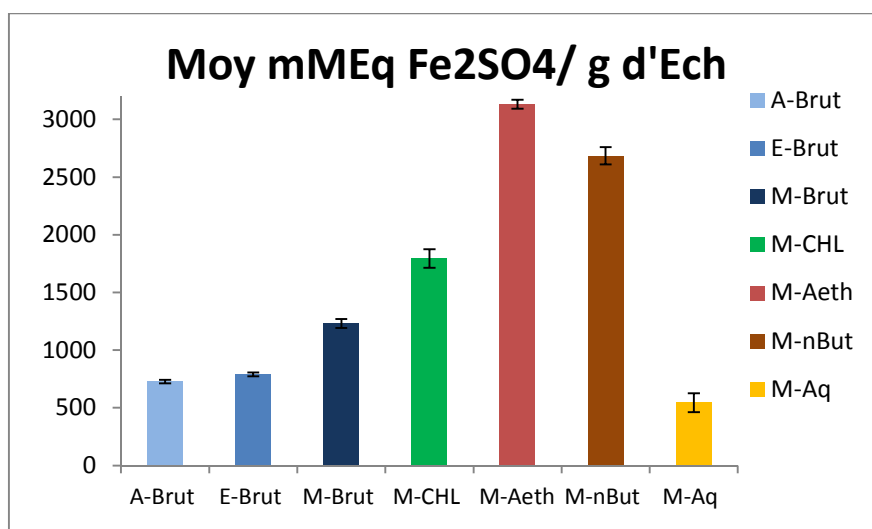


Figure 28: le pouvoir réducteur des différents extraits et fractions comparativement au sulfate de fer.

La Figure 27 présente le pouvoir réducteur des extraits: A-brut, E-brut et M-brut qui sont de l'ordre de : 44.92 ± 1 , 48.91 ± 1.07 et 76.81 ± 2.46 EAA/gE ; respectivement, et pour les fractions : Chl, Aceth, n-But et Aq qui sont de l'ordre de : 110.72 ± 5.17 , 195.64 ± 2.44 , 167.24 ± 4.7 et 31.35 ± 5.17 EAA/gE ; respectivement, dont la différence est statistiquement significative ($P < 0.05$), ce qui confirme le faible pouvoir antioxydant des extraits des épinettes de *Cedrus atlantica manetti* observé dans le test antiradical DPPH•.

La Figure 28 présente le pouvoir réducteur des extraits : A-brut, E-brut et M-brut qui sont de l'ordre de 727.72 ± 15.84 , 790.50 ± 16.85 , 1229.94 ± 38.76 mM EFeSO₄/gE, respectivement ; et pour les fractions : Chl, Aceth, n-But et Aq qui sont de l'ordre de :

1794.30±81.47, 3131.80±38.49, 2684.58±74.10, 544.30±81.47 mM EFeSO₄/gE ; respectivement, dont la différence est statistiquement significative (P<0.05). Ces valeurs sont toute fois, nettement loin de celles obtenues avec le standard, la Vit C. D'après ces résultats, l'extrait M-brut montre un pouvoir réducteur le plus important par rapport à A-brut et E-brut, ainsi que les fractions Aceth et n-But montre un pouvoir réducteur le plus important par rapport aux autres fractions et qui affiche des teneurs en polyphénols les plus élevés. Néanmoins, cette activité reste très faible par rapport au standard utilisé, la Vit C, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le test DPPH•.

La courbe de corrélation tracée entre la teneur en polyphénols et le pouvoir réducteur des échantillons (A-brut, E-brut, M-Brut, Chl, Aceth, n-But et Aq) (**Annexe 02**), montre un coefficient de corrélation $R^2 = 0.978$ et celle entre la teneur en tanins condensés et le pouvoir réducteur des échantillons montre un $R^2=0.849$. Cette forte corrélation indique que la puissance de l'activité antioxydante des composants de l'extrait méthanolique des épines de *Cedrus atlantica*, qui se concentre essentiellement dans la fraction Aceth et n-But, est due essentiellement aux polyphénols, et plus précisément aux tanins condensés.

Les coefficients de corrélation (R^2) entre les différents tests antioxydants réalisés (test DPPH• - test ABTS^{•+}), (pouvoir réducteur- test DPPH•), (pouvoir réducteur- test ABTS^{•+}) sont de l'ordre de : 0.924, 0.777 et 0.936 ; respectivement. Cela démontre que les trois tests utilisés dans cette étude pour évaluer l'activité antioxydante sont en accord et révèlent que les fractions Aceth et n-But ont une très bonne activité comparativement aux standards utilisés.

III.5. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par deux techniques: La méthode de dilution sur microplaques et la méthode d'ensemencement sur un milieu gélosé, qui ont été réalisées sur trois échantillons (méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol), ainsi que sur un témoin positif qui est l'antibiotique (Gentaxyn), le solvant DMSO comme témoin négatif.

III.5.1. Résultats des CMI

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h (**Toty et al., 2013**).

Les CMI des différents échantillons sont estimées à l'œil nu par le principe de la présence ou non d'un trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque puits. Les données relatives à la concentration minimale inhibitrice vis à vis les trois souches testées dans cette étude (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) sont présentés dans le Tableau VI.

Tableau VI: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque échantillon ($\mu\text{g/ml}$) pour chaque souche bactérienne.

