

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE Dr. TAHAR MOULAY. SAÏDA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



LABORATOIRES DE BIOTOXICOLOGIE, PHARMACOGNOSIE ET
VALORISATION BIOLOGIQUE DES PLANTES
MEMOIRE EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME

Master EN BIOLOGIE

OPTION : Microbiologie appliquée

Préparé Par : H'MAIMED Mohamed Aly

THEME

Etude phytochimique et activité biologique des composés phénoliques des deux plantes médicinales du sud algérien. (*Juniperus phoenicea* L., et *Cotula cinerea* (Del)).

Soutenu le : 22/06/ 2016 en publique devant la commission d'examen :

- | | | |
|------------------------|------------|-------------------------------------|
| ➤ Dr. Gacemi.B. | Président. | Maitre de conférences. U. de Saïda. |
| ➤ Dr. Ammam.K. | Examineur. | Maitre de conférences. U. de Saïda. |
| ➤ Dr. Ghouti.D. | Promoteur. | Maitre de conférences. U. de Saïda. |
| ➤ Dr. Amara.S. | Invité. | Maitre de conférences. U. de Saïda. |

Année Universitaire : 2015-2016.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

{قُلْ إِنَّ صَلَاتِي وَنُسُكِي وَمَحْيَايَ وَمَمَاتِي لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ (162) لَا شَرِيكَ لَهُ وَبِذَلِكَ أُمِرْتُ وَأَنَا أَوَّلُ الْمُسْلِمِينَ (163)}.{

(الأنعام)

صدق الله
العظيم

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

À ma chère mère Kékéja Outhmane qui m'a entouré d'amour et d'affection et dont les prières m'ont accompagnées tout le long de mes études. Pour ses nombreux sacrifices qui m'ont permis de réussir.

À ma tante Fatimetou Med Lemin pour son soutien et ses encouragements.

À ma grand-mère Beyba Bila que j'aime bien.

À mon père Hamada Amaymed pour sa complicité.

À mes grands-parents pour leur gentillesse.

À Aminetou Hamoud

AMMAMED Mohamed Aly

REMERCIEMENT

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force et l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

J'ai l'honneur d'exprimer mes reconnaissances et profondes gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et plus particulièrement:

À mon encadreur pour sa disponibilité et sa confiance. Pour ses précieux conseils, ses explications, pour la pertinence de ses remarques qui m'ont été d'une grande utilité.

Je tiens à remercier Me Gacemi.B. Maître de conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Saida, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier également Mr Ammam.K, Maître de Conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Saida pour l'aide et les conseils qu'il nous a fourni ainsi que pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je veux exprimer mes sincères et vifs remerciements à Mlle Amara.S. Maître de conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Saida, pour toute l'aide qu'il nous a fourni ainsi que pour avoir accepté de participer à ce jury.

Merci :

À ma mère adorée qui m'a soutenu sur tous les plans et qui m'a toujours encouragé pour en arriver jusqu'à là où je suis que Dieu la bénisse et accorde une longue vie.

À ma tante, Fatimetou Mohamed Lemin, la fleur de ma vie pour son amour et son soutien inconditionnel.

À mes grands-parents pour leur sagesse qui a illuminé mon chemin que Dieu les accorde une longue vie.

À mon père à qui je dois ma patience que Dieu lui protège.

À tout mes oncles, Mohamed Outhmane, Hassen Bedri, Ely Salem H'maimed, Aly H'maimed, H'maimed Ould Seyad, Lekhsara Hassen, Sallam Bouha H'maimed, Veyla, Saida, Fatimetou H'maimed,

À mon frère et mon ami depuis toujours Ely Salem OULD Hamadi

À tous les membres de ma famille.

Un grand merci aux responsables des laboratoires de l'université de Saida suivants:

Laboratoire 1 biologie : Que Mme Faouziya trouve ici l'expression de mes vifs remerciements pour son aide.

Laboratoire 2 biologie : Que Dr Chaalan trouve ici l'expression de mes vifs remerciements pour son aide.

Laboratoire 3 biologie : Que Mme Amal, ma collègue, trouve mes vifs remerciements pour sa collaboration. Laboratoire 4 : Que Mme Slamete trouve ici l'expression de mes vifs remerciements.

Laboratoire Ain elhadjar : Merci à Mr Ahmed

Laboratoire de thermodynamique : Merci à Dr Jamila

Laboratoire de chimie organique : Merci à Dr Khayra.

Laboratoire d'hygiène et de microbiologie de Saida.

À mes collègues et concitoyens mauritaniens. Ebibacrine Ahme, Cheikh bouya Mohamed, Abdou Mohamed, Dah Haimad, Ely Saleck, Ahmed Mohamed Saghir, Bouha Hmettou, Ivecou, Cheikhatta, AbdelKader, Touhana, Bekaye, Sidi, Mohamed Limame, Abdy, Babe

À mes collègues qui ont été à mes côtés pendant la réalisation de ce travail.

