

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Pharmacologie Moléculaire



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante et de
l'activité antimicrobienne de l'extrait
méthanolique d'une plante médicinale locale**

Présenté par :

AIT BAZIZ Hanane & CHEMALI Aicha

Soutenu le : **20 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M ^{me} Chaher N	MCB	Présidente
M Belkacem N	MAA	Promoteur
M ^{me} Zemouri S	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements :

Nous remercions tout d'abord le bon Dieu, le tout puissant qui nous a donné le pouvoir, le courage et la patience pour élaborer ce mémoire.

Nous tenons à remercier vivement :

Notre promoteur : M BELKACEM, qu'il trouve ici l'expression de notre vive reconnaissance pour sa disponibilité, son aide, ses conseils, ainsi qu'à ses qualités relationnelles et humaines

M^{LLÉ} CHAHER, d'avoir accepté de présider ce jury et d'apporter ses appréciations sur notre travail.

M^{me} ZEMMOURI, qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail

L'ingénieur de laboratoire BPC : M^{LLÉ} TABTI et

La doctorante : M^{LLÉ} SALMI pour leurs aide et soutien

L'ensemble des enseignants qui ont participé de près ou de loi dans notre formation

A la fin, nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à tous ceux qui ont manifesté leur soutien de près ou de loin dans la réalisation de notre travail.

Merci à Tous...

Dédicace :

Nous dédions ce modeste travail à nos chers :

Parents

Frères et sœurs

Amies

Nos collègues

*Et **A** tous ceux que nous aimons.*



Aicha & Hanane

SOMMAIRE

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des figures.....	III
Introduction.....	I

CHAPITRE I : *Synthèse Bibliographique*

I-1-Généralités	3
I-1-1-Taxonomie et description botanique	3
I-1-1-1- Taxonomie.....	3
I-1-1-2- Description botanique.....	4
I-1-2- Historique et aires de répartition.....	4
I-1-2-1- Historique.....	4
I-1-2-2- Aires de répartition.....	5
I-1-3- Analyse phytochimique	6
I-1-4- Usage thérapeutique.....	6
I-2- Activité antioxydante	6
I-2-1- Radicaux libres.....	6
I-2-2- Stress oxydatif	7
I-2-3- Les antioxydants	7
I-2-3-1- Classification et mécanismes d'action	7
I-2-4- Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	9

I-2-4-1- Méthode de réduction des radicaux libres DPPH.....	9
I-2-4-2- Méthode de réduction de radicaux-cation ABTS ^{•+}	9
I-2-4-3- Méthode de réduction des ions ferrique FRAP.....	10
I-2-4-4- Autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	10
I-3- Activité antimicrobienne.....	10
I-3-1- Les micro-organismes.....	10
I-3-2- Les antimicrobiens.....	10
I-3-2-1- Les antibiotiques.....	10
I-3-2-2- Les composés phénoliques.....	11
I-3-3- Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	11
I-3-3-1- Méthode de dilution en milieu liquide.....	11
I-3-3-2- Méthode de diffusion en milieu solide.....	12
I-3-3-3- méthode de diffusion sur disque de cellulose.....	12
I-3-4- Description des microorganismes étudiés.....	12

CHAPITRE II : Matériel et Méthodes

II-1-Matériel.....	14
II-1-1-Matériel végétal.....	14
II-1-2- Matériel biologique.....	14
II-1-3- Appareils et produits chimiques.....	14
II-2- Méthodes	15
II-2-1- Test d'humidité.....	15
II-2-2- Extraction par soxhlet.....	15
II-2-3-Fractionnement de l'extrait méthanolique.....	16
II-2-4- Etude phytochimique.....	17

II-2-4-1-Dosage des polyphénols totaux	17
II-2-4-2-Dosage des flavonoïdes.....	17
II-2-4-3-Dosage des tanins condensés.....	18
II-2-5- Détermination de potentiel antioxydant.....	19
II-2-5-1-Méthode de réduction des radicaux libres DPPH.....	19
II-2-5-2-Méthode de réduction des radicaux-Cation ABTS.....	19
II-2-5-3- Méthode de réduction de l'ion ferrique FRAP.....	21
II-3- Activité antibactérienne.....	22
II-4- Analyse statistique.....	23

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

III-1- Taux d'humidité.....	24
III-2- Rendement d'extraction.....	24
III-3- Etude phytochimique.....	25
III-3-1- Teneur en polyphénols totaux.....	25
III-3-2- Teneur en flavonoïdes	26
III-3-3- Teneur en tanins condensés.....	27
III-4- Evaluation de activité antioxydante.....	28
III-4-1- Activité scavenger du radical DPPH.....	28
III-4-2- Activité scavenger du radical ABTs ^{•+}	30
III-4-3- Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	32
III-5- Activité antimicrobienne.....	34
Conclusion et perspectives	38
Références bibliographiques	40

Annexes

Liste des abréviations

ABTS : Acide 2, 2-azinobis-3-éthylbensothiazoline-6-sulfinique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BHA : Butyle hydroxytoluène

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Dimethyl sulfoxyde

DPPH : 2,2 diphenyl- 1- picrylhydrazyle

EAA : Equivalent en Acide ascorbique

EAG : Equivalent en Acide gallique

EC : Equivalent Catéchine

EQ : Equivalent Quercétine

ERO : Espèces Réactives Oxygénées

FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power

HCL : Acide chlorhydrique

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice de 50% des radicaux libre

K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RL : Radicaux Libres

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

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre	Page
Tableau I	Rendement et caractéristiques de l'extrait méthanolique et ses fractions.	24
Tableau II	Echelle d'estimation de l'activité antibactérienne.	34
Tableau III	Diamètres des zones d'inhibition (mm).	35
Tableau IV	Les différentes concentrations minimales inhibitrices(CMI) en (mg/ml).	36

Liste des figures

N° de la figure	Titre	Page
Figure 01	Air de répartition naturel de <i>C.atlantica</i> .	05
Figure 02	Poudre des tiges de <i>Cedrus atlantica</i> .	14
Figure 03	Photographie de Soxhlet.	15
Figure 04	Protocole de fractionnement par extraction liquide-liquide.	16
Figure 05	Protocole de préparation d'ABTS ^{·+} .	20
Figure 06	Protocole de préparation de la solution FRAP.	21
Figure 07	Taux d'humidité des tiges de <i>C .atlantica</i>	24
Figure 08	Teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et ses fractions.	25
Figure 09	Teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique brut et ses fractions	26
Figure 10	Teneur en tanins condensés de l'extrait méthanolique et ses fractions	27
Figure 11	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des échantillons, BHA et acide ascorbique	28
Figure 12	Valeurs de l'IC ₅₀ des échantillons et des standards (DPPH).	29
Figure 13	Courbe de pourcentage d'inhibition du radical ABTS ^{·+} .	30
Figure 14	Pourcentage d'inhibition de radical ABTS ^{·+} de l'extrait méthanolique des tiges de <i>Cedrus atlantica</i> et ses fractions	31
Figure 15	Valeurs de l'IC ₅₀ des échantillons et des standards (ABTS).	32
Figure 16	Pouvoir réducteur des échantillons comparativement au vit C.	33
Figure 17	Pouvoir réducteur des échantillons et de la vit C comparativement au sulfate de fer.	33
Figure 18	Effet de l'extrait méthanolique des tiges de <i>Cedrus atlantica</i> et ses fractions sur <i>Staphylococcus aureus</i> .	37

Introduction

Introduction :

Depuis longtemps, et malgré le progrès scientifique, la médecine traditionnelle demeure le recours principal des populations afin de traiter leurs problèmes de santé. Selon l'organisation mondiale de la santé, environ 80% des individus dépendent de la médecine traditionnelle dans les soins primaires dans la vie quotidienne (**Ladoh et al., 2014**).

Parmi les plantes médicinales les plus utilisées, *Cedrus atlantica*, qui est une espèce endémique dans les montagnes de l'Afrique du nord, précisément : du Maroc et d'Algérie. L'huile essentielle de cette plante constitue une source immense de substances ayant des propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique et antimicrobienne (**Gabriela et al., 2013**).

Actuellement, l'objet de multiples recherches intenses est la mise en exergue du stress oxydatif et la maîtrise de la résistance bactérienne et des infections, vue de leurs implications dans le développement de multiples pathologies qui posent des problèmes majeur en santé publique. Et cela par la recherche et l'exploitation de nouveaux agents antioxydants et antimicrobiens naturels.

Dans le présent travail, notre étude est axée vers l'évaluation des composés phénoliques, l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait méthanolique des tiges de *Cedrus atlantica* et ses fractions, récoltés dans la région "LAC NOIR" à Adekar, wilaya de Béjaia, en Mai 2016.

Dans le cadre de cette étude, nous avons fixé comme objectifs à atteindre :

- La récolte des tiges de *Cedrus atlantica*.
- L'extraction méthanolique par soxhlet de la poudre de tiges récoltées.
- Le fractionnement de l'extrait méthanolique brut obtenu.
- La caractérisation physico-chimique de l'extrait méthanolique brut et ses fractions.
- L'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'extrait méthanolique brut et ses fractions.

Notre travail a été réalisé dans le laboratoire de biologie physico-chimique, de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université A.Mira, Targua ouzamour, Bejaia.

Ce travail est subdivisé en deux parties :

- La première partie : comprend la synthèse bibliographique et la présentation générale du thème étudié.
- La deuxième partie : concerne les travaux expérimentaux réalisés.

Synthèse

Bibliographie



I-1- Généralités

Le cèdre de l'atlas, Arz el atlas en arabe, Begnoun ou Idkil en berbère est une espèce endémique en Afrique du nord (**TARRIER et DELACRE, 2006**). Ses origines remontent avant le début de notre ère, il a été identifié par le pollen dans le Hoggar (**PONS et QUEZEL, 1958**).

Le genre *Cedrus* est caractérisé par quatre espèces liées aux régions Circum méditerranéennes et d'Himalaya, qui sont selon **FARJON, (1990)** :

- *Cedrus atlantica* (Manetti) : Cèdre de l'Atlas. (Algérie, Maroc)
- *Cedrus libani* (A. Rich) : Cèdre de Liban. (Liban, Syrie, Turquie).
- *Cedrus brevifolia* (F. Hooke) : Cèdre de Chypre. (Chypre).
- *Cedrus deodara* (G. Don) : Cèdre de l'Himalaya.

La longévité du cèdre est très remarquable, elle peut dépasser 1000 ans (**BOUDY, 1950 ; TOH, 1952**). Son optimum écologique se situe entre 1600 et 2000m d'altitude (**ACHHAL et al., 1980**).

I-1-1-Taxonomie et description botanique**I-1-1-1- Taxonomie**

La position taxonomique de *Cedrus atlantica* est comme suit (**MAIRE, 1952 ; QUEZEL et SANTA, 1962 ; DERRIDJ, 1990**) :

Règne : *Plantae*

Classe : *Vectrices*

Embranchement : *Spermaphytes*

Sous-embranchement : *Gymnospermes*

Ordre : *Coniférales*

Sous-ordre : *Abietales*

Famille : *Pinacées*

Genre : *Cedrus*

Espèce : *Cedrus atlantica*

I-1-1-2-Description botanique



La racine: Le système racinaire est développé, mais rarement pivotant et la stabilité de l'arbre est bien assurée (**Boudy,1952**)



L'écorce: Il est de couleur grise, formé de petites écailles lisses qui deviennent crevassées avec l'âge (**Toth, 1981**)



Les fleurs: chaton mâle de forme ovoïde et de couleur jaune orangé, le chaton femelle est plus petit de forme ovoïde et de couleur vert bleuâtre (**M'herit, 2006**)



Les fruits: cylindriques, de 5 à 8 cm de longueur, vert avant la maturité puis brun, à sommet aplati ou déprimé (**Debazak, 1964;Toth, 1971 et Riou-nivert, 2007**)



Les feuilles: groupées en rosettes, 1 à 2 cm de longueur, vertes, persistent trois ans (**M'herit, 2006**)



Les graines: marron-roux, subtriangulaires, longues de 10 à 15mm, tendres, très résineuses, à aile large (**Debazak, 1964; Toth, 1971**)



Le port: conique, pyramidal à l'état jeune, devient tortueux et tabulaire chez les sujets âgés (**Debazak, 1964**).

I-1-2- Historique et aire de répartition

I-1-2-1- Historique

Les analyses polliniques de séquences fossiles réalisées dans la montagne du Hoggar (Algérie), au Sud et au Nord-Ouest de Tunisie, dans le Rif, le moyen Atlas et du haut Atlas oriental (Maroc), montrent la vaste distribution des lointains ancêtres dans la région (**Nadjahi, 1988**). Ces études ont montré que le cèdre de l'atlas a atteint son aire optimale 24000 A.J puis il a régressé à la fin du Pléni-glaciaire supérieur (d'environ 20000 à 15 000 A.J), alors qu'à partir de l'aire Holocène et plus précisément l'Atlantique (8 000 à 4700 A.J), le Cèdre de

l'atlas a cédé la place au chêne vert en basse altitude, et complètement disparu en Tunisie où la majorité des sommets culminent à moins de 1 500 m avant d'occuper l'aire qu'on lui connaît aujourd'hui (Demarteau, 2006).

I-1-2-2- Aires de répartition

❖ **Air naturel**

Le cèdre de l'atlas est une essence caractéristique de l'Afrique du Nord et plus précisément du Maroc et d'Algérie (BOUDY, 1950), sa superficie au Maroc est 132 000 ha (M'hirit, 1994). En Algérie elle occupe une surface d'environ 30 000 ha (Nedjahi, 1988).

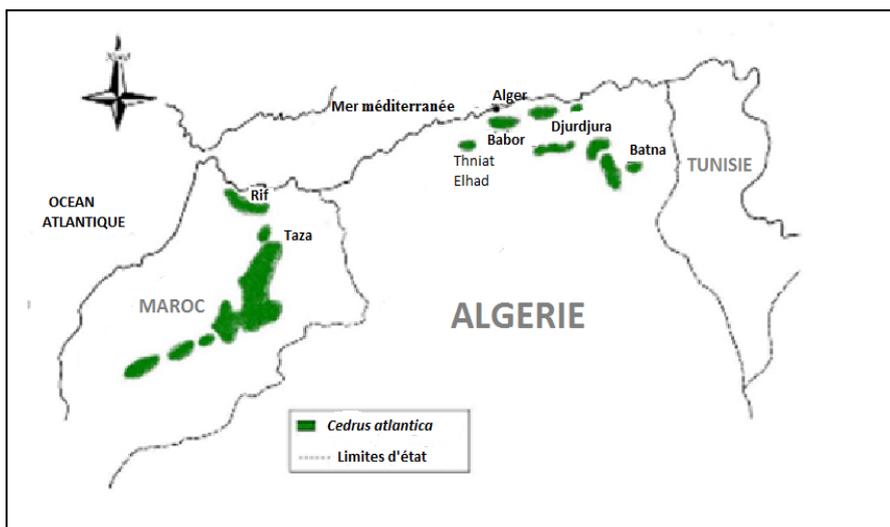


Figure 01 : Air de répartition naturel de C.atlantica (Zemirli, 2006)

❖ **Air d'introduction**

Le cèdre de l'atlas a été employé d'abord comme espèce ornementale et ensuite espèce de reboisement dans les pays circumméditerranéens, les principaux sont: le sud de la France (Toth, 1994), au Portugal (Toth, 2005), en Italie (Brunetti et al., 2000; Andea et Roberto, 1994), en Espagne, les Etats Unis (M'hirit, 1994), la Bulgarie (Delkov et Grozev, 1994), en Hongrie (Csaba, 1994) et en Tunisie (Dahmane et Khoja, 1994; Lasram, 1994).