Echantillon/souche	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
M-brut	1000>CMI>500	500>CMI>250	500>CMI>250
Aceth	1000>CMI>500	125>CMI>62.5	250>CMI>125
n-But	1000>CMI>500	250>CMI>125	250>CMI>125
ATB	125>CMI>62.5	62.5>CMI>31.25	62.5>CMI>31.25
DMSO	Présence de la croissance	Présence de la croissance	Présence de la croissance

D'après le Tableau VI, les résultats de la CMI des différents échantillons testés sur *E.coli* montrent que cette souche est résistante vis-à-vis les différents échantillons. L'extrait M-brut et les fractions (Aceth et n-But) ont une CMI comprise entre (1000>CMI>500), par rapport à l'antibiotique qui a une CMI de (125>CMI>62.5).

Les CMI obtenues par la souche *S. aureus* révèle une sensibilité importante pour les fractions Aceth, n-But et l'extrait M-brut qui sont de l'ordre de : (125>CMI>62.5, 250>CMI>125 et 500>CMI>250) ; respectivement, par rapport à l'antibiotique qui a une CMI de (62.5>CMI>31.25).

La souche *B. subtilis* est moyennement sensible aux différentes dilutions pour l'extrait M-brut (500>CMI>250) et une même CMI fractions (Aceth et n-But) qui est comprise entre (250>CMI>125), par rapport à l'antibiotique qui a une CMI de (62.5>CMI>31.25).

Les résultats montrent que toutes les souches ont été affectées par les fractions Aceth et n-But, ce qui indique que ces dernières ont une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes et que le degré d'inhibition de leur croissance varie en fonction de la souche bactérienne.

Le DMSO a été testé comme contrôle négatif, les résultats montrent que le solvant ne présente aucun effet sur la croissance des souches bactériennes. La GENTAXIN a été testée comme contrôle positif a montré un effet plus puissant que les extraits testés.

La comparaison des résultats obtenus démontre que la capacité antibactérienne est variable d'une souche à une autre et d'un échantillon à un autre et à leurs concentrations. Une activité antibactérienne importante est enregistrée sur *S. aureus* et *B. subtilis* (Gram+) que sur *E.coli* (Gram-).

Ceci peut s'expliquer que les bactéries à Gram(-) sont plus résistantes que les bactéries à Gram (+) et ce grâce à la structure de leur membrane externe. Les bactéries Gram (-) sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et l'assise externe composée de lipo-polysaccharides et de protéines et constituerait ainsi une barrière imperméable aux substances. Pour les bactéries Gram (+), la couche peptidoglycane se situe à l'extérieur et leur permet, donc, d'être plus disponibles à entrer en contact avec les composés actifs (**Fertout-Mouri et al., 2016**).

La forte activité antibactérienne des fractions Aceth et n-But est en accord avec sa teneur en Polyphénols.

III.5.1. Résultats des CMB

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0,01% de germes survivants.

Les données relatives à la concentration minimale bactéricide vis à vis les trois souches testées dans cette étude (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) sont présentés dans le Tableau VII.

Tableau VII: Concentration minimale bactéricide (CMB) de chaque échantillon ($\mu\text{g/ml}$) pour chaque souche bactérienne.

Echantillon/souche	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
M-brut	-	-	-
Aceth	1000>CMB>500	125>CMB>62.5	500>CMB>250
n-But	1000>CMB>500	250>CMB>125	500>CMB>250
ATB	250>CMB>125	62,5>CMB>31.25	125>CMB>62.5

D'après Tableau VII les résultats montrent que :

L'extrait M-brut ne présente pas un effet bactéricide avec les concentrations testées sur l'ensemble des souches, ce qui indique qu'il faut tester des concentrations supérieures à 1000 $\mu\text{g/ml}$ pour avoir un effet bactéricide.

La CMB de la fraction Aceth a montré des valeurs d'ordre de : (1000>CMB>500, 125>CMB>62.5 et 500>CMB>250) ; respectivement, vis-à-vis les souches *E.coli*, *S. aureus* et *B. subtilis*. Ce qui indique que cette fraction a un effet bactéricide surtout vis-à-vis *S. aureus*.

La CMB de la fraction n-But a montré des valeurs d'ordre de : (1000>CMB>500, 250>CMB>125, 500>CMB>250) ; respectivement, sur les souches *E.coli*, *S. aureus* et *B. subtilis*. Ce qui indique que cette fraction a un effet bactéricide surtout vis-à-vis *S. aureus*.

L'ATB a montré un effet bactéricide important à des concentrations faibles vis-à-vis la bactérie *S. aureus*, par rapport aux autres souches.

D'après notre investigation bibliographique minutieuse, aucune étude d'activité antimicrobienne n'a été publiée sur les extraits organiques des épines de *Cedrus atlantica manetti*.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

A coté des substances médicamenteuses, les différentes plantes médicinales sont à l'origine de synthèse de substances bioactives, capables d'exercer un effet équivalent à celui des médicaments et ce grâce à la nature chimique de ces constituants majoritaires.

Ce travail nous a permis d'effectuer une analyse phytochimique, d'évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne de différents extraits et fractions des épines du *Cedrus atlantica manetti*.