J'adresse un remerciement spécial à ces personnes qui ont cheminé avec moi sur ma route : Kadirou cheikh, Abdeljalil , Itt Halima , Touati Fatima zohra , chirine, Rahmani Nadjat , Houti Malika, Rezazgui Hanan, Iman Yousra, Chirine, Djellouli Hasiba, Djellouli Sabrina, Sahnoun Moustapha, Dellaoui Hakim, Mlle Dellaoui, Mr Halim, Mr Bahou, Mr Samir, Dadi soumaya, Mahi Asma, Jdid Fatima, Asma Asmahan, Mme Jamila, Iman, Meyloud, Maymoun, Abdelwahab, Ould Zeyn Mohamed Iemine, Aminetou hamoud, Zekiye Zeidane dite Zneygiye ment zeyndane, Maalouma hamoud, Hamza Boumediène, Karim Nabi, Abdelrahman Ould Mamoud, Khadirou, Abdelrazak Abdelhmid, Zouaoui et Mekidiche Fatima Zohra.

Je remercie également mes frères et camarades dont, Chekh ould zeyn, Ibba Ould Ely Mahmoud, Tghana ould Tghana, Ahmad baba Ould Zeid, Melaynin Khalifa Khattary Sidi ahmed, Ebety abdellahi, Elwaled ould Liyin , Ahmed Ahmed djege, Mana Ely Salem, Veyla, Saida, Mouaouiya, Mana Taleb, Emmenni Mint Taleb, Sellem bouha Aly, Khady, Fatima Djeng, Maaryam Dyey, Amadou Ndongo, khadi Ndongo.

Merci à mes amis d'enfance: Housein Bilal, Abdella Sidi Mokhtar, Mohktar ahmad bouha, Ahmedou ould sisi, Oumar Aboubek , Bechir Ahmad Miske.

Mes remerciements vont aussi à la direction de l'école privée AL BARAKA Rosso (2009), IFEE Dakar (2010), dans lesquelles j'ai fait mon cursus scolaire.

Enfin, mais non des moindres, j'exprime ma reconnaissance et mes vifs remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

AMHAMED Mohamed Aly

Résumé :

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de deux plantes: *Juniperus phoenicea* L., *Cotula cinerea* (Del.), Poussant à l'état spontané dans le Sud algérien successivement dans la zone d'Arbaouat wilaya d'El Bayadh et de Abadla wilaya de Béchar. Un screening phytochimique réalisé lors de cette étude a permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les parties aériennes de ces plantes.

L'extraction sélective des composés phénoliques a permis d'obtenir des rendements relativement proches en polyphénols totaux (*Juniperus phoenicea* L. (26%) et *Cotula cinerea* (Del.), (27.7%)), en tanins ((6.49%) pour *Juniperus phoenicea* L., et (4.89%) pour *Cotula cinerea* (Del).), et un rendement faible en flavonoïdes fraction acétate ((3.53%) pour *Juniperus phoenicea* L., et (3.18%) pour *Cotula cinerea* (Del).). En ce qui concerne la fraction 1-butanol des flavonoïdes, on'a (3.73%) pour *Juniperus phoenicea* L. et (1.22%) pour *Cotula cinerea* (Del).

Le dosage des polyphénols totaux a montré des taux quasi élevés de ce dernier (217.2 mg EAG/g) pour *Juniperus phoenicea* L., et (276.74 mg EAG/g) pour *Cotula cinerea* (Del). L'étude du pouvoir antioxydant des polyphénols totaux, des tanins, des fractions acétate et 1-butanol des flavonoïdes de ces plantes nous a permis de déduire que toutes ces fractions possèdent une activité antioxydante relativement forte par rapport avec le BHT et proche à celle de l'acide ascorbique.

L'étude du pouvoir antimicrobien a montré que les extraits de *Juniperus phoenicea* L., et *Cotula cinerea* (Del.), se sont avérées actives sur toutes les souches microbiennes que nous avons utilisé. La souche microbienne *Bacillus subtilis* a montré une très forte sensibilité contre les flavonoïdes de *Cotula cinerea* (Del). *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* se sont révélées très sensibles vis-à-vis les polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L. Les extraits sélectifs possèdent des concentrations minimales inhibitrices allant de 0.375 à 0.023 mg/ml.

Mots clés : *Juniperus phoenicea* L., *Cotula cinerea* (Del). Screening phytochimique, pouvoir antioxydant, pouvoir antimicrobien.

Abstract:

This work is devoted to the phytochemical study and biological of two plants: *Juniperus phoenicea* L., *Cotula cinerea* (Del.), growing spontaneous in the South algerian successively in Arbaouat district of El Bayadh and Abadla district of Bechar . A phytochemical screening realized during this study has helped to detect the different families of chemicals existing in the aerial parts of these plants.

The selective extraction of phenolic compounds yielded relatively close yields of total polyphenols *Juniperus phoenicea* L. (26%) and *Cotula cinerea* (Del) (27.7%), in tannins ((6.89%) for *Juniperus phoenicea* L., and (4.89%) for *Cotula cinerea* (Del)) and a low yield of the acetate fraction of flavonoids ((3.53%) for *Juniperus phoenicea* L., and (3.18%) *Cotula cinerea* (Del).) as regards to the fraction 1-butanol of flavonoids, it ' has (3.73%) for *Juniperus phoenicea* L., and (1.22%) for *Cotula cinerea* (Del)

The determination of total polyphenols has shown almost high rates of the latter (217.2 mg EAG/g) for *Juniperus phoenicea* L., and (276.74 mg EAG/g) for *Cotula cinerea* (Del). The study of the antioxidant activity of total polyphenols, tannins, and acetate and 1-butanol fractions of flavonoids from these plants has enabled us to infer that all these fractions have a relatively strong antioxidant activity compared with BHT and close antioxidant activity with ascorbic acid.