I-1-3- L'analyse phytochimique

Les constituants chimiques de *Cedrus atlantica* sont regroupés ci-dessous selon **Agrawal, 1984** :

- **Simples Cétones** : En 1902, et pour la première fois la cétone et la cadinene sont isolées par Grimal.
- **Terpenoïdes** : Norin *et* winell (1971) ont reporté que l'extrait d'éther des cônes de *C. atlantica* est composé de cinq acides résiniques déférents qui sont : l'abiétique, le neoabiétique, le dehydroabiétique, le levoperaique et l'acide palustrique.
- **Flavonoïdes** : le bois, l'écorce et les aiguilles de *Cedrus atlantica* contiennent le taxifolin et ses 3'-O-glucoside.
- **Autres** : les *stéroïdes*, plus précisément la *sitostérole* a été identifiée dans les oléorésines des cônes de *C. atlantica*, aussi la cire de *Cèdre de l'atlas* contient *C₃₄ hydrocarbone* et les *pentaconasoles*, ainsi que *l'acide ascorbique* est présent dans les aiguilles.

I-1-4-Usage thérapeutique

L'huile essentielle de *Cedrus atlantica* possède des propriétés anti-inflammatoires (**Sugita *et al.*, 2004**) et antimicrobiens (**Hammer *et al.*, 1999**).

Il est également utile dans le traitement de la perte de cheveux dans une combinaison d'huiles d'aromathérapie (**Ormerod *et al.*, 2000**), aussi la cellulose et ses dérivées extraites de l'écorce sont utilisées dans le traitement des bronchites, de la toux et des indigestions...ect (**Rached, 2009**).

I-2- Activité antioxydante et le stress oxydant**I-2-1- Les radicaux libres**

Le radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et/ou un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe. Les espèces réactive oxygénées (ERO) proviennent de produits dérivés de réactions enzymatiques essentielles, principalement de processus métaboliques endogènes. Leur formation initiale se base sur la réduction d'oxygène moléculaire. Parmi toutes les ERO, on distingue un ensemble restreint de ces composés que nous appelons

radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), le radical peroxyde (ROO^{\bullet}) et le radical alkoxyde (RO^{\bullet}).

Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires tels que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

I-2-2- Stress oxydatif

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives oxygénées (ERO) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (**Haleng et al., 2007**). Il déclenche des pathologies nombreuses comme l'athérosclérose, le cancer, les maladies inflammatoires et l'infertilité masculine (**Saglam et al., 2007; Mancini et al., 2008**).

I-2-3- Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de retarder et d'empêcher l'oxydation des macromolécules principalement les lipides, les protéines et l'ADN. Elles protègent les tissus des dommages causés par l'oxygène et/ou les radicaux libres (**Adil et al., 2007**).

I-2-3-1-Classification et mécanismes d'action

→Système antioxydant enzymatique

- **Superoxyde dismutase SOD** : C'est une métalloprotéine contenant du manganèse, cuivre et de zinc. Elle élimine le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- **Glutathion peroxydase**: soit par la peroxydase GSH-Px : qui consiste à l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le hydroperoxyde lipidique ($ROOH$), en association avec le glutathion pour donner respectivement une molécule d'eau et (ROH), soit par l'enzyme réductase, par la régénération du glutathion réduit (GHS).
- **Catalase** : Transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau.

→Système antioxydant non enzymatique**1- Vitamine C**

La vitamine C est un excellent piègeur des ERO (HO• ou O₂•-). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (**Haleng. J et al 2007**).

2- Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines...etc (**Boizot et Charpentier, 2006**). Les actions protectrices des polyphénols peuvent comprendre :

- Inhibition des E.R.O (¹O₂) ;
- Piégeage des radicaux libres ;
- Chélation des ions métalliques responsables de la production des ERO ;
- Inhibition des enzymes responsables de la production des ERO (**Pokorny et al., 2001, Magalha et al., 2008**)

2-1- Flavonoïdes

L'appellation « Flavonoïde » qui en latin (= flavus) est dû à leur couleur jaune qu'ils engendrent (**Wilson, 1987**), formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones. Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié : plus de 4000 flavonoïdes ont déjà été identifiés (**Harborne, 1989 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**). Les flavonoïdes stabilisent les RL grâce à leur groupement hydroxyles fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques libres au niveau de l'organisme (**Derbel et Ghedira., 2005**).

2-2- Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques. Le terme « tannin » ou « tanin » vient de la source de tanins utilisés pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tanins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes (**Dangles et al., 1992**). Les tanins sont classés en deux groupes majeurs : les tanins hydrolysables, font intervenir des liaisons de type ester entre un groupement phénolique et un groupement hydroxyle des glucides (**Min et Hart., 2003**) ; les

tanins condensés sont des polymères d'unité flavaniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8 ; ils sont résistants à l'hydrolyse (**Bruneton, 1987**).

3- Les caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire (C₄₀H₅₆) avec de nombreuses doubles liaisons (**Haleng, J et al 2007**). Ce sont des piègeurs de l' (¹O₂) et de (LOO[•]), et peuvent également neutraliser les radicaux libres. Le lycopène piège les radicaux libres avec de (¹O₂) dans les tissus rétinien, prévenant la dégénérescence, qui est la première cause de cécité chez la personne âgée (**Landrum et al., 1997; Blumberg, 2007**).

I-2-4- Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes ont été développées pour tester la capacité de piégeage d'un radical libre et l'activité antioxydante totale d'un extrait de plante (**Oszmianski et al., 2007**). Parmi ces méthodes :

I-2-4-1-Méthode de réduction de radical DPPH

Le composé chimique 2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation en solution provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm (**Popovici et al., 2009**) En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl-1- picrylhydrazyle) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl -1- picryl hydrazine de couleur jaune (**Maataoui et al., 2006**)

I-2-4-2- Méthode de réduction du radical-cation ABTS^{•+}

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cationique ABTS^{•+} qui présente un spectre d'absorption dans le visible à 734 nm (**Belkheiri , 2010**). En réagissant avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), l'ABTS forme le radical ABTS^{•+}, de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. Cette dernière est proportionnelle à la concentration en antioxydants (**Lien et al., 1999**).

I-2-4-3- Méthode de réduction de l'ion ferrique FRAP

Cette méthode est fondée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique dans le complexe (Fe^{3+} -TPTZ) en fer ferreux (Fe^{2+}) par les antioxydants qui donne la couleur bleue pour le complexe produit (Fe^{2+} -TPTZ). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité réductrice d'électron caractéristique de l'action antioxydante des polyphénols (Yildirim *et al.*, 2001).

I-2-4-4- Autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

- **Test de blanchissement de β carotène.**
- **ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity.**

I-3- Activité antimicrobienne

Les antibiotiques et l'hygiène n'ont pas fait disparaître la pathologie infectieuse. La fréquence et le pronostic de certaines ont changé. Mais des nouvelles pathologies infectieuses existent (Avril *et al.*, 1992). Face à ces besoins, de nouveaux composés chimiques doivent donc être identifiés et la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques évolue (Boughachiche., 2012).

I-3-1- Les micro-organismes

Un microbe ou micro-organisme est un organisme vivant autonome, généralement unicellulaire, invisible à l'œil nu. Les protozoaires, les champignons microscopiques, les bactéries et les virus sont des microbes (Prigent-Combaret et lejeune., 1999). Appelés protistes, divisés en deux grandes catégories selon leur structure cellulaire : les protistes supérieurs ou eucaryotes et les protistes inférieurs ou procaryotes (Salbonière, 2006).

I-3-2- Les antimicrobiens**I-3-2-1- Les antibiotiques**

Du grec anti, "contre" et bios, "vie", les antibiotiques sont des composés chimiques ayant la propriété de tuer ou d'empêcher la prolifération des micro-organismes pathogènes. Certains sont des substances produites naturellement par les moisissures et bactéries (Salbonière, 2006).

I-3-2-2- Les composés phénoliques

La phytothérapie est l'art de se soigner par les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (**Sofowora, 2010**).

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques notamment l'activité antimicrobienne (**Middleton et al., 2000; Ksouri et al., 2007**).

Pour ces composés, il semble que la présence de 2 groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité. Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5 hydroxy-isoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp* (**Chen et al., 2012**). Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux : le cycle B jouerait un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques inhibant ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN des microorganismes, ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (**Wu et al., 2013**). Certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2, 4,2'-trihydroxy-5'-méthylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH cytochrome c réductase (**Cushnie et al., 2005**).

I-3-3- Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la CMI. Elle correspond à la concentration minimale qui inhibe la croissance visible du germe en 24h.

Parmi les méthodes applicables dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne : la dilution en milieu liquide (croissance bactérienne appréciée par l'apparition d'un trouble) ; la diffusion sur disque de cellulose (bandelettes imprégnées d'un gradient d'antibiotique) (**Burnichon et al., 2003**).

I-3-3-1- Méthode de dilution en milieu liquide

En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble. On distribue dans un premier temps, pour la macrodilution, dans une



série de tube à hémolyses stériles ou pour la microdilution dans les cupules d'une plaque, sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotique puis on ajoute dans chacun des tubes ou cupules sous un même volume, une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance. La CMI de l'antibiotique sur la souche étudiée est définie comme la plus faible concentration inhibant, après 18 à 24 heures de contact à 37°C, toute croissance visible à l'œil nu (Ndoye, 1993).

I-3-3-2- Méthode de diffusion en milieu solide

Cette méthode consiste à la diffusion d'un antibiotique dans des puits de 6 mm de diamètre et 3 mm de profondeur avec un puit témoin, creusés dans des boîtes de pétri contenant le milieu Muller Hinton, après avoir étéensemencées par une suspension bactérienne. Ensuite une incubation à 37°C est faite pendant 18 à 24h. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (Menasria, 2014).

I-3-3-3- Méthode de diffusion sur disque de cellulose

Cette méthode est la plus connue et la plus utilisée, elle consiste en l'ensemencement sur un milieu gélosé, dans une boîte de Pétri, d'une suspension bactérienne. La substance à tester est ensuite imprégnée sur des disques de cellulose, eux-mêmes déposés sur la boîte de pétri avec un disque imprégné d'un solvant qui servira comme témoin négatif. Durant l'incubation, la substance est alors censée diffuser dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse) ce qui crée un gradient de concentration dépendant de la substance. L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure de la zone de clarification en mm tout autour des disques (Fontanay, 2015).

I-3-4- Description des microorganismes étudiés

- ***Bacillus cereus***

Bacillus cereus est une bactérie sporulée, aéro-anaérobie facultative et thermorésistante. Ces caractéristiques lui confèrent une résistance particulière à l'action des bactéricides, aux désinfectants, aux radiations et au cycle froid (Cadel six *et al.*, 2010).

- ***Escherichia coli***

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal (Kaper *et al.*, 2004), non sporulé, aérobie facultative, généralement mobile grâce



aux flagelles (**Steven et al., 2004**). Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales (**Patrick et al., 1988**).

- ***Klebsiella pneumoniae***

Les bactéries appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, anaérobies facultatifs et appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae (**El Fertas-Aissani et al., 2012 ; Srinivasan et al., 2012**).

- ***Listeria innocua***

L. innocua est un bacille à Gram positif, non sporulée se présentant sous forme de bâtonnets réguliers. Elle est mobile par des flagelles lorsqu'elle est cultivée entre 20 et 25°C, et immobile ou très faiblement mobile à 37°C. Elle est capable de se développer en atmosphère aérobie ou anaérobie (**Seeliger et Jones, 1987**).

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Ce sont des bacilles Gram négatif (-), de forme non sporulée, aérobie, mobile grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (**Percival, 2004**). Elle est responsable de 10 % de l'ensembles des infections nosocomiales, occupant le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses (**Richard et al., 1995**).

- ***Staphylococcus aureus* :**

Ce sont des cocci à Gram positif très fréquent chez l'homme à l'état commensal ou pathogène. Ils sont immobile, non sporulé et ne possédant pas de capsule visible au microscope optique. Ils se présentent de façons isolée, en diplocoques ou groupés en amas (**Ferrone, 1983 ; Flandrois, 1997**).

Matériel

&

Méthodes



II-1- Matériel**II-1-1-Matériel végétal**

L'espèce végétale étudiée est le Cèdre de l'atlas "*Cedrus atlantica*", les différents essais sont effectués sur les tiges qui sont récoltées dans la région d'ADEKAR "LAC NOIR", au mois de Mai 2016.

Les tiges sont séchées à l'ombre et à température ambiante pendant une dizaine de jours, broyées à l'aide d'un



Figure 02 : Poudre des tiges de *Cedrus atlantica*

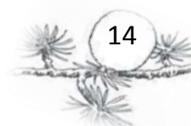
broyeur électrique (SAYONA, CG-333, Italie). La poudre végétale obtenue est tamisée par un tamis de 250µm de diamètre (Retsch, Allemagne), puis conservée dans un endroit sec et à l'abri de la lumière, puis à l'étuve à 37°C, pendant 48 heures.

II-1-2- Matériel biologique

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des tiges de *Cedrus atlantica* et de ses différentes fractions a été évaluée sur six souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC), Il s'agit de trois bactéries Gram + (*Bacillus cereus* ATCC 10876 ; *Listeria innocua* ATCC 74915 ; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et trois bactéries Gram – (*E. coli* ATCC 25922 ; *Klesiella pneumoniae* ATCC 700603 ; *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 27853). Les souches sont fournies par le laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

II-1-3- Appareils et produits chimiques

Les appareils et les produits chimiques utilisés dans la présente étude dont l'objectif est l'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'extrait méthanolique des tiges de *C. atlantica* et de ses fractions sont reportés dans les annexes (*Annexe 01*).



II-2- Méthodes**II-2-1- Test d'humidité**

La teneur en eau est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale (**Doymaz et al., 2004**). La méthode utilisée est la dessiccation par évaporation dans une étuve ventilée (BINDER, Allemagne) à température de $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, jusqu'à obtention d'un poids constant (**Audigie et al., 1978**). Le pourcentage de la teneur en eau est calculé selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{P1-P2}{P1} \times 100$$

H% : le pourcentage de la teneur en eau.

P1 : la masse de l'échantillon avant dessiccation.

P2 : la masse de l'échantillon après dessiccation.

II-2-2- Extraction par le soxhlet

Une extraction solide liquide sous Soxhlet (Reihenheizgerät 4, Allemagne) a été effectuée en utilisant 150 ml de méthanol comme solvant d'extraction et 21g de la matière première végétale, à une température de 60°C . Après six heures d'extraction, l'extrait méthanolique est récupéré, séché à l'aide d'un rotavapeur (Heidolph) puis à l'étuve à 40°C pendant 48heures pour compléter le séchage.