Les résultats obtenus au cours de nos travaux sur les épines de *Cedrus atlantica manetti* sont :

- ❖ L'extraction brute des composés phénoliques a révélé que l'extraction par soxhlet a donné un meilleur rendement que celui de macération.
- ❖ La teneur en polyphénols en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle que les extraits : A-brut, E-brut et M-brut, et ses fractions (Chl, Aceth ; n-But et Aq) contiennent : **26.37±1.35, 27.66±0.81, 50.58±0.85, 77.08±7.74, 184.75±4.33, 131.08±0.76, 17±8.5 mg EAG/g d'extrait** ; respectivement.
- ❖ La teneur en flavonoïdes des extraits : A-brut, E-brut et M-brut, et ses fractions (Chl, Aceth ; n-But et Aq) est de l'ordre de : **9.6±0.06, 16.47±0.09, 25.79±0.43, 32.23±0.84, 109.27±1.56, 68.92 ±0.84, 0.2±0.04 mgEQ/gE** ; respectivement.
- ❖ La teneur en tanins condensés par la méthode de la vanilline-HCL nous a permis de déduire que les épines de *Cedrus atlantica manetti* extraites par l'acétone, l'éthanol et le méthanol ainsi que fractionnées par différents solvants à savoir le Chl, Aceth, n-But et Aq ont une faible teneur en tannins (**17.86±0.89, 29.77±3.03, 49.77±1.28, 53.22±2.37, 72.39±3.62, 69.05±2.37 et 0.54±0.54 mgEC/g E** ; respectivement).
- ❖ Une relation linéaire a été établie entre l'activité antioxydante des échantillons testés et le contenu en polyphénols et en tanins condensés. Les échantillons les plus riches en polyphénols totaux et en tanins condensés sont les plus actives.
- ❖ L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des épines du *Cedrus atlantica manetti* a été évaluée sur trois bactéries par la méthode de dilution par des microplaques et la méthode d'ensemencement sur un milieu gélosé. Les résultats montrent que les fractions Aceth et n-But ont une meilleure activité sur les souches

testées, par rapport à l'extrait M-brut, on conclut que les fractions Aceth et n-But ont une meilleure activité bactériennes.

En perspective, ces résultats ne constituent qu'une petite partie dans le domaine de la recherche des antioxydants et des antibactériens naturels. Il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- ❖ L'identification des composants antioxydants et antimicrobiens dans les extraits actifs de cette plante.
- ❖ L'étude de la toxicité sur des lignées cellulaires (*in vitro*) et sur des modèles utilisant les animaux (*in vivo*).

*Références
bibliographiques*

A

- **Andrade, D., Gil, C., Brietenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P. (2009).** Bioactive extracts from citrus Iadamifer and Arbutus unedo L. *Industrial corp and products journal*, (30): 165-167.
- **Annie, S., Arun, S., Kuppusamy, R., Issac S.R.O. (2006).** In Vitro Antioxidant Studies on the Benzyl Tetra Isoquinoline Alkaloïde Berberine. *Indian biology and pharmacology bulltin*, 29(9): 1906-1910.
- **Aouni, M., Pelen, F., Soulimani, R. (2013).** Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, 11: 225-236.

B

- **Ba, K., Tine, E., Destain, J., Cisse, N., Thonart, P. (2010).** Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie agronomie société et environnement*, 9 (1) : 131-139.
- **Basli, A., Chibane, M., Madani, K., Oukil, N. (2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Pharmacologie*, 10:2-9.
- **Basli, A., Belkacem, N., Amrani, I. (2017).** Health benefits of phenolic compounds against cancers. *Intech*, P: 194-210.
- **Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996).** The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxydant power, the FRAP assay analytical biochemistry. P: 70-76.
- **Bettaieb Rebey, I., Bourgou S., Saidani T., Fauconnier M.L., Ksouri, R. (2017).** Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante des différents extraits de la Lavande dentée (*Lavanduladentata*). *Journal of new sciences agriculture and biotechnology*, 39(2): 2096 –2105.
- **Biyiti, I.F., Meko'o, D.L., Tamzc, V., Amvam zollo, P.H. (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharmacologie et médecine traditionnelle africaine*, 13 : 11-20.
- **Bruneton, J. (2009).** Acides phénols. In : Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier. Paris : 198-260.
- **Boudjouref, M. (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de doctorat en Biochimie. Université Ferhat Abbas. Sétif. P : 23.
- **Boudy, P. (1950).** Economie forestière Nord- Africaine. Tome 2 Monographie et traitement des essences forestières. Fasc II. Edi : Larousse. Paris : 638.
- **Bourgou,S., Serairi Beji, R., Medini, F., Ksouri, R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of new science agriculture and biotechnology*, 28(12) :1649-1655.

C

- **Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., Anelli, G. (2008).** Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food chemistry*, 110(3):659-669.

D

- **Derridj, A., Cadeac, F., Durrieu, G. (1991).** Etude de la variabilité géographique des dimensions des pollens du cèdre de l'atlas (*Cedrus atlantica* manetti) en Algérie. *Bulletin de la société botanique de France lettres botaniques*, 138(3) : 215-230.
- **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(4): 654-660.
- **Durand, D., Damon, M., Gobert, M. (2013).** Le stress oxydant chez les animaux de rente : Principes généraux. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 48(5) : 218-224.