The study of antimicrobial activity showed that extracts of *Juniperus phoenicea* L., and *Cotula cinerea* (Del)., have proved to be active on all microbial strains that we used. Microbial strain *Bacillus subtilis* showed a very high sensitivity against the flavonoids of *Cotula cinerea* (Del). *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* have proved very sensitive towards the total polyphenols of *Juniperus phoenicea* L., Selective extracts have minimum inhibitory concentrations ranging from 0.375 to 0.023 mg/ml.

Key words: *Juniperus phoenicea* L., *Cotula cinerea* (Del)., phytochemical screening, , antioxidant activity , antimicrobial activity.

مُلخَص :

إن هذا العمل مكرس لدراسة الغريلة الكيميونباتية والنشاط البيولوجي لنوعين من النباتات : العرعار الفينيقي (العرعار الأحمر) *Juniperus phoenicea* L. ، و القرطوفة البيضاء *Cotula cinerea* (Del). اللتين تنموان في الجنوب الجزائري في كلٍّ من منطقة العربارات بولاية البيض ومنطقة العباضلة بولاية بشار بالتوالي . الغريلة الكيميونباتية للأجزاء الجوية لهاتين النباتين ساعدت في الكشف عن توفرهما على أسر مختلفة من المواد الكيميائية.

الاستخراج الانتقائي للمركبات الفينولية أسفر عن توفر عائد كبير من مجموع البوليفينولات وصل إلى (26%) لدى نبتة العرعار الأحمر و(27.7%) لدى القرطوفة البيضاء ، كما أسفر عن تواجد نسب من العفص تم تسجيلها كما يلي (6.49%) لدى العرعار الأحمر و (4.89%) لدى القرطوفة البيضاء ، وعن عائد منخفض من الفلافونويدات المجزأة بالأسيتات بنسب (3.53%) و (3.18%) لدى العرعار الأحمر و القرطوفة البيضاء على التوالي. أما فيما يتعلق بالفلافونويدات المجزأة بال 1-بيتانول فقد تم تسجيل (3.73%) لدى العرعار الأحمر و (1.22%) لدى القرطوفة البيضاء.

في ما يخص تحديد إجمالي البوليفينولات, قد أظهرت التحاليل تسجيل معدلات عالية لهذا الأ[□]ير (217.2 ملغ معادلة لحمض الجاليك/للجرام) لدى العرعار الأحمر و (276.74 ملغ معادلة لحمض الجاليك/للغرام) لدى القرطوفة البيضاء. دراسة قوة مضادات الأكسدة لدى مستخرجات مجموع البوليفينول ، العفص و الفلافونويدات بتجزئة الأسيتات وتجزئة ال 1-بيتانول في نبتتي العرعار الأحمر و القرطوفة البيضاء, سمحت لنا أن نستنتج أن جميع هذه المستخرجات تمتلك نشاطا مضادا للأكسدة قوي نسبيا بالمقارنة مع حمض الأسكوربيك و بوتيل هيدروكسي تولوين

وأظهرت دراسة النشاط المضاد للميكروبات أن هذه المستخرجات تمتلك نشاط مثبطا لنمو جميع السلالات الميكروبية التي قمنا بدراسة تأثيرها عليها . سلالة *Bacillus subtilis* أظهرت حساسية عالية جداً ضد مركبات الفلافونويد لنبتة القرطوفة البيضاء ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Candida albicans* قد أظهرت حساسية عالية نحو مستخرج مجموع البوليفينولات الكلي لنبتة العرعار الأحمر . جميع المستخرجات الإنتقائية تمتلك تركيزات مثبطة دنيا على جميع السلالات الميكروبية التي قمنا بتجربتها تتراوح بين 0.375 و 0.023 ملغ/مل.

كلمات مفاتيح : العرعار الأحمر , القرطوفة البيضاء , الغريلة الكيميونباتية , النشاط المضاد للأكسدة , النشاط المضاد للميكروبات.

Liste des figures :

Figure	Page
Figure 1 : <i>Juniperus phoenicea</i> L.	6
Figure 2 : <i>Cotula cinerea</i> (Del)	8
Figure 3 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate	11
Figure 4 : Quelques acides phénols de la série benzoïque	13
Figure 5: Quelques acides phénols de la série cinnamique	13
Figure 6 : Structure du 2-phényle chromane	14
Figure 7: Structure générale des flavonoïdes	14
Figure 8 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes	15
Figure 9 : Structure des anthocyanosides	16
Figure 10: Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)	17
Figure 11: Structure des tanins condensés et leur monomère	17
Figure 12 : Organigramme des origines des radicaux libres oxydants et les types des réactions d'oxydation appliquées en biologie	26
Figure 13 : Structure de l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque	30
Figure 14 : image satellite des zones de récolte à gauche Arbaouat, à droite Abadla	33
Figure 15 : séchage de <i>Juniperus phoenicea</i> L.	33
Figure 16: séchage de <i>Cotula cinerea</i> (Del).	34
Figure 17: infusion du matériel végétal	34
Figure 18: décoction du matériel végétal.	35
Figure 19 : Macération du matériel végétal.	36
Figure 20 : dégraissage par soxhlet.	39
Figure 21 : Protocole d'extraction des polyphénols totaux.	39
Figure 22: Schéma d'extraction des flavonoïdes (Bekkara et al., 1998).	40
Figure 23: Protocole d'extraction des tanins.	41
Figure 24: Réduction du fer ferrique en fer ferreux.	43
Figure 25 : Réduction de radical DPPH●	44
Figure 26: Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH●	44
Figure 27 : Schéma descriptif de la préparation des disques et l'ensemencement des souches microbiennes.	48
Figure 28 : Schéma descriptif de la Préparation et ensemencement des microplaques	49
Figure 29 : comparaison entre les rendements en extraits sélectifs entre les deux plantes.	51
Figure 30 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	52
Figure 31 : comparaison entre les teneurs en polyphénols totaux dans les deux plantes.	53
Figure 32 : Résultat de la méthode FRAP des extraits de <i>Juniperus phoenicea</i> L	54
Figure 33 : Résultat de la méthode FRAP de <i>Cotula cinerea</i> (Del).	54
Figure 34 : Pouvoir antioxydant des polyphénols totaux de <i>Juniperus phoenicea</i> L.	55
Figure 35 : Pouvoir antioxydant des Polyphénols totaux de <i>Cotula cinerea</i> (Del.)	55
Figure 36: Pouvoir antioxydant des Tanins <i>Juniperus phoenicea</i> L	56