Figure 03 : Photographie de Soxhlet

L'extrait obtenu est conservé dans des tubes recouverts par le papier aluminium afin d'éviter la photo-oxydation, à 4°C jusqu'à l'utilisation. Le rendement de l'extrait est calculé par la formule suivante.

$$R\% = \frac{M}{M_0} \times 100$$

R%: Rendement exprimé en pourcentage

M : Masse en gramme de l'extrait résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal traité

II-2-3- Fractionnement de l'extrait méthanolique

Le protocole utilisé est inspiré des travaux de **Rached, (2008)**. Une masse de 3g de l'extrait brut méthanolique sont repris dans 150ml de méthanol 5%, avec une agitation magnétique pendant 30 min à 37°C pour solubiliser les composés phénoliques.

Dans une ampoule à décanter, le mélange subit une extraction liquide-liquide par différents solvants de polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol). Après la décantation, les fractions obtenues sont filtrées et séchées à l'aide d'un évaporateur rotatif puis elles ont été mises dans l'étuve à 40°C pendant 48h. Le protocole de fractionnement est résumé dans la figure 03.

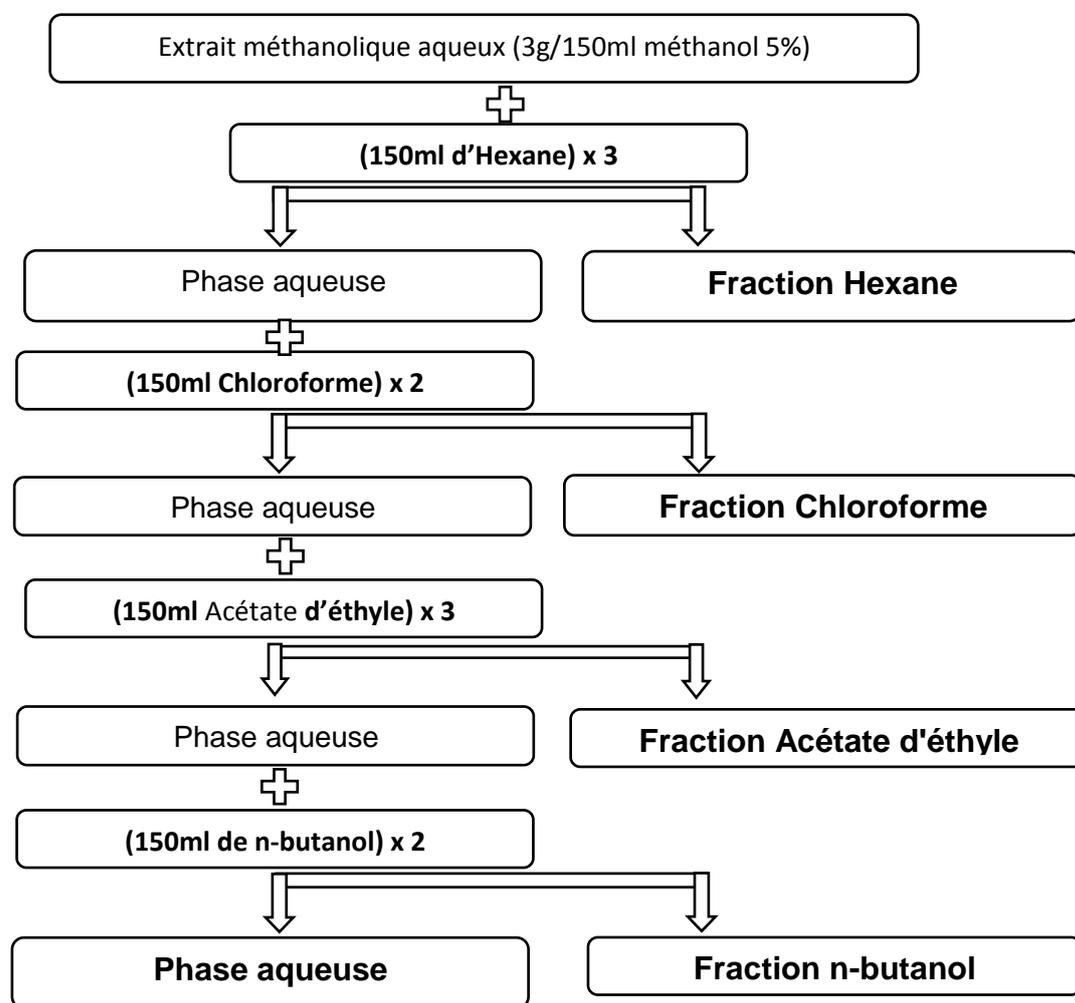


Figure 04 : Protocole de fractionnement par extraction liquide-liquide

II-2-4- Etude phytochimique**II-2-4-1- Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Wong *et al.*, 2006). Ce dernier oxyde les phénols en ions phénolates et transformé en un complexe molybdotungstique. L'absorbance est proportionnelle à la quantité des phénols présents (Ribéreau-Gayon, 1968).

• Mode opératoire

- Après séchage de l'extrait méthanolique pur et les différentes fractions obtenus lors de l'extraction, les extraits secs sont récupérés dans le méthanol.
- 200 µl d'extrait (100µg/ml) est mélangé avec 1ml de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué dans l'eau distillée.
- Après 5min d'incubation 800µl de Na₂CO₃ (75g/l dans l'eau distillée) sont ajoutés.
- Le mélange réactionnel est incubé pendant 1h à l'obscurité.
- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.
- L'absorbance est lue à 765 nm contre le blanc (Méthanol + Folin-Ciocalteu + Na₂CO₃).

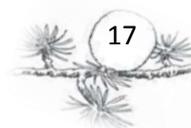
Les quantités des polyphénols totaux sont exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g) à partir d'une courbe d'étalonnage préalablement réalisée avec des concentrations précises d'acide gallique (25-100µg/ml), comme standard, dans les mêmes conditions opératoires.

II-2-4-2- Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique et ses différentes fractions a été déterminée selon la méthode du trichlorure d'aluminium décrite par (Djeridane *et al.*, 2006) et (Boudiaf, 2006).

• Mode opératoire

- 1ml de chlorure d'aluminium AlCl₃ (2% dans l'éthanol) est ajouté à 1ml d'extrait (1mg/ml)
- Agitation vigoureuse par l'utilisation de vortex
- Incubation à température ambiante pendant 10 min à l'abri de la lumière
- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.



- L'absorbance est lue au spectrophotomètre (BIOTECH, UK) à 430 nm contre un blanc (1ml éthanol + 1ml AlCl₃) préparé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

La teneur en flavonoïdes est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage linéaire obtenue avec différentes concentrations (1,625-30µg/ml) de la Quercétine utilisée comme standard. La teneur en flavonoïde est exprimée en milligramme d'équivalent de Quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g) (SABA *et al.*, 2011).

II-2-4-3- Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide, cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide chlorhydrique pour produire un complexe coloré mesuré à 500nm, la quantité des tanins est estimée en utilisant la méthode de la vanilline décrite par **Ba *et al.*, (2010)**

• Mode opératoire

- 500 µl de l'échantillon à concentration de 1mg/ml pour l'extrait méthanolique pur et les fractions chloroformique et aqueuse, et 50µg/ml pour la fraction Acétate d'éthyle et la fraction butanolique.
- 3ml de vanilline 4% (dissous dans le méthanol) et 1,5 ml d'acide chlorhydrique (HCL) à 37% sont ajoutés successivement.
- Agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex (VELP, F20500420, Italie)
- Le mélange obtenu est laissé réagir à l'obscurité pendant 15 min
- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon
- L'absorbance est mesurée à 500 nm contre un blanc (500µl éthanol+ 3ml méthanol+1,5 HCL)

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-2-5- Détermination de potentiel antioxydant**II-2-5-1- Méthode de réduction des radicaux libres DPPH**

Le protocole employé dans cette méthode est celui de **Annie *et al.*, (2006)**

• Mode opératoire

- Préparation de la solution DPPH (0,1mM DPPH dissous dans le méthanol)
- Des concentrations de 6.25 - 100 µg /ml ont été préparées pour l'extrait méthanolique pur, les différentes fractions, Acide ascorbique et BHA
 - ✓ 1ml d'échantillon
 - ✓ 1ml de DPPH a été ajouté au mélange
 - ✓ Agitation vigoureuse avec un vortex
 - ✓ Incubation dans l'obscurité pendant 30 min
 - ✓ L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 517 nm
 - ✓ Trois essais sont réalisés.

Dans les mêmes conditions opératoires le contrôle et les blancs ont été préparés avec :

Contrôle : 1ml de méthanol + 1ml de DPPH

Les blancs : 1ml de méthanol + 1ml d'extrait ou BHA ou Acide ascorbique

Le pourcentage de réduction du radical DPPH est calculé selon la formule suivante :

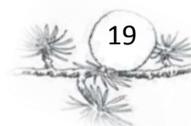
$$\% \text{scavenging de radical DPPH} = \frac{Ac - AE}{Ac} \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle.

AE : Absorbance de l'échantillon (Absorbance du test « échantillon + DPPH » - Absorbance du blanc du test « échantillon + méthanol »).

II-2-5-2- Méthode de réduction de radicaux-cation ABTS

La méthode de détermination de l'activité scavenger du radical ABTS rapportée par **Le *et al.*, (2007)** a été employée.



• **Mode opératoire**

- La solution ABTS^{•+} a été préparée selon **Re, (1999)**

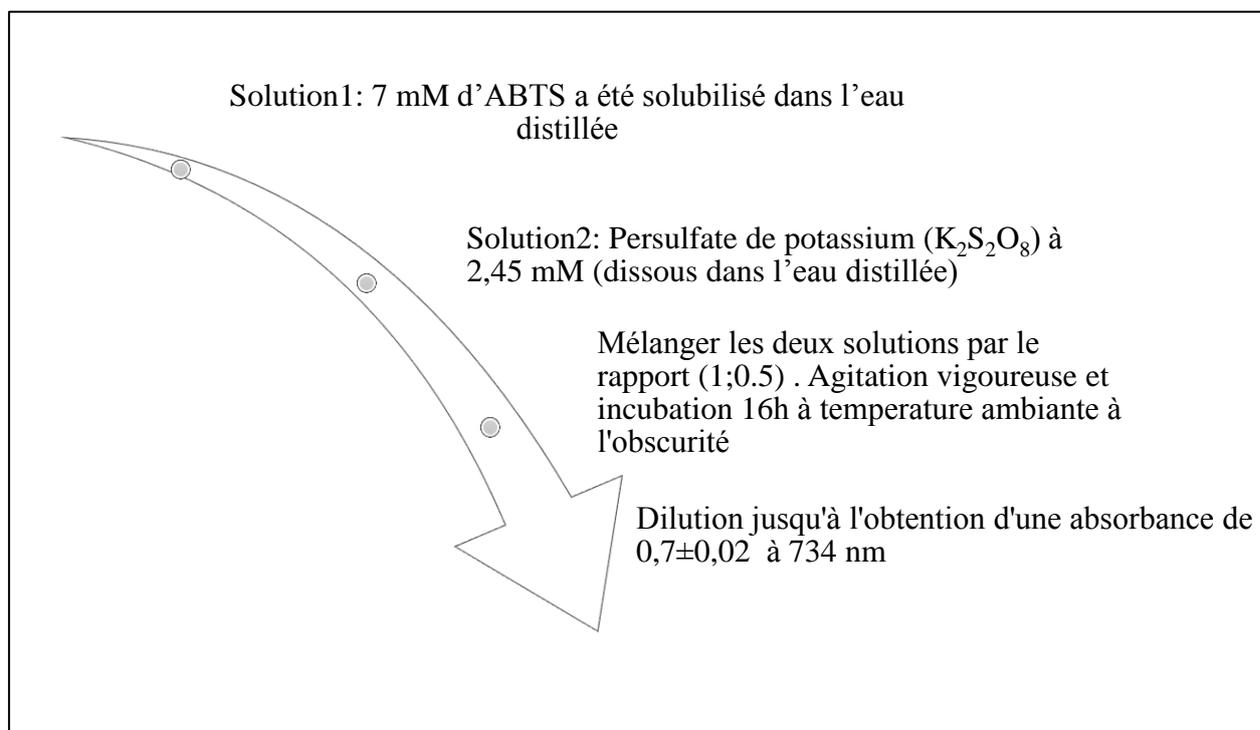


Figure 05 : Protocole de préparation de ABTS^{•+} (**Re , 1999**)

- 1,9ml d'ABTS^{•+} est ajouté à 100µl d'échantillon (12.5-200µg/ml)
- Agitation vigoureuse par un vortex
- Incubation à température ambiante pendant 7 min à l'abri de la lumière
- Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon
- L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 734 nm contre un blanc (1,9ml méthanol + 100µl d'extrait) et un contrôle (1.9ml ABTS^{•+} + 100µl 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
- Les résultats sont exprimés en pourcentage selon l'équation suivante :

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

Ac : Absorbance du contrôle.

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

II-2-5-3- Méthode de réduction du fer FRAP (Ferric reducing – antioxidant power)

La méthode utilisée pour la mesure de la puissance des substances des extraits à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺ est la méthode de FRAP décrite par *Thaipong et al.,(2006)*.

• **Préparation de la solution FRAP**

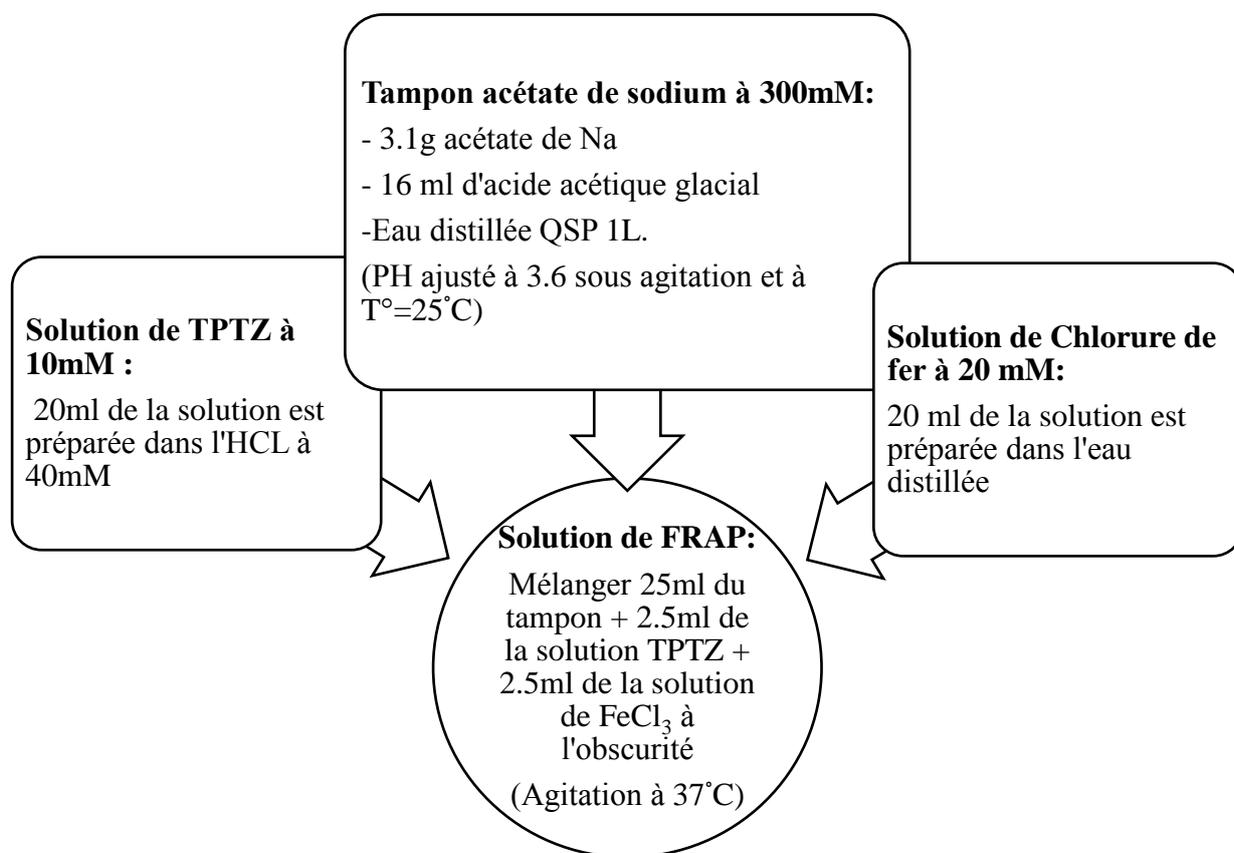


Figure 06 : protocole de préparation de la solution FRAP (*Benzie et al., 1996*).