F

- **Fadel, H., Benayache, F., Benayache, S. (2016).** Antioxidant properties of four Algerian medicinal and aromatic plants *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L. and *Cedrus atlantica* (Manetti ex Endl). *Scholars research library der pharmacia lettre*, 8 (3):72-79.
- **Fekih, N. (2014).** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en Algérie. Thèse de doctorats en Es-Sciences en Chimie. *Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen*. P : 31.
- **Fertout-Mouri, N., Latreche, A., Mehdadi, Z., Bengherraz, Z. (2016).** Antibacterial activity of four extracts of *Teucrium polium* L. of Tessala mount (western Algeria). *Bulletin de la société royale des sciences de liège*, 85 : 253 – 262.
- **Fontanay, S., Mougenot, M.E., Duval, R.E. (2015).** Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*, 5(2) : 109 - 118.

G

- **Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2010).** Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15: 8813-8826.

H

- **Haddouchi, F., Zerhouni, K., Sidi-Yekhelef, A., Chaouche, T. M. (2016).** Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*, 85: 152 – 159.
- **Hadj Salem, J. (2009).** Extraction identification caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria Retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine.

- **Halliwell, B., Whiteman, M. (2004).** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British journal of pharmacology*, 142(2): 231-255.
- **Hamia, C., Guergab, A., Rennane, N.E., Birache, M., Haddad, M., Saidi, M., Yousfi, M. (2014).** Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressium*. *Annales des sciences et technologie*, 6(1) : 33-39.

I

- **Inouye, S. (2003).** Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *International Journal of Aromatherapy*, 13 (2-3) : 95-107.

J

- **Jacques, B., Andre, R. (2004).** Biochimie métabolique. *Ed ellipses. Paris*: 217-219-220-223-225.

K

- **Kaufmann, S. H. E. (1997).** Host response to intracellular pathogens. *New York* : 345.
- **Khoudali, S., Benmessaoud left, D., Essaqui, A., Zertoubi, M., Azzi, M., Benaissa, M. (2014).** Etude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *Journal of materials and environmental science*, 5 (3) : 887-898.
- **Koehlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4) : 167-177.

L

- **Laure, M., Guillou, J. (2016).** *Escherichia coli* revisité, ami ou ennemi. *Revue francophone des laboratoires*, 486: 27-33.
- **Le, K., Chiu, F., Ng, K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food chemistry*, 105: 353-363.

M

- **Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S. (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*). *Lebanese science journal*, 17.
- **Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un complexe de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes*.
- **Martinez-Cayuella, M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*, 77(3) : 147-161.
- **Mhirit, O. (1999).** Le cèdre de l'atlas à travers le réseau Silva méditerranéen «cèdre». Bilan et perspectives. *Forêt méditerranéenne*, 10(3) : 92-99.

- **Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Lüthje, S. (2004).** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry reviews*, 3: 173-193.
- **Molyneux, P., Songklanakarin, J. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of science and technology*, 26(2): 211-219.
- **Mompou, B., Lemanie, B., Surbled, M. (1998).** Extraction des polyphénols du laboratoire à la production industrielle .In : Polyphénols 96. *Edition Inra* : 31-43.
- **Murugan, R., Parimelazhagan, T. (2014).** Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckiaparvifolia* Arn. An in vitro approach. *Journal of King Saud University – Science*, 26: 267-275.

N

- **Naczk, M., Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054: 95-111.
- **Nadjahi, M. (1988).** La croissance et la productivité du cèdre de l'Atlas à Chréa. *Ann rech forest, Algérie*, 2: 23-58.
- **Naimi, F., Bousta, D., Balouiri, M., Meskaoui, A. (2015).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of seeds flavonoids extract of *Cedrus atlantica* Manetti, *Linum usitatissimum* L. and *Ocimum basilicum* L. species. *Journal of applied pharmaceutical science*, 5 (08): 095-099.

O

- **Olabinri, B.M., Adebisi, J.A., Odesomi, O.F., Olabinri, P.F., Adeleke, G.E. (2009).** Experimental classification of the antioxidant capacity of the leaf, stem and root barks of *Magnifera indica* and *Azadirachta indic*. *African journal of biotechnology*, 8 (13): 2968-2972.

P

- **Pincemail, J., Le Goff, C., Charlier, C., Gillion, P., Cheramy-Bien, J.P., Van Honacker, E., Chapelle, J.P., Defraigne, J.O. (2009).** Evaluation biologique du stress oxydant : Application en routine clinique. *Nutrition et endocrinologie spécial antioxidant*, P : 16-31.

Q

- **Quezel, P., Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Ed, Paris*. 2 : 1170.
- **Quy, D.D., Angkawijaya, A.E., Phuong Lan, T.N., Lien H.H., Felycia, E.S., Suryadi, I., Yi-Hsu, J. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22:296-302.

R

- **Rached, W. (2009).** Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Thèse de doctorat. *Université Es-Sénia. Oran.* P : 30 - 45.
- **Re, R., Pelliègrini, N., Posteggente, A. (1999).** Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radicals in biology and medicine*, 26 (9-10): 1231-1237.
- **Reed, J. D. (1995).** Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of animal and science*, 73(5): 1516-1528.
- **Rhafouri, R., Strani, B., Zair, T., Ghanmi, M., Aafi, A., El Omari, M., Bentayeb, A. (2014).** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex carrière seeds essential oil. *Mediterranean journal of chemistry*, 3(5) : 1034-1043.
- **Ribereau-Gayou, P. (1968).** les composés phénoliques des végétaux. *Edition dunod. Paris* : 105-133.
- **Riou-Nivert, P. (2007).** Fiche extraite de la Flore forestière française. région Méditerranéenne. *Forêt-entreprise*, 174(3) : 14-16.