Figure 37 : Pouvoir antioxydant des Tanins de de Cotula cinerea (Del).	56
Figure 38 : Pouvoir antioxydant des Flavonoïdes fraction acétate de Juniperus phoenicea L.	56
Figure 39 : Pouvoir antioxydant des Flavonoïdes fraction acétate de Cotula cinerea (Del).	56
Figure 40 : Pouvoir antioxydant des Flavonoïdes fraction 1-butanol de de Juniperus phoenicea L.	56
Figure 41 : Pouvoir antioxydant des Flavonoïdes fraction 1-butanol de de Cotula cinerea (Del).	56
Figure 42 : pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique	57
Figure 43 : Comparaison entre les IC50 des différents extraits	57
Figure 44 : comparaison entre les activités antiradicalaires des différents extraits	58
Figure 45: comparaisons des diamètres d'inhibition des différentes bactéries vis-à-vis les différents extraits.	61
Figure 46 : sensibilité des bactéries à Gram +	61
Figure 47 : sensibilité des bactéries à Gram –	62
Figure 48 : sensibilité des Candida albicans	62
Figure 49: résultats de l'antibiogramme	63

Liste des tableaux :

Tableau	page
Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques	12
Tableau 2 : superficies et coordonnées des zone de récolté	32
Tableau 3 : Les différents microorganismes utilisés.	46
Tableau 4 : Résultat du screening phytochimique	50
Tableau 5 : Rendement en extraits sélectifs	51
Tableau 6 : résultats du dosage des polyphénols totaux	52
Tableau 7 : les valeurs des IC ₅₀ des différents extraits	57
Tableau 8 : Activité antiradicalaire des différents extraits :	58
Tableau 9 : diamètre d'inhibition des bactéries vis-à-vis les différents extraits en mm.	59
Tableau 10 : degrés de sensibilité des ouches vis-à-vis les différents extraits	60
Tableau 11 : résultat du test de l'antibiogramme	63
Tableau 12 : Les différentes concentrations minimales inhibitrices des différents extraits.	64

Table de Matière :

Titre :

N° de page :

Dédicace

Remerciement

Résumé

Abstract

مُلَخَّصٌ

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale..... 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : présentation des plantes étudiées