• **Mode opératoire**

- 150 µl de l'échantillon est ajouté à 2850 µl de la solution FRAP fraîchement préparée
- Incubation du mélange à 37°C pendant 30minutes à l'obscurité
- La lecture est faite à $\lambda = 593nm$
- 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)

- Pareillement, le persulfate de fer (FeSO_4) 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 $\mu\text{M/ml}$.**
- Les résultats sont exprimés par milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de l'échantillon (mg EAA/gE), et par micromole équivalent de FeSO_4 par gramme d'échantillon (mM E FeSO_4 /gE)
- Pour toute l'expérimentation, chaque essai a été réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne des trois essais.

II-3- Activité antibactérienne

Dans cette partie nous cherchons des composés antibactériens dans l'extrait méthanolique des tiges de *Cedrus atlantica* et dans ses fractions selon la méthode de diffusion sur disque.

- **Préparation de milieu de culture**

Le milieu utilisé pour le maintien des souches et l'étude de la sensibilité bactérienne aux extraits testés est le milieu Mueller Hinton, standardisé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Le milieu Muller Hinton Agar est préparé comme suit : Dissoudre 38g de la gélose Muller-Hinton dans 1L d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri, après refroidissement de milieu.

- **Préparation des échantillons**

L'extrait méthanolique pur et ses fractions (chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol, et la fraction aqueuse) ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) puis filtré à l'aide d'un filtre stérilisant 0,2 μm de diamètre pour préparer cinq concentrations avec des dilutions 1/2, sachant que la concentration de la solution mère de chaque échantillon est 60 $\mu\text{g/ml}$.

- **Préparation de l'inoculum**

- **Préparation des cultures jeunes**

Des colonies isolées des prés-cultures ont été repiquées dans des boîtes de pétri contenant le milieu Muller Hinton, incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries.

- **Préparation des suspensions microbiennes**

A partir des cultures jeunes, prélever quelques colonies bien isolées et identifiées sur le milieu de culture, puis les décharger dans des tubes de 10 ml de NaCl (0,9%) stérile. La suspension microbienne est bien agitée, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

- **Dépôt des disques**

Des disques de papier-filtre Wattman stériles de 6 millimètres de diamètre sont imprégnés par cinq concentrations croissantes pour chaque échantillon à raison de 18µl, avec des disques imprégnés de DMSO utilisés comme témoins négatif.

A l'aide d'une pince stérile les disques sont déposés aseptiquement à la surface du milieu ensemencé. Les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

- **Lecture des résultats**

Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition d'une zone circulaire transparente autour de disque correspondant à l'absence de la croissance. L'activité antibactérienne a été déterminée à l'aide d'un pied à coulisse mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (**Choi et al., 2006**). Les tests sont répétés trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

II-4- Analyse statistique :

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± écart type. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel R. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour $p < 0,05$ dans l'ensemble des analyses statistiques en utilisant l'ANOVA.

Résultats

&

Discussion



III-1- Taux d'humidité

Le taux d'humidité (H %) et de la matière sèche (Ms %) des tiges de *Cedrus atlantica* sont calculés et rapportés dans la figure 03.

Au regard des résultats obtenus, on peut constater que la poudre sèche représente la majorité du poids (91,41 %) avec un taux d'humidité de $8,59 \pm 1,09$ %, ce qui permis à notre poudre une bonne conservation. Selon **Paris et Movse., (1965)**, la teneur en eau doit être inférieure à 10 %.

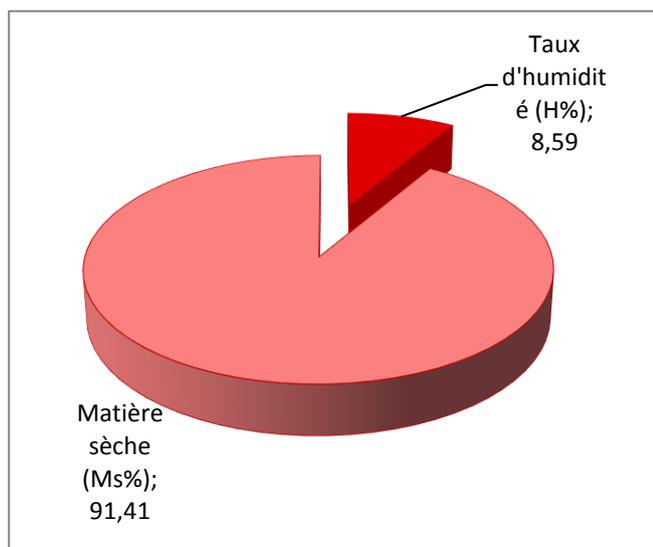


Figure 07 : Taux d'humidité des tiges de *C. atlantica*.

III-2- Rendement d'extraction

Le tableau 01 résume les résultats de rendement de l'extrait méthanolique obtenus par l'extraction réalisée à l'aide d'un Soxhlet et ses fractions exprimées en pourcentage (%) ; par rapport au poids de la poudre des tiges de *Cedrus atlantica* et l'extrait méthanolique M-Brut, ainsi les caractéristiques de chacun.

Tableau I : Rendement et caractéristiques de l'extrait méthanolique Brut et ses fractions.

Echantillon	Aspect	Couleur	Rendement %	
			m = 21g (poudre sèche)	m = 3g (extrait sec)
<i>M-Brut</i>	Grumeleux	marron	18.7 ± 3.22	-
<i>Hex</i>	Huileux	verdâtre	2.06 ± 0.9	14.44 ± 6.27
<i>CHL</i>	Poudre	vert foncé	0.55 ± 0.03	3.88 ± 0.19
<i>Aceth</i>	Poudre	marron roux	1.27 ± 0.07	8.89 ± 0.5
<i>n-but</i>	Poudre	rouge sang	5 ± 0.25	35 ± 1.75
<i>AQ</i>	Visqueux	marron caramel	5 ± 0.75	35.05 ± 5.24

Les résultats de rendement de l'extrait méthanolique et ses fractions exprimés par rapport au poids de la poudre des tiges de *Cedrus atlantica*, relèvent un pourcentage plus élevé pour la fraction butanolique et la fraction aqueuse qui est de l'ordre de 5 ± 0.25 et 5 ± 0.75 %, respectivement ; suivi par la fraction hexanique et la fraction acétate d'éthyle avec un rendement de 2.06 ± 0.9 et 1.27 ± 0.07 %, respectivement ; puis la fraction chloroformique qui a entraîné de faible quantité de molécules végétales et cela pour un rendement de 0.55 ± 0.03 %. Cependant l'extrait méthanolique a donné un rendement de 18.7 ± 3.22 %, plus important par rapport à l'étude de **Fadel *et al.*, (2016)**, réalisée par macération avec l'éthanol 70 % qui est de l'ordre de **9.8** %. 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**). Mais également on peut attribuer cette variation du rendement à l'origine géographique de la plante, les facteurs climatiques et la partie de la plante étudiée (**Smith *et al.*, 2005**).

III-3- Etude phytochimique

III-3-1- Teneur en polyphénols totaux

La quantité des polyphénols correspondant à l'extrait méthanolique Brut et ses fractions a été rapportée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'échantillon qui est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage d'acide gallique (**Annexe 02**), ayant l'équation :

$Abs = 0,008 [AG] - 0,013$; $R^2 = 0,992$. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 06.

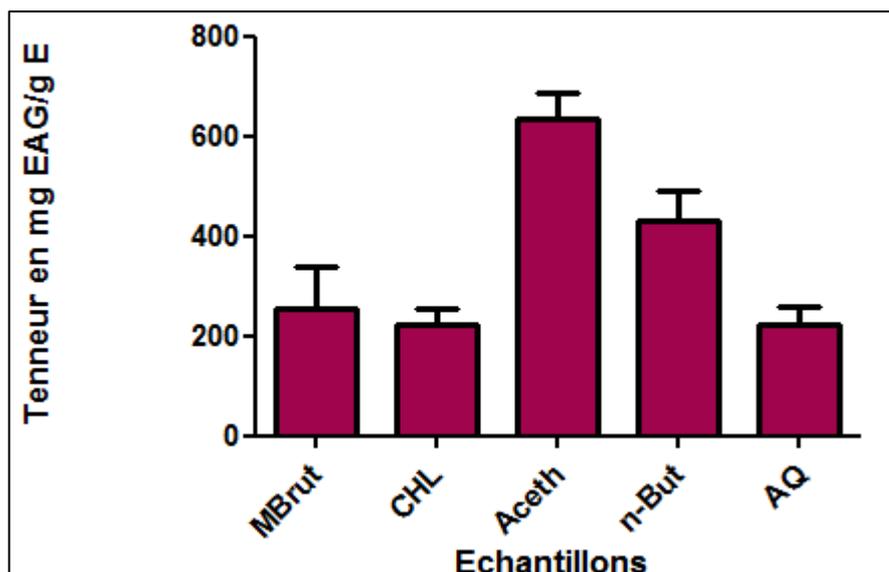


Figure 08 : Teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique brut et ses fractions.

Les résultats montrent que le contenu phénolique dans l'extrait méthanolique brut, la fraction CHL, Aceth, n-But, et AQ sont de l'ordre de 256.25 ± 81.52 ; 223.75 ± 29.48 ; 636.25 ± 49.88 ; 432.50 ± 59.49 et 221.25 ± 39.37 mgEAG/gE, respectivement. La quantité des polyphénols est clairement abondante dans la fraction acétate d'éthyle suivi par la fraction butanolique. Tandis que l'extrait M-Brut, la fraction chloroformique et la fraction aqueuse révèlent une faible quantité de polyphénols.

III-3-2- Teneur en flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes constituent la classe des polyphénols la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (**Gomez-caravaca et al., 2006**).

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine, ayant l'équation : $Abs = 0,023 [Q] + 0,005$; $R^2=0,999$. Les résultats du dosage des flavonoïdes sont représentés dans la figure 07.

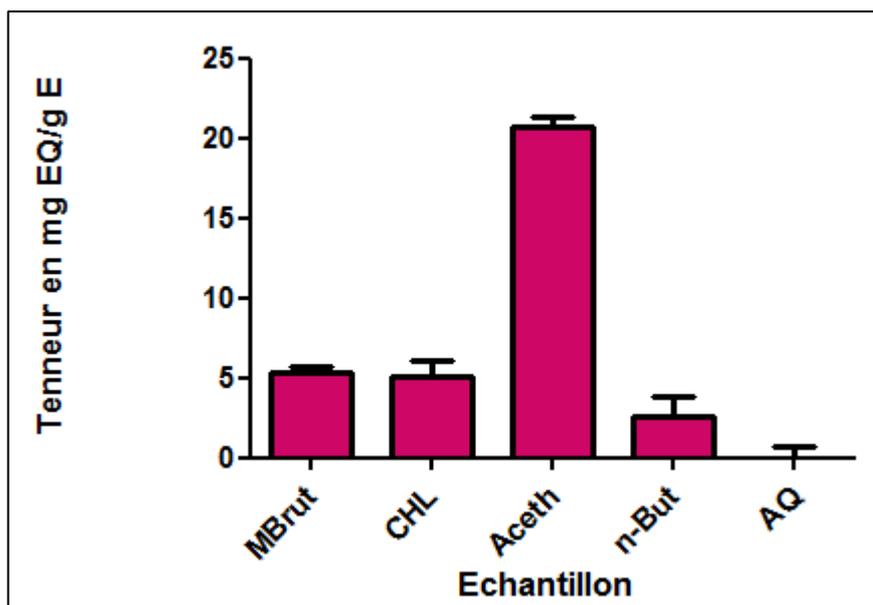


Figure 09 : Teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique Brut et ses fractions.

Les teneurs en flavonoïdes de l'extrait méthanolique Brut, la fraction CHL, Aceth, n-But, et AQ sont de l'ordre de : 5.27 ± 0.38 ; 5.11 ± 0.96 ; 20.75 ± 0.58 ; 2.60 ± 1.2 et 1.88 ± 0.65 mgEQ/gE. On constate d'après les résultats obtenus, une nette différence de la teneur en flavonoïdes. En effet la fraction acétate d'éthyle a extrait une quantité plus élevée par rapport aux autres échantillons. La quantité des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique Brut est inférieure à celle trouvée par **Fadel et al., (2016)**, une étude réalisé par macération avec l'éthanol 70% qui est de l'ordre $16 \mu\text{g EQ/mgE}$. Néanmoins, ces teneurs sont très faibles par rapport aux teneurs en polyphénols totaux.

III-3-3- Teneur en tanins condensés

Les résultats ont été rapportés en mg équivalent de la catéchine par gramme d'échantillon et déterminés par une courbe d'étalonnage de la catéchine (**Annexe 02**), ayant l'équation : $\text{Abs} = 0,002 [\text{C}] + 0,011$; $R^2 = 0,995$. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 08.

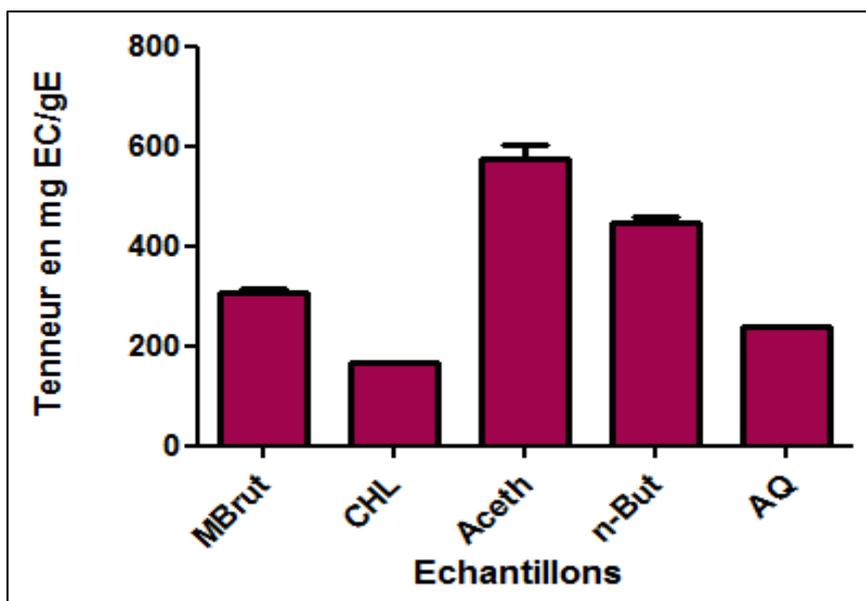


Figure 10 : Teneur en tanins condensés de l'extrait méthanolique brut et ses fractions.