S

- **Salim, S. (2016).** oxydative stress and the central Nervous System. *The Journal of Pharmacologie and Experimental Therapeutique*, 360 (1): 201–205.
- **Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., Nacro, M. (2010).** Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des sciences*, 10 : 24 -32.
- **Soltani, E.K. (2017).** Caractérisation et activités biologiques de substances naturelles, cas de la propolis. Thèse de doctorat en Sciences. *Université ferhat abbas. Setif.* P :1-52.
- **Smith, R. I., Cohen, S. M., Doull, J., Feron, V. J., Googman, J. I., Marnett, L. J., Portoghese, P. S., Waddell, W. J., Wagner, B. M. et al. (2005).** A procedure for the safety evaluation of natural complexes used as ingredients in food : essential oils, *Food chem taxicol*, 43 : 345-363.

T

- **Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., Hilali, A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa L.* (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa L.*). *Journal of materials and environmental science*, 6 (4): 1111-1117.
- **Tang, S.Y., Halliwell, B. (2010).** Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies. *Biochemical and biophysical research communications*, 394: 1-5.
- **Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. (2006).** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating

antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19: 669-675.

- **Toty, A.A., Guessennd, N., Bahi, C., Kra, A.M., Otokore, D.A., Dosso, M. (2013).** Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harunganamadagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*, 82 : 12 – 21.
- **Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2003).** Introduction à la Microbiologie. *Editions du nouveau pédagogique. France.*
- **Toth, J. (1980).** Le cedre dans quelques pays du pourtour mediterraneen et dans deux autres pays a grande importance forestiere. *Foret méditerranéenne*, 8(1) : 23-30.

V

- **Velomalala, N. M., Raherimandimby, M., Ramamonjisoa, D. (2013).** Contribution à l'étude des propriétés biologiques des extraits de feuilles de *senecio faujasioïdes* (Asteraceae). *Journal international de santé au travail*, 1: 33-40.

W

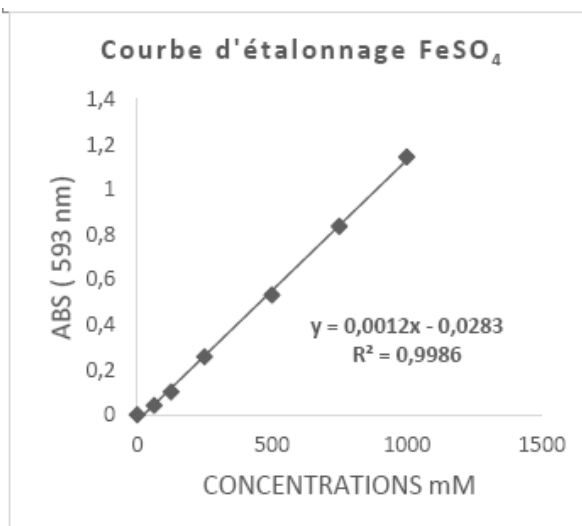
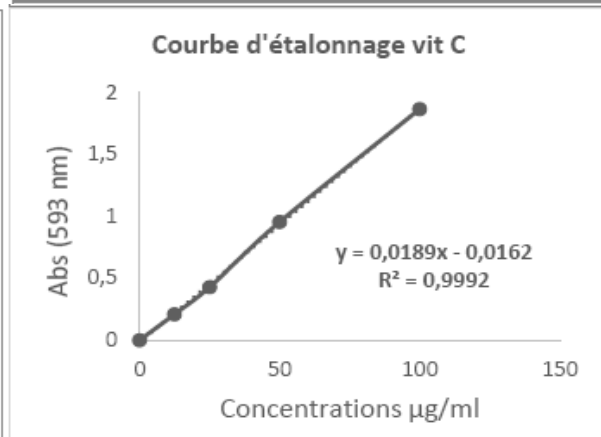
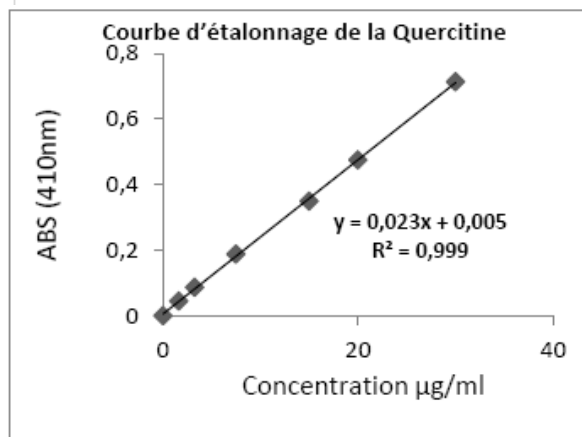
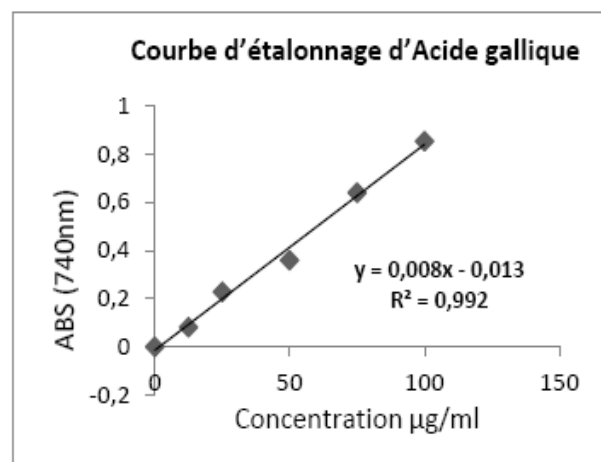
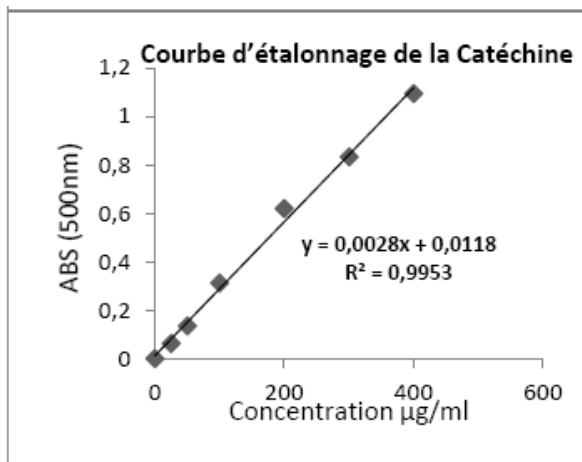
- **Wong, C.C., Li, H.B., Cheng K.W., Chen, F. (2006).** A systematic survey of antioxidantactivity of 30 chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food chemistry*, 97: 705-711.