Introduction 4

I-1- Définition des plantes médicinales 4

I-1- 2 Juniperus phoenicea L..... 4

I-1-2-1 Position Systématique..... 5

I-1-2-2- Noms vernaculaires..... 5

I-1-2-3-Description botanique et habitat..... 5

I-1-2-4-Propriétés et usages thérapeutiques 6

I-1-2-5-Travaux antérieurs 7

I-1- 3- Cotula cinerea (Del)..... 7

I-1- 3-1- Position systématique 7

I-1- 3-2- Noms vernaculaires 7

I-1- 3-3- Description botanique et habitat 8

I-1- 3-4- Propriétés et usages thérapeutiques 8

I-1- 3-5- Travaux antérieurs 9

Chapitre II : Les polyphénols

Introduction 10

II-1-Généralités 10

II-2- Biosynthèse 11

II-3- Classes des polyphénols..... 11

II-3-1-Acide phénolique 13

II-3-2-Flavonoïdes 14

II-3-3- Anthocyanosides 16

II-3-4-Tannins 16

II-3-5-Phénols simples et les acides phénoliques 18

II-3-5-1-Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque 18

II-3-5-2-Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique 18

II-3-5-3-Phénols simples 18

II-3-6- Coumarines 19

II-3-7- Quinones	19
II-3-8- Stilbènes	19
II-4- Propriétés biologiques des polyphénols	19
Chapitre III : Le stress oxydatif	
Introduction	23
III-1- Les radicaux libres	23
III-1-1-Définition	23
III-1-2- types des radicaux libres	23
III-1-2-1- Radicaux libres actifs (radicaux non stables).....	24
III-1-2-2- Radicaux libres stables.....	24
III-3- Origine de production des ERO	24
III-4- Réactions auto oxydantes.....	25
III-5- Réactions d'oxydations dans le système biologique.....	25
III-6- Définition des antioxydants.....	26
III-7- Dommages oxydatives des radicaux libres	27
III-8- Moyens de défense contre les radicaux libres	27
III-8-1- Prévention à plein temps	27
III-8-2- Détoxification active suite à une attaque oxydante	28
III-8-2-1- Super oxyde dismutase (SOD)	28
III-8-2-2- Catalase	28
III-8-2-3- Glutathion peroxydase	28
III-8-3- Détoxification passive	29
III-8-3-1- Vitamine E (tocophérol).....	29
III-8-3-2- Vitamine C (acide ascorbique).....	29
III-8-3-3- Caroténoïdes	29
III-8-3-4- Acide lipoiïque	30
III-8-3-5- Alumine	30
III-8-3-6- Composés phénoliques	30
III-9- Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes.....	30
Partie expérimentale	
Chapitre IV : Matériel et méthodes	
Introduction	32
IV-1- Matière végétale	32
IV-1-1- Le matériel végétal	32
IV-1-2-Préparation des extraits	34
IV-1-2-1- Infusion en milieu aqueux.....	34
IV-1-2-2- Décoction en milieu aqueux	35
IV-1-2-3- Décoction alcoolique	35
IV-1-2-4- Macération en milieu aqueux	35
IV-1-2-5- Macération alcoolique	35
IV-2- Screening phytochimique	36
IV-2-1- Différentes classes recherchées	36
IV-2-1-1- Les tannins	36
IV-2-1-2- Les flavonoïdes	36
IV-2-1-3- Les anthocyanes	37
IV-2-1-4- Les alcaloïdes	37

IV-2-1-5- Stérols et triterpènes	37
IV-2-1-6- Les saponosides	38
IV-2-1-7- Les composés réducteurs	38
IV-2-1-8- L'amidon	38
IV-3- Extraction des composés phénoliques	38
IV-3-1- Extraction des polyphénols totaux.....	39
IV-3-2-Extraction des flavonoïdes	39
IV-3-3-Extraction des tannins	41
IV-4- Dosage des composés phénoliques	42
IV-5- Étude de l'activité antioxydant	43
IV-5-1- Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power)	43
IV-5-2- Piégeage du radical libre DPPH•	44
IV-5-3- Calcul de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity)	45
IV-6- Etude de l'activité antimicrobienne	46
IV-6-1- Préparation de L'échantillon d'extraits sélectifs	46
IV-6-2-Préparation des précultures	46
IV-6-3- Tests d'activité antimicrobienne des extraits	47
IV-6-3-1- Préparation des inoculums	47
IV-6-3-2- Ensemencement et application des disques	47
IV-6-3-3- Etude et détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	49
Chapitre V : Résultats	
V-1-Tests phytochimiques	50
V-2- Extractions sélectives	50
V-3- Dosage des polyphénols totaux	51
V-4- Etude de l'activité antioxydante	53
V-4-1- Réduction de fer (FRAP)	53
V-4-2- Piégeage du radical libre DPPH•	55
V-4-3- Activités antiradicalaire (AAR)	58
V-5- Activités antimicrobienne	58
V-5-1- Testes de sensibilité.....	58
V-5-2- Concentration minimale inhibitrice	64
Discussion.....	65
Conclusion.....	70
Références bibliographiques.....	72
Annexes	

INTRODUCTION GÉNÉRALE

*L*es plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains. Aujourd'hui, encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes.

L'industrie pharmaceutique moderne, elle-même, s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (**Hostettmann et al., 1998**).

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

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

Le présent travail entre dans le cadre de la valorisation de la flore locale algérienne, et ce par une évaluation phytochimique et une étude biologique et chimique (activités antimicrobienne et antioxydante) de quelques plantes suspectées médicinales en vue de découvrir de nouvelles substances d'intérêt biologique et thérapeutique (**Bendimerad et ai, 2005; Bendimerad et ai, 2007; Bekhechi et ai, 2007; Belarbi et ai, 2007; Benhammou et ai, 2007; Atik Bekkara et ai, 2008; Bekhechi et ai, 2008; Benhammou et ai, 2008**).

C'est dans ce cadre que nous avons opté pour l'étude de deux plantes spontanées dont l'une appartient à la famille des *cupressacées*, *Juniperus phoenicea* L., et l'autre appartient à la famille des *Astéracées*, *Cotula cinerea* (Del.), collectées à la région d'El Bayadh.

Les recherches bibliographiques que nous avons menées sur ces plantes ont montré que peu de travaux de recherches antérieurs en Algérie ont été effectués sur notre sujet, ce qui nous a motivé à le choisir, pour effectuer une étude phytochimique et biologique sur les extraits sélectifs de *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del). Cependant, beaucoup de travaux ont été réalisés ailleurs sur la composition chimique des huiles essentielles et des métabolites secondaires de ces deux plantes.

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

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

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

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

- Tests phytochimiques : qui sont réalisés sur les parties aériennes de nos plantes, en utilisant deux solvant (l'eau, l'éthanol) pour des macérations et des décoctions
- Extractions sélectives et analyses:
 - Extraction des composés phénoliques ;

- Extraction des flavonoïdes en deux fractions (acétate et 1-butanol) ;
 - Extraction des tanins ;
 - Dosage des phénols totaux;
- Activités chimiques et biologiques:
- Etude du pouvoir antioxydant des extraits sélectifs des deux plante par deux méthodes (réduction du fer 'FRAP' et piégeage du radical libre DPPH).
 - Etude du pouvoir antimicrobien des extraits sélectifs des deux plantes vis-à-vis de six souches bactériennes et deux souches fongiques.

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

Introduction :

En Algérie en général, l'industrie pharmaceutique, mais également des médecins, des chimistes et des biologistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années.

I-1- Définition des plantes médicinales :

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médical. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**GHABRIER, 2010**).