Les teneurs en tanins condensés dans l'extrait méthanolique brut, la fraction CHL, Aceth, n-But, et AQ sont de l'ordre de 308 ± 4.71 ; 165.5 ± 1.03 ; 574 ± 27.86 ; 445 ± 15.51 ; 238 ± 1.03 mgEC/g E, respectivement. Les résultats de dosage des tanins condensés révèlent que la fraction acétate d'éthyle et la fraction butanolique sont très riches en tanins, suivi par l'extrait M-Brut, la fraction aqueuse et la fraction chloroformique.

III-4- Evaluation de l'activité antioxydante

III-4-1- Activité Scavenger du radical DPPH

La méthode de radical DPPH scavenger est très utilisée dans l'évaluation de la capacité des extraits de plantes à réduire l'effet des substances oxydantes (**Gabriela *et al.*, 2013**).

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Cedrus atlantica* et ses fractions est faite comparativement à l'acide ascorbique et la BHA qui sont des antioxydants synthétiques. Les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons et des standards sont illustrés dans la figure 09.

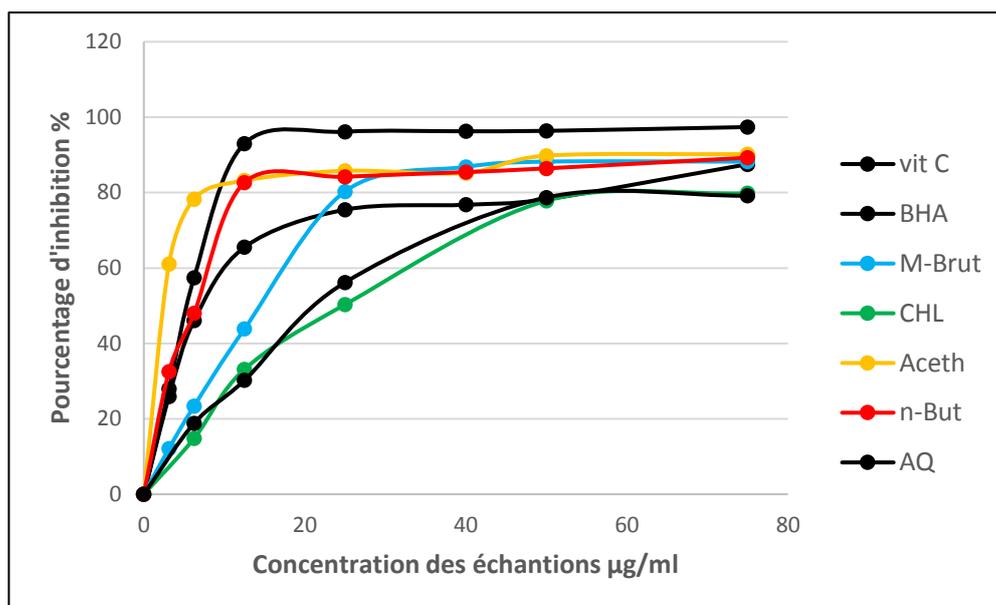


Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des échantillons, BHA et acide ascorbique.

On remarque que l'activité antiradicalaire des échantillons évolue avec l'augmentation des concentrations et que le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à atteindre un plateau. Le pourcentage d'inhibition maximal du radical DPPH par la vit C, BHA, l'extrait méthanolique brut et ses fractions CHL, Aceth, n-But et AQ est de : $97,38 \pm 0,45$ % ; $87,52$ % ; $88,20$ % ; $79,85 \pm 6,73$ % ; $90,19 \pm 0,05$ % ; $89,26 \pm 0,05$ % et $79,17 \pm 0,37$ %, respectivement, ce qui indique que la vit C est la plus efficace. Ces résultats montrent aussi l'efficacité de nos échantillons comparativement aux standards à réduire le radical DPPH. Le pourcentage d'inhibition 50%, déduit à partir des courbes des pourcentages d'inhibition des standards et des échantillons, en utilisant le logiciel GraphPad Prism (version 7.03), est un important paramètre pour l'évaluation de l'activité antioxydante; plus cette valeur est plus faible, l'activité antioxydante est plus puissante.

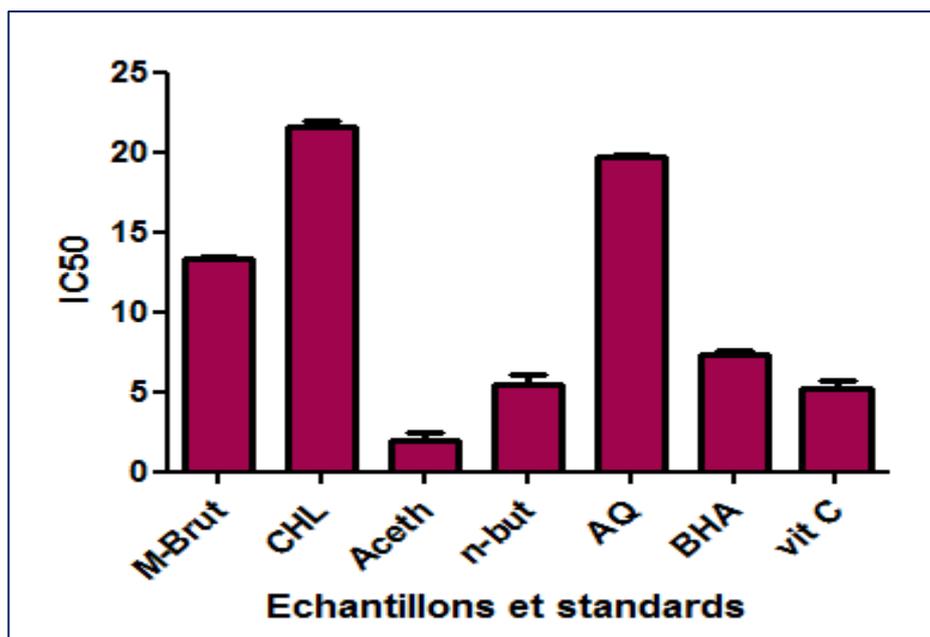


Figure 12 : Valeurs de l'IC₅₀ des échantillons et des standards (DPPH).

D'après la figure 10, la vitamine C et la BHA, qui sont des antioxydants puissants, ont un IC₅₀ de 5.41 ± 0.63 et 7.34 ± 0.26 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Les IC₅₀ de l'extrait méthanolique brut et ses fractions (CHL, Aceth, n-But, AQ), sont de l'ordre de 13.36 ± 0.15 ; 21.61 ± 1.22 ; 1.98 ± 0.52 ; 5.41 ± 0.63 et 19.77 ± 0.02 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. L'IC₅₀ de la fraction acétate d'éthyle est nettement inférieure à celle des standards testés, ce qui indique que cette fraction de l'extrait méthanolique de *Cedrus atlantica* a une activité scavenger du radical DPPH très puissante. 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 $87,87 \pm 0.17$ obtenu à la concentration de 2mg/ml. Ces valeurs, montre que l'extrait méthanolique des tiges est le plus efficace.

La courbe de corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et les IC₅₀ des échantillons (M-Brut, CHL, Aceth, n-But et AQ) (**annexe 03**) montre un coefficient de corrélation $R^2 = 0.84$, et celle entre la teneur en tanins condensés (très abondants dans les échantillons) et les IC₅₀ des échantillons montre un $R^2 = 0.96$. Cette forte corrélation indique que la puissance de l'activité anti-radical DPPH de nos échantillons est due aux polyphénols totaux, plus précisément aux tanins condensés.

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

L'activité antioxydante est évaluée selon la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) .Au cours de ce test, l'acide d'ABTS perd un électron pour former un radical cation ABTS^{•+} de couleur bleue, et qui se décolore en présence d'une substance antioxydante pour donner la forme réduite : cation ABTS⁺ (Muanda, 2010).

La courbe d'étalonnage (Figure 11) obtenue par le Trolox traduit le pourcentage d'inhibition de ce dernier en fonction des concentrations allant de **0.031 à 0.4mM**.

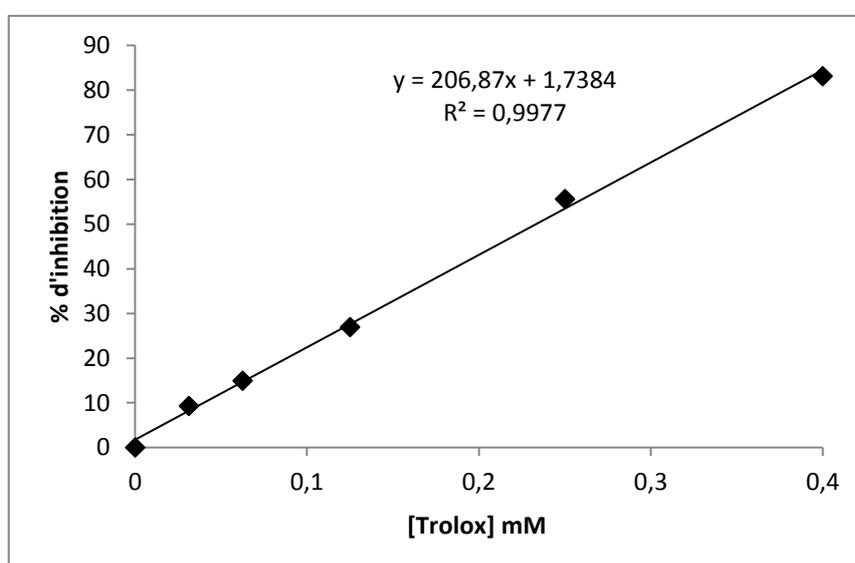


Figure 13 : Courbe de pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} .

D'après la figure 12, on remarque que l'activité antiradicalaire des échantillons évolue avec l'augmentation des concentrations et que le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à atteindre un plateau.

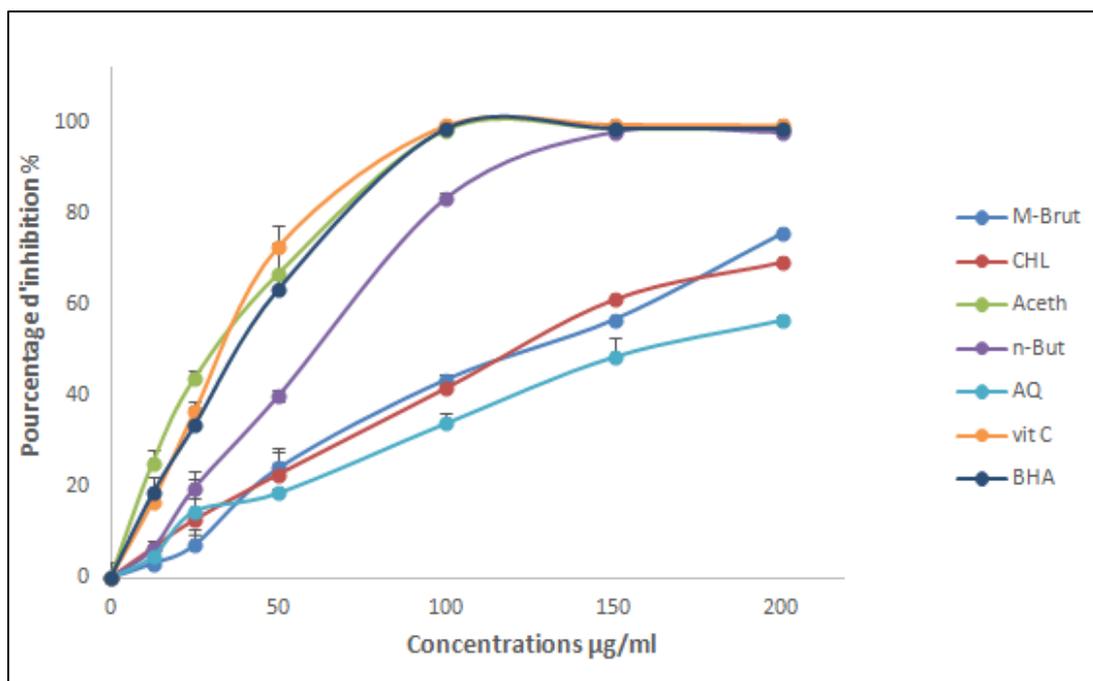


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de radical $ABTS^+$ de l'extrait méthanolique des tiges de *Cedrus atlantica* et ses fractions

Le pourcentage d'inhibition maximal du radical $ABTS^+$ par la vit C, BHA, l'extrait méthanolique brut et ses fractions CHL, Aceth, n-But et AQ est de : $99,32 \pm 0,58$; $98,80$; $75,58$; $69,25$; $98,38$; $97,73$ et $56,44$ %, respectivement. Ces pourcentages correspondent à $0,51$, $0,51$, $0,35$, $0,31$, $0,51$, $0,50$ et $0,25$ mM équivalent Trolox, respectivement. Cela indique que la vit C est la plus efficace. Ces résultats montrent aussi l'efficacité de nos échantillons comparativement aux standards à réduire le radical $ABTS^+$. Les IC_{50} obtenus avec la vit C, BHA, l'extrait méthanolique brut et les fractions : CHL, Aceth, n-But et AQ est de l'ordre de $32,60 \pm 0,7$; $35,47 \pm 1,07$; $121,34 \pm 2,37$; $120,49 \pm 0,77$; $30,15$; $56,77 \pm 3,21$ et $166,29 \pm 19,97$, respectivement. L'étude réalisée par **Sourabh, J., (2014)** sur l'extrait aqueux du bois du *Cedrus deodara* a donné un IC_{50} de $87,76 \mu\text{g/mL}$ plus élevée que celle de l'extrait méthanolique des tiges du *Cedrus atlantica*. Cela est dû à la différence d'espèce ainsi que la nature du solvant. D'après ces résultats, on remarque que la fraction Aceth possède l'activité la plus puissante. La figure 13 résume les IC_{50} obtenues pour chaque échantillon :

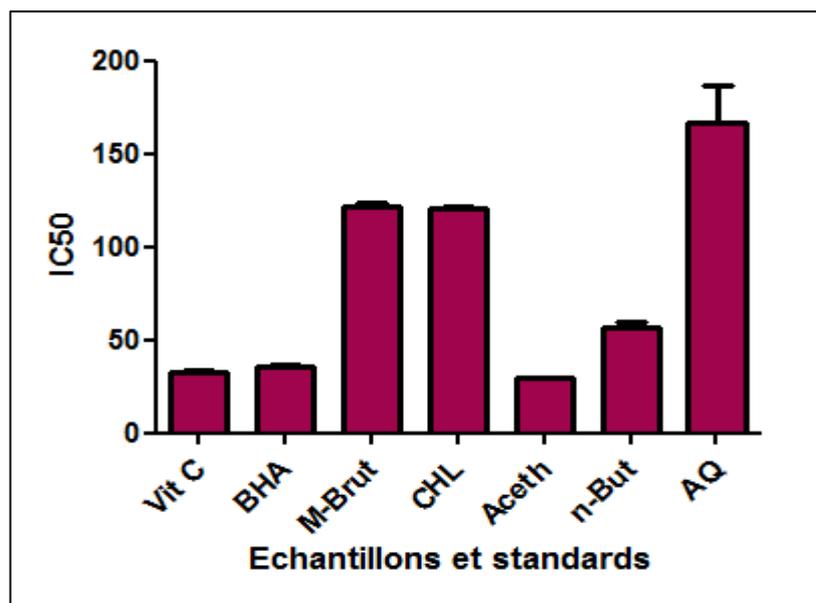


Figure 15 : Valeur des IC₅₀ des échantillons et des standards (ABTS).