Z

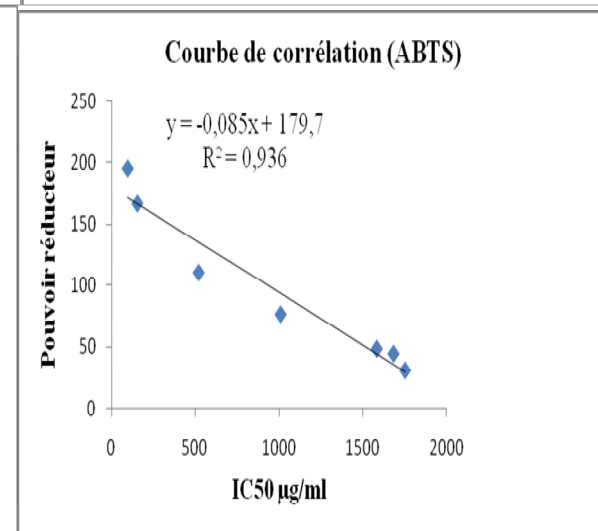
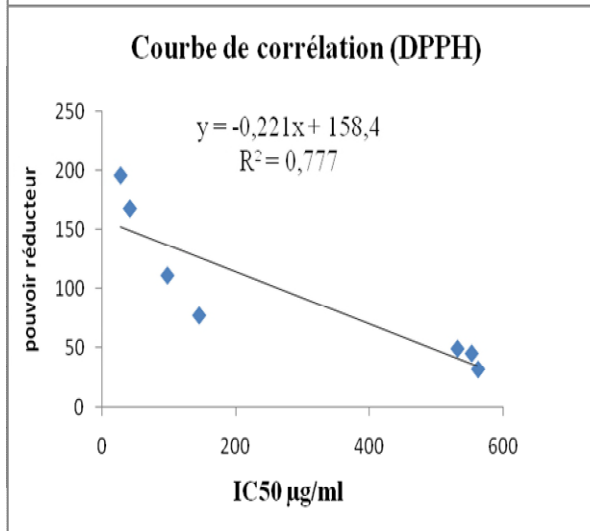
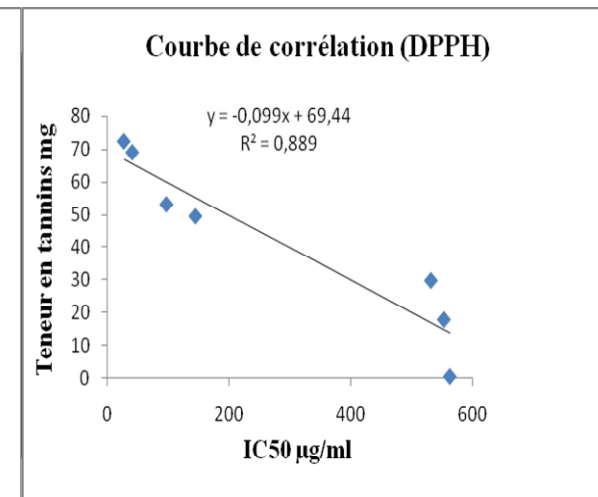
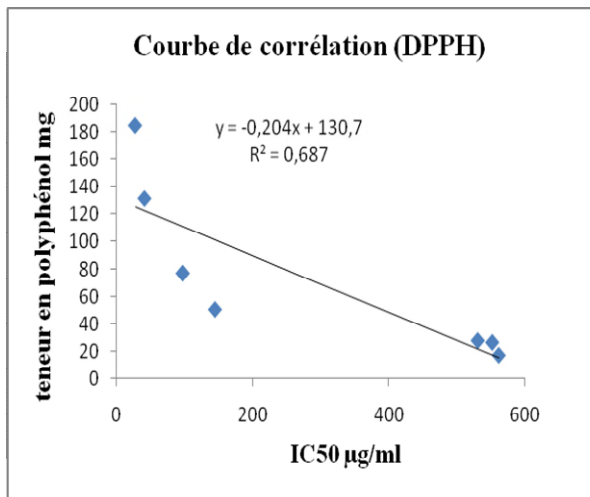
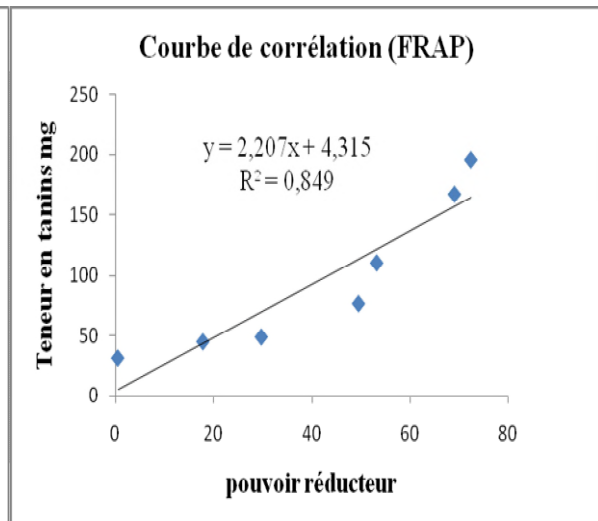
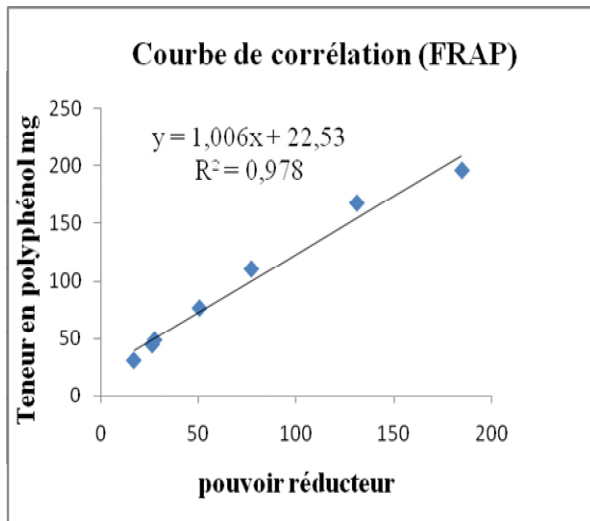
- **Zhang, J., Li, Y., Chen, S.S., Zhang, L., Wang, J., Yang, Y., Zhang, S., Pan, Y., Wang, Y., Yang, L. (2015).** Systems pharmacology dissection of the anti-inflammatory mechanism for the medicinal herb *Folium Eriobotryae*. *International journal of molecular sciences*, 16: 2913-2941.