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**).

I-1- 2 *Juniperus phoenicea* L. :

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

Le nom «*Juniperus*» désigne encore chez les latins le genre qui comprend environ une cinquantaine d'espèces d'arbustes ou d'arbres persistants à la croissance lente.

I-1-2-1 Position Systématique (Quezel et Santa, 1962). :

Embranchement: *Spermaphytes*

Sous- Embranchement: *Gymnospermes*

Classe: *Conifères*

Ordre: *Coniférales*

Famille : *Cupressacées*

Genre: *Juniperus*

Espèce: *Juniperus phoenicea* L.

I-1-2-2- Noms vernaculaires :

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

En Français: Genévrier rouge, Genévrier de Phénicie.

En Anglais: Phoenician Cedar, Berry Bearing Cedar.

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

En Italien: Cedro licio (**Bonnier, 1990**).

I-1-2-3-Description botanique et habitat :

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

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

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

Les fruits sont globuleux, assez gros (8 à 10 mm), noirâtres quand ils sont jeunes, puis verts et enfin rouges sombres et luisants à maturité; ils renferment 7 à 9 graines (**Becker et al, 1982**) (**figure 1**).



Figure 1 : *Juniperus phoenicea* L. (Ghouti, 2015).

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

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

I-1-2-4-Propriétés et usages thérapeutiques :

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

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

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

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

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

I-1-2-5-Travaux antérieurs :

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

I-1- 3- *Cotula cinerea* (Del). :

Le nom *Cotula* provient du grecque de la kotule grecque, petite tasse, se référant à la zone creuse à la base des feuilles ; *cinerea* : cendres colorées, comme les cendres. (Benhouhou, 1986).

I-1- 3-1- Position systématique : (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007):

Embranchement : *Phanérogames* ou *Spermaphytes*.

Sous-embranchement : *Angiospermes*.

Classe : *Endicots*.

Sous classe : *Astéridées*.

Ordre : *Astérales*.

Famille : *Astéracées* ou *Composées*.

Genre : *Cotula*.

Espèce : *Cotula cinerea* (Del)., syn. *Brocchia cinerea* (Del.) Vis.

I-1- 3-2- Noms vernaculaires :

En Arabe: (القرطوفة) gartoufa, robita, chiriya, chouhiya . (Quezel et Santa 1963; Zabeirou , 2001)

En Turquie: takkél

En Anglais: Saharan camomile

En Français : camomille du Sahara.

I-1- 3-3- Description botanique et habitat :

C'est une petite plante annuelle d'aspect laineux de 5 à 15 cm entièrement tomenteuse. Les tiges sont dressées ou diffusées. Les feuilles et les tiges vert-blanchâtre sont recouvertes de petits poils denses qui forment comme un manteau de velours. Les feuilles petites, entières épaisses et veloutées sont découpées en trois à sept dents ou 'doigts' qui se présentent comme une main légèrement refermée. Les fleurs sont de petits demi-pompons jaune d'or au bout d'une courte tige. C'est une espèce Saharo-arabique commune dans tout le Sahara et les lieux sablonneux désertiques (**Quezel et Santa 1963**).

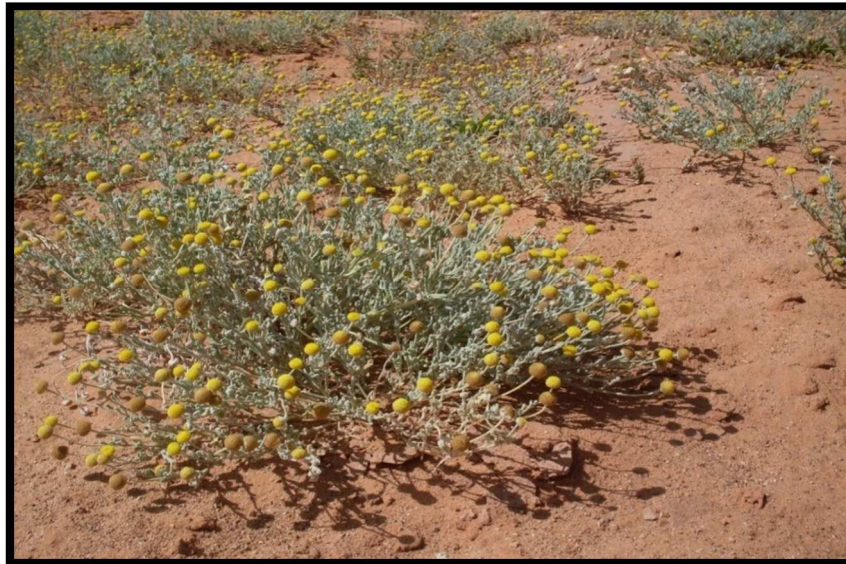


Figure 2 : *Cotula cinerea* (Del) (**Ghouti, 2015**).

I-1- 3-4- Propriétés et usages thérapeutiques :

Cette espèce est largement utilisée en médecine traditionnelle marocaine pour ses propriétés biologiques comme les activités anti-inflammatoire, analgésique, antiseptique, antibactérienne, antipyrétique et contre les larves, (**Markouk et al., 1999 ; Markouk et al., 2000 ; Larhsini et al., 2002**). Dans le Sahara algérien plus précisément à Ouargla, cette plante est destinée contre la colique, la diarrhée, la toux, le rhumatisme et la stérilité (**Ould El Hadj et al., 2003 ; Hammiche et Maiza, 2006**).