La courbe de corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et les IC₅₀ des échantillons (M-Brut, CHL, Aceth, n-But et AQ) (**annexe 03**), montre un coefficient de corrélation $R^2 = 0,86$; et celle entre la teneur en tanins condensés et les IC₅₀ des échantillons montre un $R^2 = 0,78$. Cette corrélation indique que la puissance de l'activité anti-radical 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)

Le test FRAP est plus répondeu pour déterminer la capacité antioxydante des extraits végétaux à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} (**Bouchreit-Otmani et al., 2014**). 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 composées réducteurs (antioxydants) dans nos échantillons sont exprimés en mg EAA/g E et en mM EFeSO₄/gE illustrés dans les figures 14 et 15, respectivement. L'extrait méthanolique brut et ses fractions (CHL, Aceth, n-But et AQ) ont un équivalent d'acide ascorbique de l'ordre de : 412.84 ± 7.13 ; 171.25 ± 2.19 ; 828.36 ± 7.05 ; 606.14 ± 24.1 et 239.22 ± 2.74 mg E d'AA par gramme d'échantillon, respectivement ; et de

6300.556±89.3 ; 2656.778±74.80 ; 12845±70.5 ; 9345± 60.32 ; 3666.94±57.62 mM EFeSO₄/gE, respectivement ; et de 17861.39±39.21 mM EFeSO₄/g pour l'acide ascorbique. D'après ces résultats, la vitamine C est la plus efficace, la fraction acétate d'éthyle montre un pouvoir réducteur le plus important par rapport aux autre fractions.

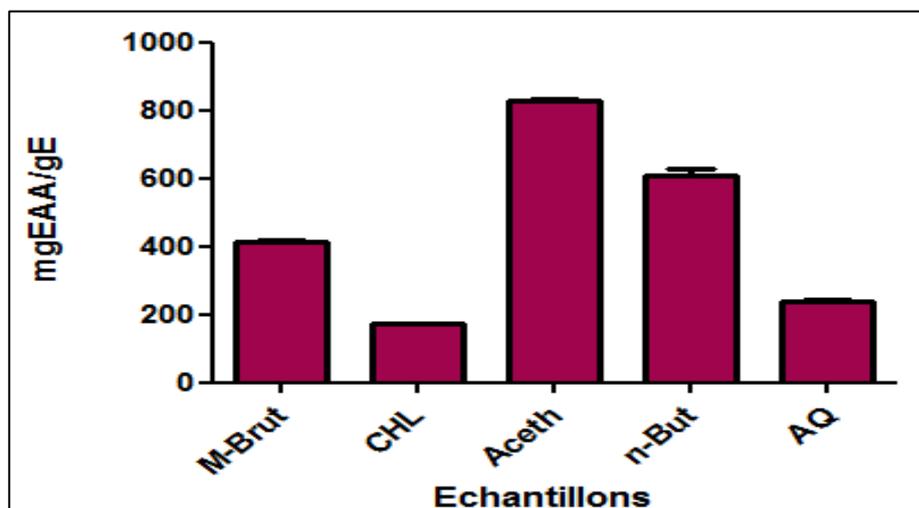


Figure 16 : Le pouvoir réducteur des échantillons comparativement à la vit C.

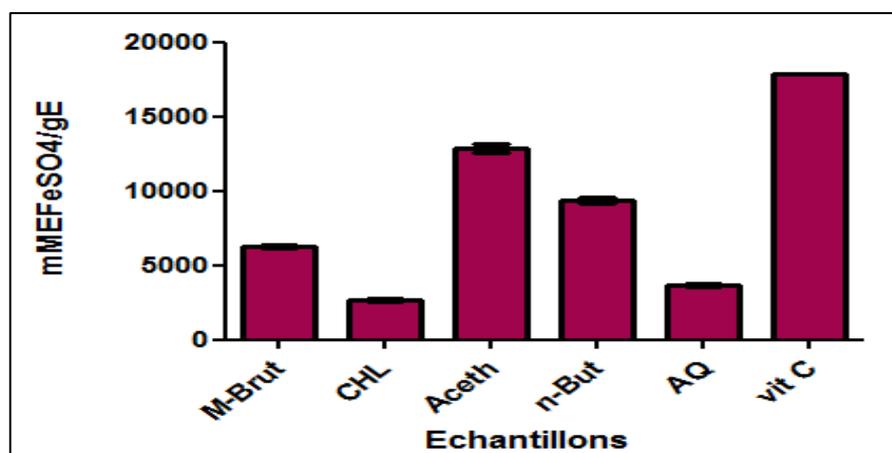


Figure 17 : Le pouvoir réducteur des échantillons et du vit C comparativement au sulfate de fer.

La courbe de corrélation tracée entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur des échantillons (M-Brut, CHL, Aceth, n-But et AQ) (**annexe 03**), montre un coefficient de corrélation $R^2 = 0.93$, et celle entre la teneur en tanins condensés et le pouvoir réducteur des échantillons montre un $R^2 = 0.99$. Cette forte corrélation indique que la puissance de l'activité antioxydante des composants de l'extrait méthanolique des tiges de *Cedrus atlantica*, qui se concentrent essentiellement dans la fraction acétate d'éthyle et n-Butanol, est due essentiellement aux polyphénols totaux, et plus précisément aux tanins

condensés. Ces résultats confirment ceux obtenus avec le test scavenger de radical DPPH et de radical ABTS^{•+}.

III-5- Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des tiges de *C. atlantica* et ses fractions a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque, en se référant à l'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par **Ponce et al., (2003)** (Tableau II).

Tableau II : L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne.

Activité antimicrobienne	Degré de sensibilité	Le diamètre de la zone d'inhibition
Extrêmement sensible	+++	Plus de 20mm
Très sensible	++	15mm à 19mm
Sensible	+	8 mm à 14mm
Non sensible	-	Moins de 8 mm

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau III. On note que la fraction chloroformique n'a pas pu inhiber la croissance de toutes les souches testées même à la plus grande concentration. Les zones d'inhibitions mesurées exhibent que le *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible à la fraction acétate d'éthyle, très sensible à la fraction butanolique, sensible à l'extrait méthanolique brut et à la fraction aqueuse. Alors que, *Escherichia coli* est résistante à l'extrait M-Brut et la fraction chloroformique. Des résultats similaires ont été trouvés par **Gabriella et al. (2013)**, pour l'huile des cônes de *C. atlantica*. *E.coli* est très sensible à l'acétate d'éthyle, sensible à la fraction butanolique et aqueuse.

Les résultats de la présente étude montrent une sensibilité comparable de *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*, qui sont des bacilles Gram négatif, aux extraits testés. Elles sont résistantes à la fraction aqueuse, l'acétate d'éthyle et butanolique à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui est résistant à la fraction butanolique uniquement.

Le DMSO a été testé comme contrôle négatif, les résultats montrent que le solvant ne présente aucun effet sur la croissance des souches bactériennes.



Tableau III : Diamètres des zones d'inhibition (mm).

Echantillon	Concentration mg/ml	Souches testées					
		1	3	4	5	7	8
M-Brut	60	13	7	6	11,5	7	6
	30	9,5	6	6	10	6	6
	15	7,5	6	6	9	6	6
	7,5	6	6	6	6	6	6
	3,75	6	6	6	6	6	6
CHL	60	6	6	6	6	6	6
	30	6	6	6	6	6	6
	15	6	6	6	6	6	6
	7,5	6	6	6	6	6	6
	3,75	6	6	6	6	6	6
Aceth	60	25	9	19	12	10	9
	30	16	6,5	16	8	9	7,5
	15	12	6	13,5	6	7	6
	7,5	10	6	8	6	6	6
	3,75	8	6	6	6	6	6
n-But	60	19	13	14	6	13,5	6
	30	12	8	11	6	12	6
	15	10	7	9,5	6	9,5	6
	7,5	8	6	7,5	6	7	6
	3,75	6	6	6	6	6	6
AQ	60	11,5	12	14	8	8	13
	30	9	10	11,5	6	6	11
	15	7	6	10	6	6	9
	7,5	6	6	8	6	6	7,5
	3,75	6	6	6	6	6	6

1 : *Staphylococcus aureus* ; **3 :** *Klebsiella pneumoniae* ; **4 :** *Escherichia coli* ; **5 :** *Listeria innocua* ; **7:** *Bacillus cereus* ; **8 :** *Pseudomonas aeruginosa*.

- DETERMINATION DE LA CMI

Le tableau IV résume les concentrations minimales inhibitrices. D'après ces résultats, on constate que la fraction acétate d'éthyle possède une activité antibactérienne importante par rapport aux autres fractions, surtout vis-à-vis du *Staphylococcus aureus*, avec une concentration minimale inhibitrice qui est de 3,75 mg/ml. La figure 16 illustre l'effet de l'extrait méthanolique des tiges de *Cedrus atlantica* et ses fractions sur *Staphylococcus aureus*. Cette activité est due à la quantité élevée en polyphénols dans les échantillons obtenus par les tiges de *Cedrus atlantica*.

Tableau IV : Les différentes concentrations minimales inhibitrices (CMI) en (mg/ml).

	1	3	4	5	7	8
Méthanol brut	15	60	//	15	60	//
CHL	//	//	//	//	//	//
Aceth	3,75	30	7,5	30	7,5	30
n-but	7,5	15	7,5	//	7,5	//
AQ	15	30	7,5	60	60	7,5

1 : *Staphylococcus aureus* ; 3 : *Klebsiella pneumoniae* ; 4 : *Escherichia coli* ;
5 : *Listeria innocua* ; 7 : *Bacillus cereus* ; 8 : *Pseudomonas aeruginosa*.



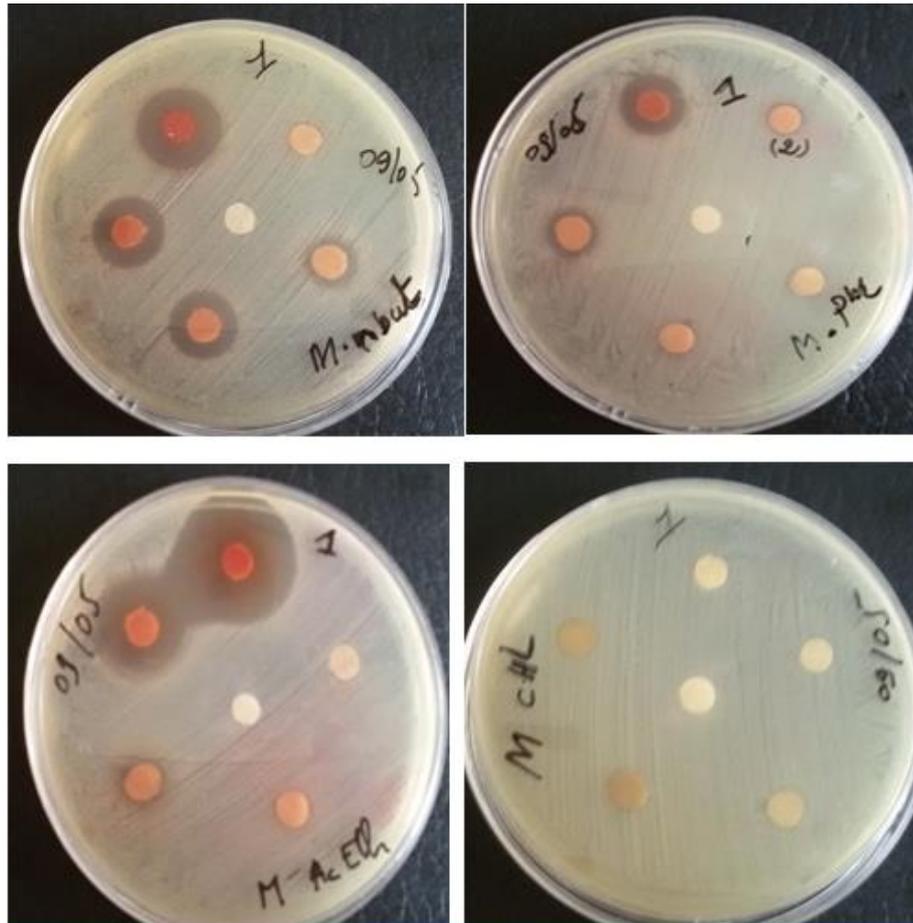


Figure 18 : Effet de l'extrait méthanolique des tiges de *Cedrus atlantica* et ses fractions sur *Staphylococcus aureus*.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours une source inépuisable de substances bioactives. Les extraits de cette étude sont obtenus par extraction à l'aide d'un Soxhlet et ainsi par fractionnement avec différents solvants à savoir l'hexane, CHL, Aceth et n-But.

Ce travail nous a permis d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait Méthanolique brut des tiges du *Cedrus atlantica* et ses fractions. Cette étude a abouti aux résultats suivants :

- La teneur en polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle que l'extrait méthanolique brut de *Cedrus atlantica* et ses fractions (CHL, Aceth ; n-But et aqueuse) contiennent : **256.25±81.52 ; 223.75±29.48 ; 636.25±49.88 ; 432.50±59.49** et **221.25±39.37 mg EAG/g d'extrait**, respectivement.
- La teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique Brut, la fraction CHL, Aceth, n-But et AQ est de l'ordre de : **5.27±0.38 ; 5.11±0.96 ; 20.75±0.58 ; 2.60±1.2** et **1.88±0.65 mgEQ/gE**.
- La teneur en tanins condensés par la méthode de la vanilline-HCL nous permis de déduire que les tiges de *Cedrus atlantica* extraites par le méthanol et fractionnées par différents solvants à savoir le CHL, Aceth, n-But et AQ sont riches en tanins condensés (**308±4.71 ; 165.5±1.03 ; 574±27.86 ; 445±15.51** et **238±1.03 mgEC/g E**, respectivement).
- Une relation linéaire a été établie entre l'activité antioxydante des échantillons testés et le contenu en polyphénols totaux 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 tiges du *Cedrus atlantica* a été évaluée sur six bactéries par la méthode de diffusion sur disque solide. Les résultats montrent que la fraction chloroformique n'a aucune activité sur les souches testées, contrairement aux autres échantillons dont les CMI se situent entre 3,75 à 60mg/ml.