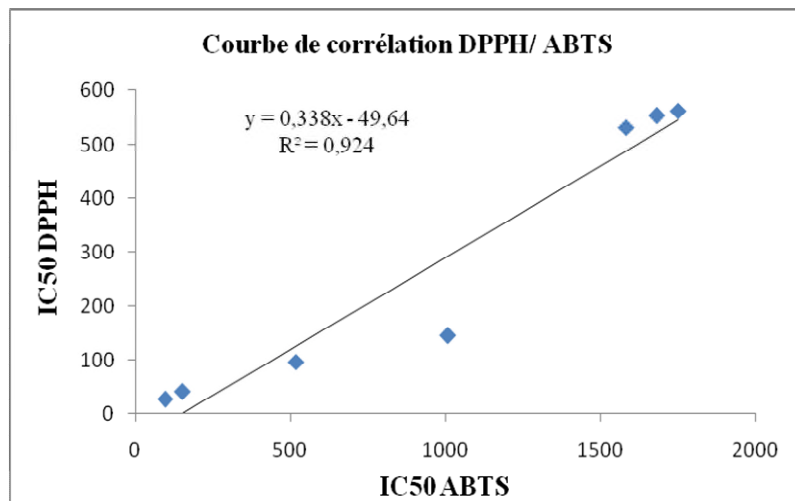
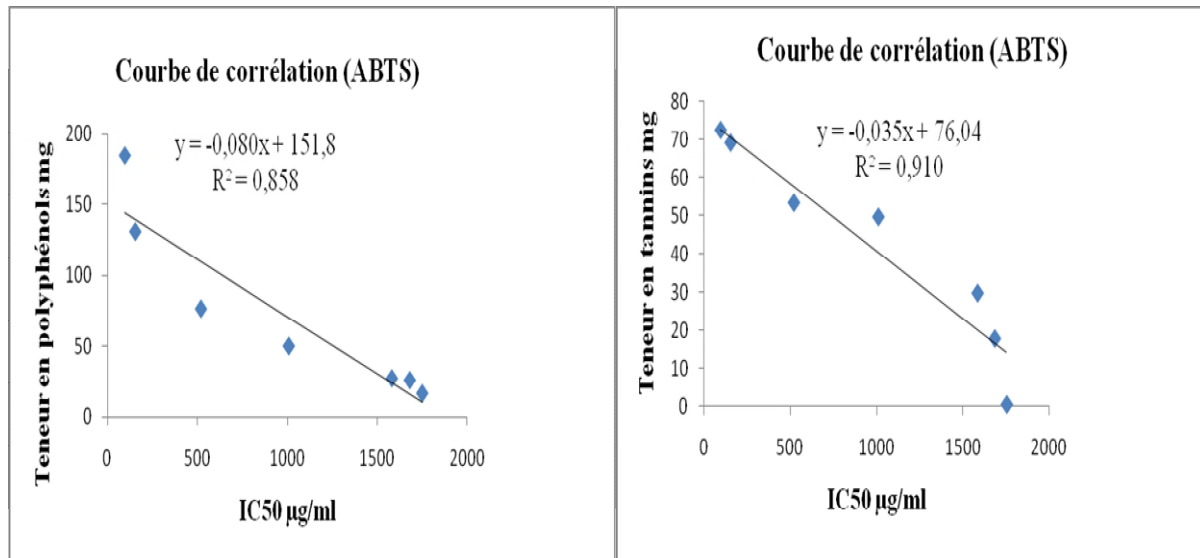
Annexes