Elle est appliquée comme un cataplasme sur le front pour ses propriétés fébrifuges. Dans le Sahara, elle est très appréciée dans le thé vert et est aussi mélangée avec de la nourriture pour rehausser la saveur du lait.

I-1- 3-5- Travaux antérieurs :

Selon **BELYAGOUBI (2012)**, les flavonoïdes isolées chez *Cotula cinerea* sont : flavone O- et C-glycosides, flavonols glycosides et quercetagine 3, 6, 7-triméthyl éther (**Ahmed et al., 1987**), lactones sesquiterpéniques, les glaucolides (**Metwally et al., 1986**) et les coumarines sesquiterpéniques (**Greger et Hofer, 1985**).

Screening phytochimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Cotula cinerea* (gartoufa) dans la région de Bechar (**Abdenbi asma, Abdelwahed djamel-eddin, Bouaaza Mohammed et Touati Boumediene 2014**).

Les substances bioactives de *Cotula cinerea* (Del). (**S.SEGHIR, H.DENDOUGUI, S.BENAYACHE, F. BENAYACHE 2011**).

Introduction :

Le règne végétal renferme deux types de métabolites qui se différencient entre eux par leur constitution, leur rôle et leur emploi :

Les métabolites primaires (glucides, protides, lipides,... et acides nucléiques) qui sont présents en permanence chez les plantes et sont indispensables à la croissance et à la reproduction des plantes.

Les métabolites secondaires ou principes actifs dont la proportion varie selon la famille, le genre et l'espèce ne sont pas impliqués dans le développement des plantes.

II-1-Généralités :

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1993**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés (**Mompon et al., 1998**). Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste (**Middleton et al., 2000**).

II-2- Biosynthèse :

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (**figure 3**). Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (**Bruneton, 1993**).

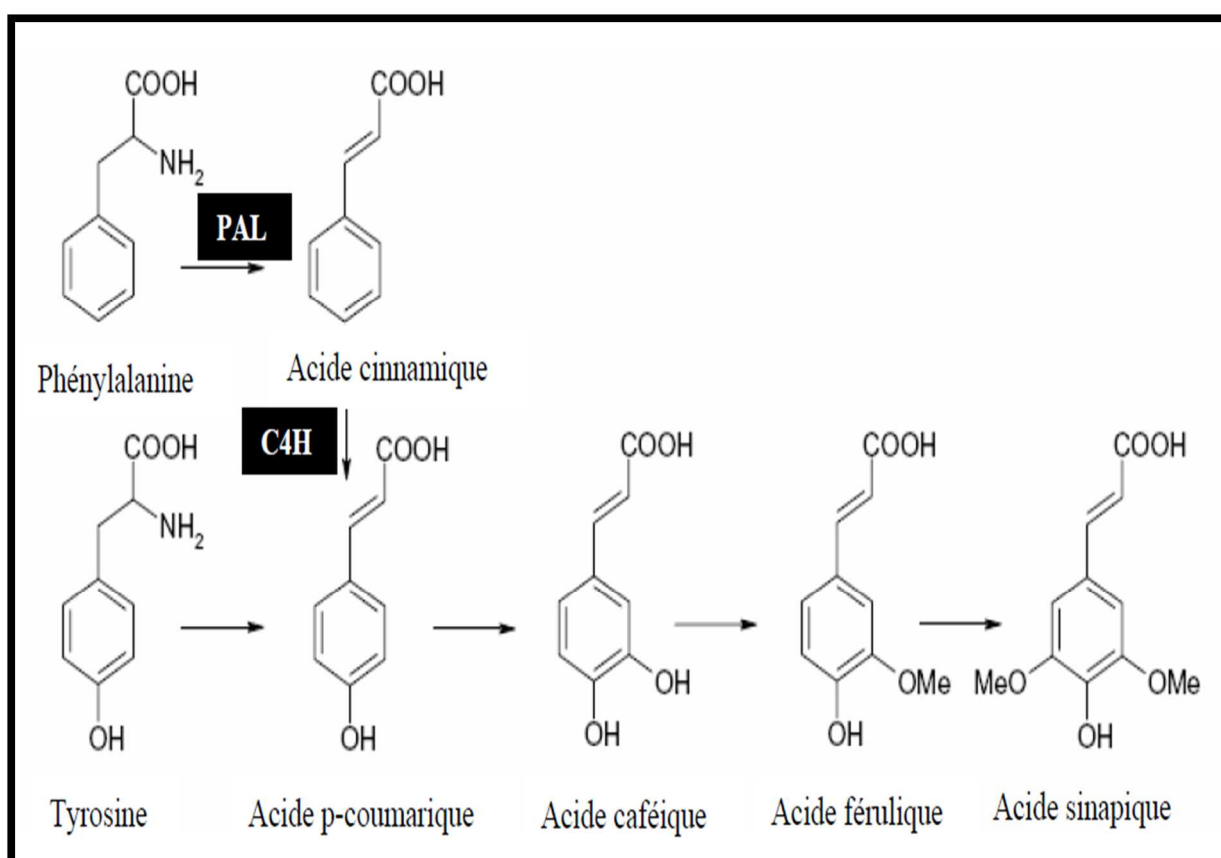


Figure 3 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (**Crozier et al., 2006**). **PAL** : phénylalanine ammonia-lyase ; **C4H** : cinnamate 4-hydroxylase.