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

Conclusion et perspectives

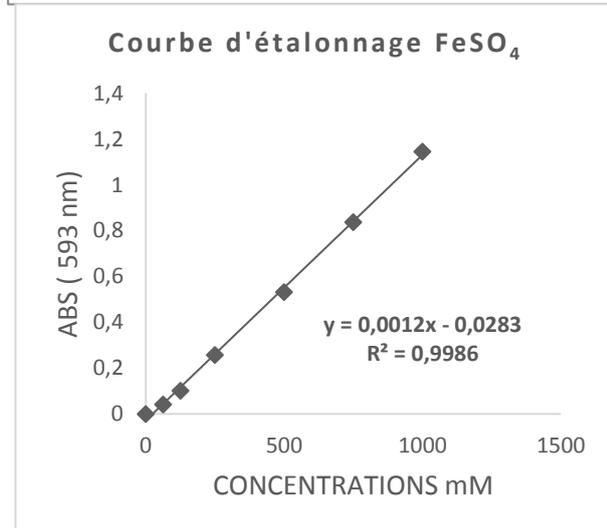
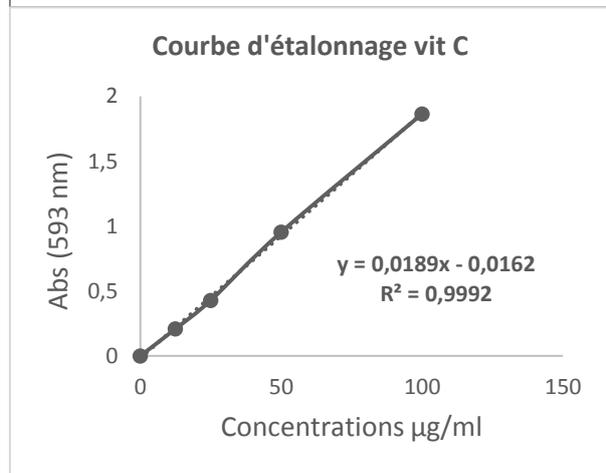
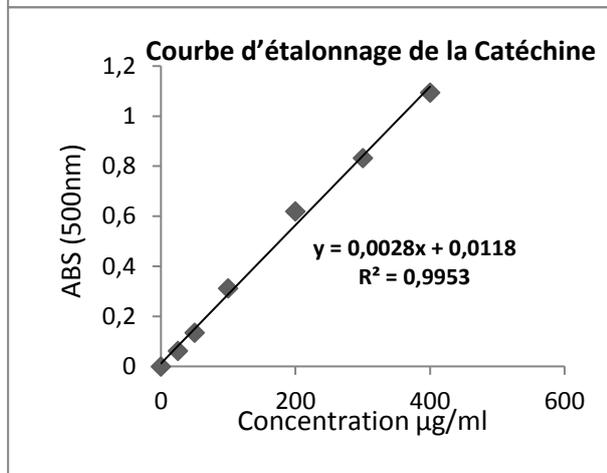
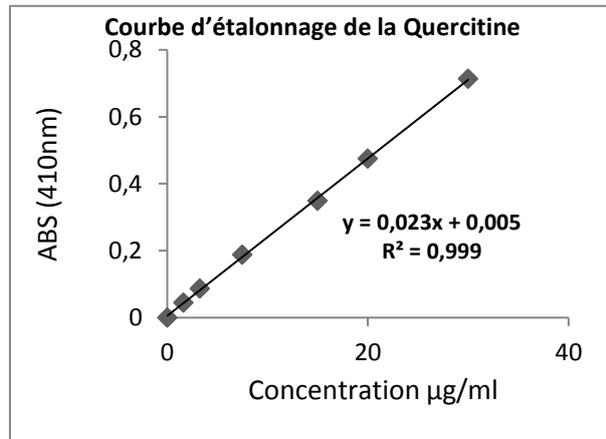
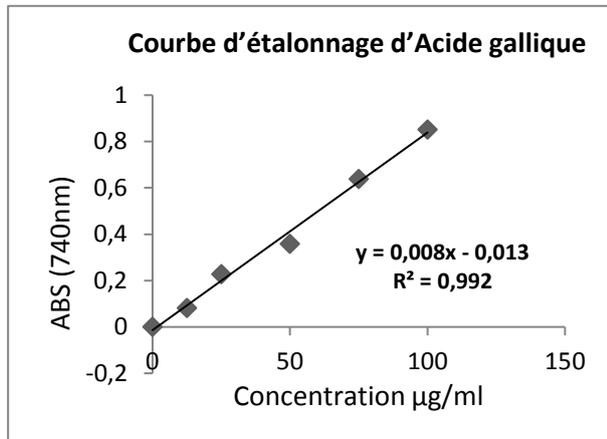
- L'identification des composants antioxydants et antimicrobiens dans les extraits actifs de cette plante.
- L'étude de la toxicité sur des lignées cellulaires (*in vitro*) et sur des modèles utilisant les animaux (*in vivo*).

Annexe

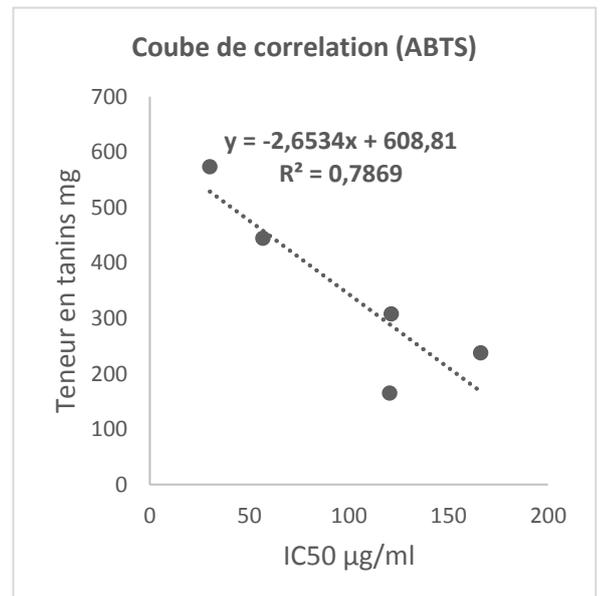
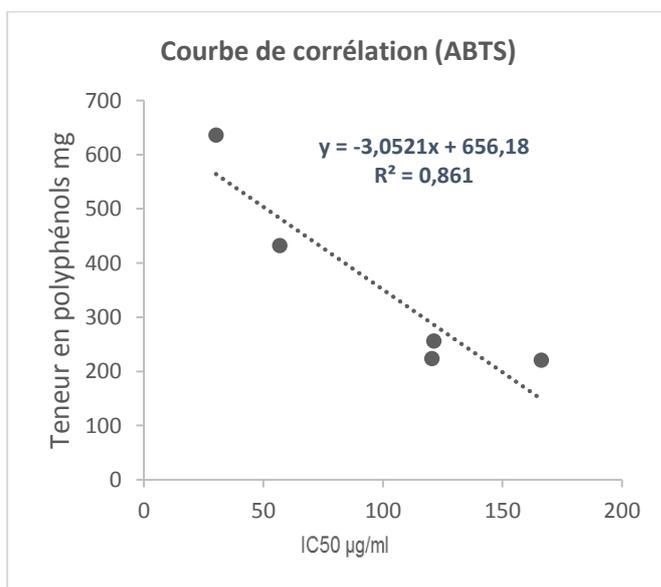
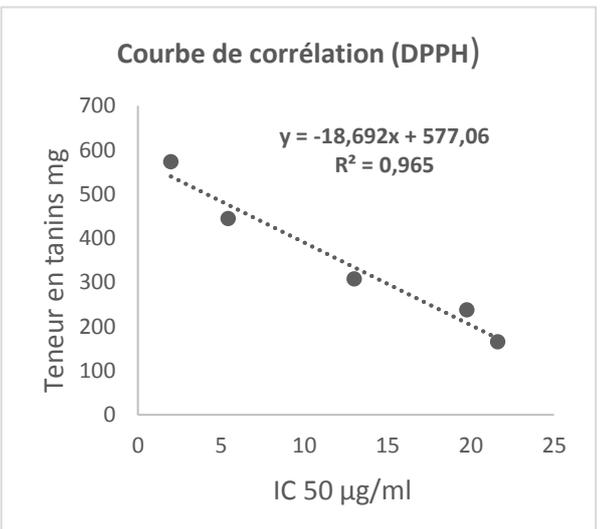
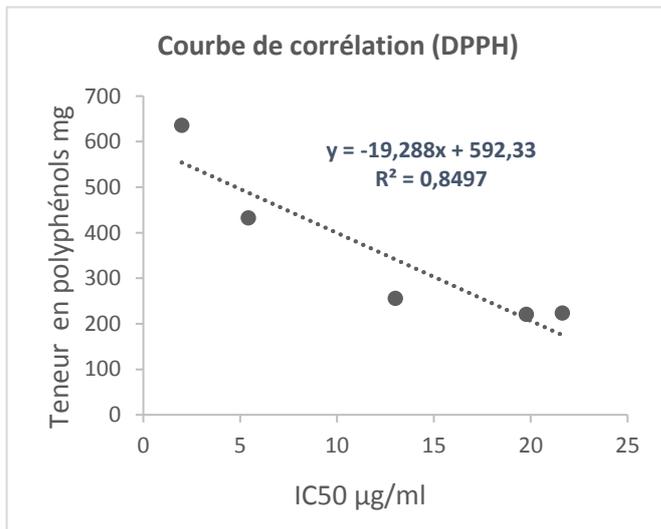
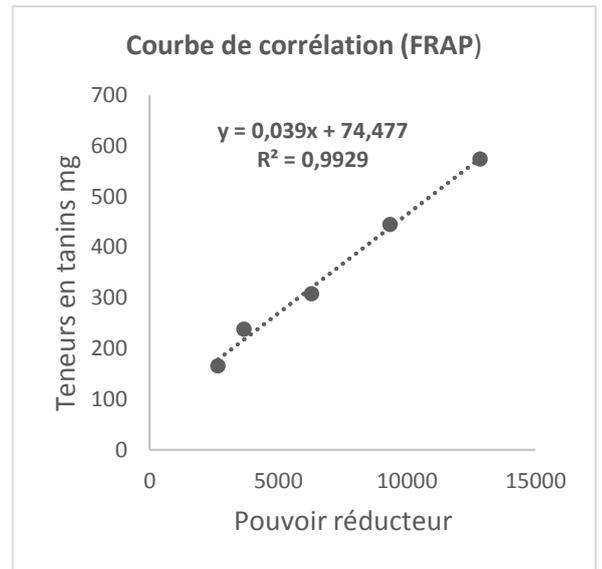
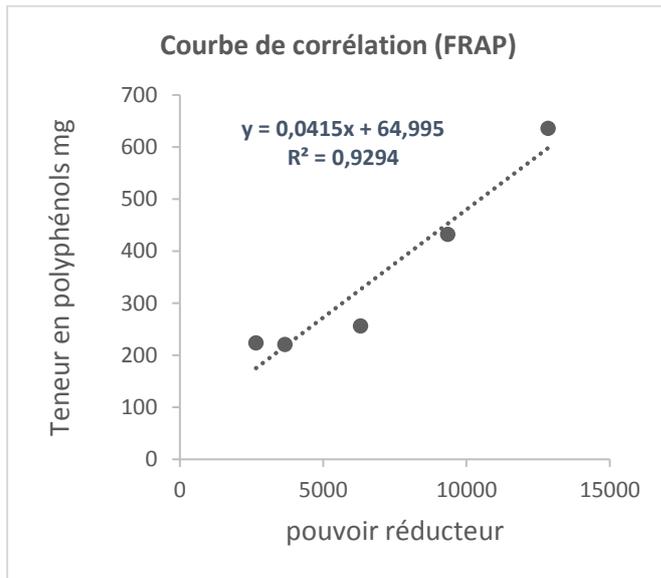
Annexe 01 : Les appareils et les produits chimiques utilisés.

	<i>Appareils</i>			<i>Produits chimiques</i>	
	<i>Marque</i>	<i>Modèle</i>	<i>Pays de fabrication</i>		
<i>Agitateur magnétique</i>	VELP	F205004420	Italie	ABTS ;	Ethanol ;
<i>Autoclave</i>	//	//	//	Acétate de sodium ;	FeSO ₄ ;
<i>Balance de précision</i>	RADWAG	PS 210.R2	Pologne	Acétate d'éthyle ;	Folin - Ciocalteu ;
<i>Bain marine</i>	RAYPA	//	Italie	Acide acétique galacial ;	Gélose Muller Hinton ;
<i>Broyeur électrique</i>	SAYONA	CG-333	Italie	Acide chlorhydrique ;	Hexane ;
<i>Etuve</i>	BINDER	//	Allemagne	Acide galique ;	Méthanol ;
<i>Evaporateur rotatif</i>	Heidolph	//	//	BHA ;	Méthanol ;
<i>PH mètre</i>	BOECO	BT-675	Allemagne	Carbonate de sodium ;	N-butanol ;
<i>Pied à coulisse</i>	//	//	//	Catéchine ;	Persulfate de potassium ;
<i>Soxhlet</i>	Reihenheizgerät 4	//	Allemagne	Chloroforme ;	Quercétine ;
<i>Spectrophotomètre</i>	BIOTECH ENGINEERING	UV-9200	Allemagne	Chlorure de fer ;	TPTZ ;
<i>Tamis électrique</i>	Retsch	AS200	Allemagne	Chlorure de sodium ;	Trichlorure d'aluminium ;
<i>Vortex</i>	VELP SCIENTIFICA	F20500420	Italie	DMSO ;	Trolox ;
				DPPH ;	Vanilline 4% ;
				Eau distillée ;	Vit C.
				Eau physiologique ;	

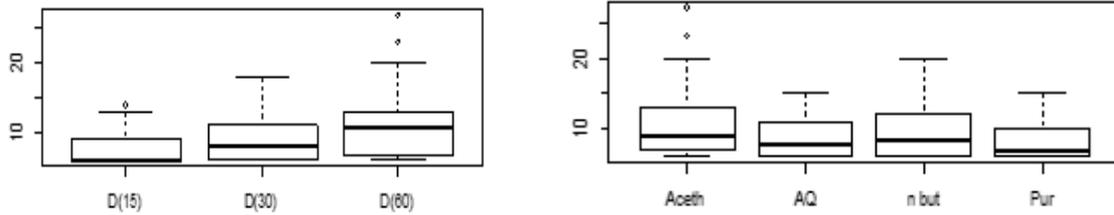
Annexe 02 : Les courbes d'étalonnage.



Annexe 03 : Les courbes de corrélation.



Annexe 04 : Les résultats de l'étude statistique.



Représentation graphique : diamètres en fonction de la dose, de l'échantillon et de la souche.

summary(res1)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
chem\$Souche	6	600.4	100.07	12.880	8.54e-12 ***(p<0.001)
chem\$Echantillon	3	156.5	52.16	6.714	0.000273 ***(p<0.001)
chem\$Dose	2	332.6	166.29	21.402	6.12e-09 ***(p<0.001)
Residuals	156	1212.1	7.77		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

summary(res2)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
chem\$Souche	6	600.4	100.07	37.24	< 2e-16 ***(p<0.001)
chem\$Echantillon	3	156.5	52.16	19.41	1.47e-10 ***(p<0.001)
chem\$Dose	2	332.6	166.29	61.89	< 2e-16 ***(p<0.001)
chem\$Souche:chem\$Echantillon	18	841.3	46.74	17.39	< 2e-16 ***(p<0.001)
Residuals	138	370.8	2.69		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Les diamètres moyens diffèrent significativement entre les souches, entre les échantillons et entre les doses. Il y a également un effet interaction entre échantillon et souche. Ça veut dire qu'un même échantillon peut avoir un effet sur une souche et n'avoir aucun effet ou un effet moindre sur une autre souche

Recherche des différences

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = chem\$Diametre ~ chem\$Echantillon + chem\$Dose)

\$`chem\$Echantillon`

	diff	lwr	upr	p adj
AQ-Aceth	-1.928571	-3.508204	-0.3489391	0.0098069
n but-Aceth	-1.380952	-2.960585	0.1986799	0.1094973
Brut-Aceth	-2.630952	-4.210585	-1.0513201	0.0001578
n but-AQ	0.547619	-1.032013	2.1272513	0.8046763
Brut-AQ	-0.702381	-2.282013	0.8772513	0.6562087
Brut-n but	-1.250000	-2.829632	0.3296323	0.1726663

\$`chem\$Dose`

	diff	lwr	upr	p adj
D(30)-D(15)	1.276786	0.03027973	2.523292	0.0433405
D(60)-D(15)	3.410714	2.16420830	4.657220	0.0000000
D(60)-D(30)	2.133929	0.88742258	3.380435	0.0002357

Les chiffres en rouge indiquent des différences significatives.