Annexe 01 : Les courbes d'étalonnage.



Annexe 02 : Les courbes de corrélation.





Résumé

L'extraction des épines de *Cedrus atlantica manetti* a été réalisée par macération en utilisant l'éthanol et par soxhlet en utilisant l'acétone, l'éthanol et méthanol, l'extrait méthanol brut obtenu a été fractionné par des solvants à polarité croissante à savoir l'hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. La teneur totale en composés phénolique a été déterminée par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode à l' $AlCl_3$. La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode vanilline-HCL.

L'effet antioxydant des sept échantillons testé en utilisant les tests du DPPH^{*}, ABTS^{•+} et FRAP montre que les fractions Acétate d'éthyle et n-butanol ont présenté une bonne activité antioxydante. L'effet de l'activité antibactérienne des épines déterminé par la méthode de microdilution sur microplaques montre que la souche *Staphylococcus aureus* est la plus sensible contrairement aux *Escherichia coli* qui est résistante et *Bacillus subtilis* qui est moyennement sensible vis-à-vis les fractions Acétate d'éthyle et n-butanol, ce qui indique que ces dernières ont une activité antibactérienne.

Mots clés : *Cedrus atlantica manetti*, polyphénol, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

The extraction of the *Cedrus atlantica manetti* spines was carried out by maceration using ethanol and by soxhlet using acetone, ethanol and methanol, the crude methanol extract obtained was fractionated by solvents with increasing polarity. namely hexane, chloroform, ethyl acetate and n-butanol. The total content of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu reagent colorimetric method. Flavonoids were evaluated using the $AlCl_3$ method. The content of condensed tannins was determined by the vanillin-HCL method.

The antioxidant effect of the seven samples tested using the DPPH^{*}, ABTS^{•+} and FRAP tests shows that the fractions Ethyl acetate and n-butanol showed good antioxidant activity.

The effect of the antibacterial activity of the spines determined by the microdilution method on microplates shows that the strain *Staphylococcus aureus* is the most sensitive unlike *Escherichia coli* which is resistant and *Bacillus subtilis* which is moderately sensitive vis-a-vis the fractions Acetate of ethyl and n-butanol, indicating that the latter have antibacterial activity.

Key words: *Cedrus atlantica manetti*, polyphenol, antioxidant activity, antibacterial activity.

المخلص

استخراج أشواك الأرز الأطلسي مانيتي أجريت بالنقع باستعمال الإيثانول والماء. و جهاز سوكسلي باستعمال الأسيتون، الإيثانول والميثانول، تم تقطيع مستخلص الميثانول الخام الذي تم الحصول عليه بواسطة مذيبات ذات قطبية متزايدة، وبالتحديد هكسان، كلوروفورم، أسيتات إيثيل و ن- بوتانول. تم تحديد المحتوى الكلي للمركبات الفينولية بواسطة طريقة قياس الكاشف فولا سيوكالتو. تم تقييم الفلافونويد باستخدام طريقة كلورور الألومنيوم. تم تحديد محتوى التانينات المكتفة باستخدام طريقة فانيليا حمض الهيدروكلوريك.

يوضح التأثير المضاد للأكسدة للعينات السبع المختبرة باستخدام اختبارات DPPH^{*}, FRAP, ABTS^{•+} يظهر أن إيثيل أسيتات و بيوتانول أظهرت فعالية جيدة للأكسدة. يظهر تأثير النشاط المضاد للبكتيريا في أشواك الأرز الأطلسي الذي تحده طريقة على القوالب الدقيقة أن سلالة *Staphylococcus aureus* هي الأكثر حساسية على عكس *Escherichia coli* التي هي مقاومة و *Bacillus subtilis* التي لها حساسية معتدلة تجاه، أسيتات إيثيل و ن- بوتانول ، مشيراً إلى أن هذا الأخير لديه نشاط جيد مضاد للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: الأرز الأطلسي مانيتي ، المركبات الفينولية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، النشاط المضاد للأكسدة.