Références
Bibliographiques

A

- **Abdessemed, K. (1981).** Réflexion sur les cédraies algériennes. *Bull. Tech. Forest* (6) :7-10.
- **Achhal, A., Akazbli, O., Barbero, M. et al. (1980).** A propos de la valeur bioclimatique et dynamique de quelques essences forestières au Maroc. *Ecologia Mediterranea* : 11- 49.
- **Annie, S., Arun, S., Kuppusamy, R. et 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.
- **Agrawal, P. K and Rastogi, R. P. (1964).** Chemistry of the true Cedars, 5(12) : 133-144.
- **Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. (1992).** BACTERIOLOGIE CLINIQUE. 2^{ème} édition : 7 p.
- **Audigie, C., Figarella, J. et Zonszain, F. (1978).** Manipulation d'analyse biochimique. *Doin*, Paris : 247.

B

- **Ba, K., Tine, E., Destain, J., Cisse, N. et 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.
- **Belkheiri, N. (2010).** Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat. Toulouse : Université de Paul Sabatier.
- **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* : 70-76
- **Boizot, N. et Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques* : 79-82.
- **Boudiaf, K. (2006).** Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des grains de *Nigella sativa*. Mémoire de magister. Sétif.
- **Boudy, P. (1950).** Economie forestière Nord-Afrique : monographie et traitement des essences forestières. *Larose 2* : 529-619.
- **Boudy, P. (1952).** Guide du forestier en Afrique du Nord. *La Maison Rustique* : 505.

Référence bibliographique

- **Boughachiche, F. (2012).** Etude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebka. thèse doctorat. Constantine : université Mentouri.
- **Bruneton, J. (2008).** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales 3^{ème} édition , techniques et Documentation. Lavoisier. France : 239-783.
- **Blumberg, J. and Frei, B. (2007).** why clinical trials of vitamin E and cardiovascular diseases may be fatally flawed. Commentary on "the Realationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stess in Humans. *Free radical Biology and Medicine*, 43: 1374- 1376.
- **Bouchra, C., Mohamed, A., Mina, I. H., Hmamouchi, M., (2003).** Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. *Phytopathol. Mediterr*, 42 : 251–256.

C

- **Cadel, S. S., De buyser, M. et al.(2010).** Toxi-infections alimentaires collective à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches .Bulletin épidémiologique, *santé animale et alimentation Spécial Risques alimentaires microbiologique*, 50.
- **Chen, Y. H., Yang, Z. S., Wen, C. C., Chang, Y. S., Wang, B. C., Hsiao, C. A. and Shih, T. L. (2012).** Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae. *Food chemistry*, 134(2) : 717–724.
- **Cushnie, T. P. T. and Lamb, A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.

D

- **Dangles, O., Stoeckel, C., Wigand, M.C. et Brouillard, R. (1992).** Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett*, 33 : 522-730.
- **Debazac, E. F. (1964).** Manuel des conifères. Nancy, École nationale des Eaux et Forêts. 172 p.
- **Demarteau, M. (2006).** Réponse de *Cedrus atlantica* aux changements climatiques passés et futurs. Thèse Licence science géologiques. Université de liège .54 p.
- **Derbal, S. E. T., Ghedira, K. (2005).** Les phytonutriments et leurs impacts sur la santé. *Phytothérapie et nutrition*, 1 : 28-34.

Référence bibliographique

- **Derridj, A. (1990).** Etude des populations de *cedrus atlantica* M. en Algérie. Thèse Doctorat. Toulouse : Université Paul Sabatier ; 12-112.
- **Djeridane, A. M., Yousfi, B., Nadjemi, D., Boutassouma, P. et Stocker, N. (2006).** Vidal Antioxidant activity of some Algerian plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 224 : 801-809.
- **Doymaz, I., Gorel, O. et Akgun, N. A (2004).** Drying characteristics of the solid by product of the olive oil extraction. *Bios stems Engineering* 88 : 213-219.

E

- **EL fertas-aissani, R., Messai, Y., alouache, S., Bakour, R. (2012).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *PATBIO* : 30-48.

F

- **Fadoua, N., Bousta, N., Balouiri3, M., EL 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.
- **Farjon, A. (1990).** Panaceas: drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*. *Larix and Picea*. *Koeltz scientific books*. 330 p.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* : 108-115.
- **Ferron, A. (1983).** Bactériologie médicale. 12ème édition. LA MADELEINE. 88-135 p.
- **Flandrois, J. P. (1997).** Bactériologie Médicale. Lyon : *Presses Universitaires de Lyon*. 107-180 p.

G

- **Gabriela, P., Zrira, S., Boutakiout, A., Ungureanu, O., Simion, D., Chelaru, C. et Gabriel, L. (2013).** CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIALACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM MOROCCAN AROMATIC HERBS, *Revue Roumaine de Chimie*. 58 (11-12) : 891-897.

Référence bibliographique

- **Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. et Fernandez-Gutierrez, A. (2010).** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15 : 8813-8826.

H

- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., Chapelle, J. P. (2007).** Med Liege ,62 (10) : 628-638
- **Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T.V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86 : 985–990.
- **Harborne, J. B. (1989).** Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.*, 25 (7) : 85-109.

K

- **Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidantactivities in leaves of the halophyte Cakil emaritima. *Plant.Physiol Bioch*, 45 : 244-249.

L

- **Ladoh Yemeda, C. F., Dibon, S. D., Nyegue, M. A., Djembissi Talla, R. P., Lenta Ndjakou, B., Mpondo, E., Yinyang, J., Wansi, J. D. (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur Citrus sinensis. *Journal of applied Bioscience* 84 : 7636-7643.
- **Landrum, J.T., Bone, R.A. and Joa, H.A . (1997).** A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp Eye Res* : 57-62.
- **Le, K., Chiu, F. et Ng, K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in Fructuslycii. *Food Chemistry*, 105 : 353-363.
- **Lien, E. J., Ren, S., BUI, H. H., Wang, R.** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine.* 26 (3-4) : 285-294.

M

- **Maire, R. (1952).** Flore de l’Afrique du Nord. *Encyclopédie biologique.* Paris. Paul Le chevalier 1 : 366.

Référence bibliographique

- **Magalhaes, L., Segundo, M., Reis, S. et Lima Jose L. F. C. (2008).** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxydant properties. *Analytica chimica acta*, 613 : 1-19.
- **M'herit, O. (2006).** Le cèdre de l'Atlas : mémoire du temps. *MARDAGA* : 288.
- **M'herit, O. (1982).** Etude écologique et forestière des cédraies du rif Marocain : Essai sur une approche multidimensionnelle de la phytoécologie et de la production du cèdre de l'Atlas. *Ann. Rech. For. Maro* 2(1) : 499.
- **M'herit, O. (1994).** Le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*. Manetti) Présentation générale et état des connaissances à travers le Réseau Méditerranéen "Le Cèdre" *Ann. Rech. For. Maro* 22 : 4-15.
- **Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52 : 673-839.

N

- **Nedjahi, A. (1988).** La cédraie du Chréa (Atlas Blideen). Phénologie, productivité, régénération. Thèse Doctorat 3^{ème} cycle. Université Nancy 1 : 184

O

- **Ormerod, A., Hay, I., Jamieson, M., (2000).** Treatment of hair loss. *PCT Int. Appl.*
- **Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-zarawska, E. et Swiader, K. (2007).** Antioxydant tannins from Rosaceae plant roots. *Food chemistry* 100 : 579-583.

P

- **Pons, A., et Quezel, P. (1958).** Premières remarques sur l'étude palynologique d'un guanofossile du Hoggar. *Compte rendu des séances de l'académie de Sciences*. 244 : 2290-2292.
- **Prigent-Combaret, C., Lejeune, P. (1999).** La génétique de la formation du développement des biofilms. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 14(2) : 121-126.
- **Patrick, B., Jean, L. and Michel, S. (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections Humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. 100-274 p.
- **Percival, S. L. (2004).** Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston : 480.

Référence bibliographique

- **Pokorny, J., Yanixhlieva, N. and Gordon, M. H. (2001).** Antioxydants in food: practical applications. Cambridge: *Woodhead Publishing Limited. New York, USA* : 108-109.

Q

- **Quezel, P. et Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méridionales

R

- **Rached, W. (2009).** Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Thèse Magister. Oran : Université Es-Sénia.
- **Re, R. (1999).** Pelliegrini N. ET posteggente A. Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Biomedicine*. 26 : 1231-1237.
- **Ribereau-gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod. Paris* : 254.
- **Riou-nivert, P. (2007).** Fiche extraite de la Flore forestière française. région méditerranéenne. *Forêt-entreprise*. (3)174 : 14-16.
- **Richard, C. et Kiredjian, M. (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts : *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucella, Bordetella*. 2ème édition. Institut. Pasteur .Paris : 42-43.

S

- **Sabatier, S., Baradat, P., Barthélémy, D. (2003).** Intra- and interspecific variations of polycyclism in young trees of *Cedrus atlantica* (Endl) Manetti ex. Carrière and *Cedrus libani* A. Rich (Pinaceae). *Annals of Botany*, 84 : 387-392.
- **Sablonnière, B. (2006).** Réussir le BEP biologie microbiologie.
- **Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. *Lavoisier (Tec & Doc)*, Paris : 300-398.
- **Seeliger, H. P. R., and Jones, D. (1987).** *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds 9th, *Williams and Wilkins*, Baltimore.
- **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. Toxicol*, 43 ; 345-363.

Référence bibliographique

- **Sofowora, A. (2010).** Plantes médicinales et traditionnelle d'Afrique. Académie suisse des sciences naturelles : Karthala.
- **Steven, P., Rachel, C., Martha, E., Paul, H., Jane, S. et Peter, W. J. (2004).** Microbiology of Waterborne Diseases. *Academic Press. Elsevier* : 71-132.
- **Sugita, K., Ouchi, J., Okajima, T., Watanabe, H. (2004).** Topical nonsteroidal anti-inflammatory agents containing essential oils and body-warming substances. *Jpn. Kokai* Tokyo.
- **Srinivasan, V.B., Vaidyanathan, V., Mondal, A. et Rajamohan, G. (2012).** Role of the Two Component Signal Transduction System Cp x AR in Conferring Cefepime and Chloramphenicol Resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. 7(4) : 33-777.

T

- **Tarrier, M., Delacre, J. (2006).** La cédraie dans tous ses états. In : Le Maroc, un royaume de biodiversité. Paris, *Ibiss. Sous presse.*
- **Toth, J. (1971).** Le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* en France). Bulletin de la vulgarisation forestière 4 : 5-19.
- **Toth, J. (1981).** Contribution à l'étude monographique du cèdre méditerranéen. INRA, *Station d'Avignon* : 25.
- **Toth, J. (1994).** Le cèdre de l'atlas en France : Croissance et production des lispositifs anciens. *Ann. Rech. For. Maroc.27* : 321-335.
- **Toth, J. (2005).** Le cèdre de France. Etude approfondie de l'espèce. *Hamattan Paris, France* : 207.

W

- **Wilson, A. (1987).** Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *J. Chem. Ecol*, 13 (3) : 473-493
- **Wong, C. C., Li, H.B., Cheng, K.W. et Chen, F. (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food chemistry*, 97: 05-711.
- **Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S. and Xu, X. (2013).** Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of food chemistry*, 61(34) : 8185-8190.

Résumé

Cedrus atlantica est une plante médicinale locale de la famille des pinacées. Les échantillons testés dans cette étude sont obtenus par extraction à l'aide d'un Soxhlet en utilisant le méthanol, ainsi par fractionnement en utilisant des solvants à polarité croissante. L'objectif de cette étude est la caractérisation phytochimique de l'extrait méthanolique et ses fractions ainsi l'évaluation de leur activité antioxydante, en utilisant trois méthodes différentes : Scavenger du radical DPPH, Scavenger du radical ABTS^{•+} et le test du pouvoir réducteur FRAP. L'activité de ce dernier est corrélé aux teneurs en polyphénols totaux et tanins condensés : $R^2=0,93$; $R^2=0,99$, respectivement.

L'activité antimicrobienne a été étudié vis-à-vis six souches, en utilisant la méthode de diffusion sur disque solide. L'activité antibactérienne de la fraction acétate d'éthyle est meilleure comparativement à celles des autres échantillons, avec une zone d'inhibition maximal 25mm pour *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : *Cedrus atlantica*, activité antioxydante, polyphénols activité antimicrobienne.

Abstract

Cedrus atlantica is a local medicinal plant of the Pinaceae family. The samples tested in this study were obtained by the methanolic extraction with a Soxhlet apparatus, and then using a partitioning protocol with solvents of increasing polarity. The objective of this study is the phytochemical characterization of the methanol extract and its fractions and the evaluation of their antioxidant activity, using three different methods: DPPH radical scavenger, ABTS^{•+} radical scavenger and the reducing power test FRAP. The activity of the latter is correlated with the contents of total polyphenols and condensed tannins: $R^2 = 0.93$; $R^2 = 0.99$, respectively.

Antimicrobial activity was investigated against six bacterial strains, using the solid disk diffusion method. The antibacterial activity of the ethyl acetate fraction is better than the other samples, with a maximum inhibition zone of 25 mm against *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Cedrus atlantica*, antioxidant activity, polyphenols antimicrobial activity.

الملخص

الأرز الأطلسي هو من النباتات الطبية المحلية من عائلة الصنوبريات. وقد تم الحصول على العينات في هذه الدراسة باستخدام سوخليت، وطريقة التجزئة باستعمال محاليل مختلفة. والهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مستخلص الميثانول وجزيئاته المضاد للأوكسدة وذلك باستعمال ثلاث طرق مختلفة: طريقة ال (DPPH)، ال (ABTS^{•+})، ال (FRAP). ويرتبط نشاط هذا الأخير مع إجمالي البوليفينول والعصف المكثف $R^2=0.93$ ؛ $R^2=0.99$ ، على التوالي. تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا تجاه ست سلالات، باستعمال طريقة الانتشار من خلال القرص الصلب. النشاط المضاد للبكتيريا لعينة الاثيلين هو الأفضل بالمقارنة مع بقية العينات، و تمثل ذلك جليا بقطر تثبيط أعلى قدره 25 ملم للمكورات العنقودية الذهبية.

الكلمات المفتاحية: الأرز الأطلسي، البوليفينول، النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للميكروبات .