II-3- Classes des polyphénols :

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (**Tableau 1**). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 1999 ; Hennebelle, 2006).

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Plantes
6	C6	Phénols simples	Cathécol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols Benzoïques	Ac. gallique, Ac. salysalique, vanilline	Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénones	3-acétyl6- méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C6-C3	Acides phénols Cinnamiques	Ac. coumarique, Ac.caféique	Romarin Marronnier d'inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C6-C1-C6	Xanthones	Bellidifoline, mangocétine	Racine de gentiane, Centaurée
14	C6-C2-C6	Stiblènes	Hydrangénol,,Pinosylvine	Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, Roténoïde	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3)2	Lignanes	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6)2	Bi flavonoïdes	Amentoflavone, Hinokiflavone	Carcinia Hypericum
N	(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés (proanthocyanid ols	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

II-3-1-Acide phénolique :

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Pandey et Rizvi, 2009).

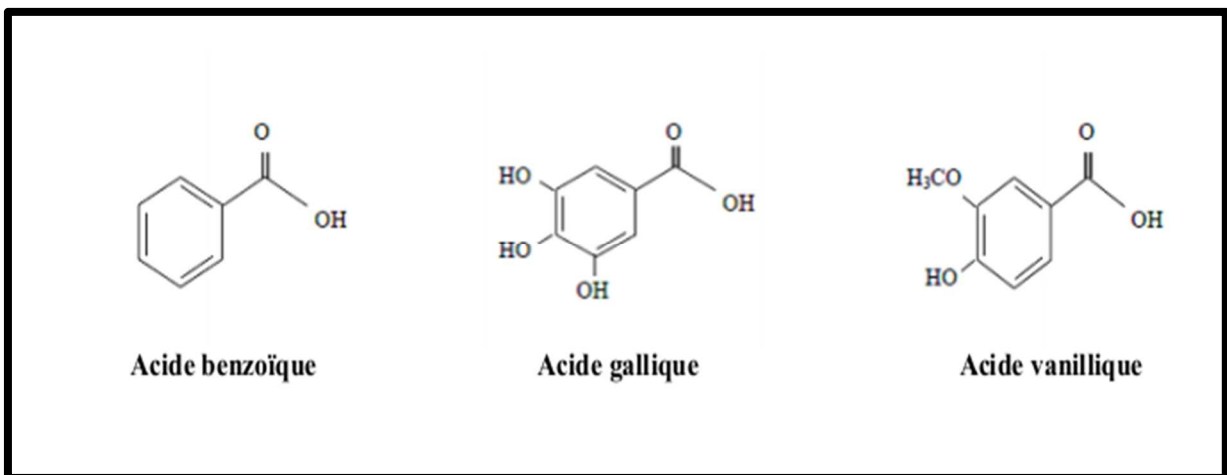


Figure 4 : Quelques acides phénols de la série benzoïque (Bruneton, 2009).

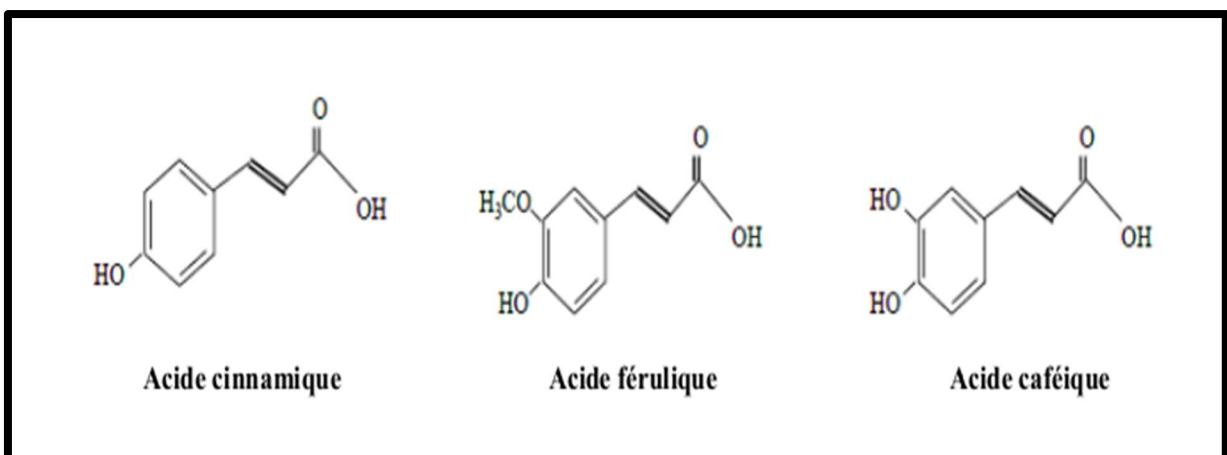


Figure 5: Quelques acide phénols de la série cinnamique (Bruneton, 2009).

II-3-2-Flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata *et al.*, 1978), dans la régulation des gènes et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao *et al.*, 2004) (figures 6 et 7).

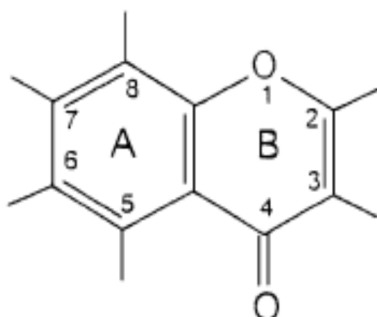


Figure 6 : Structure du 2-phényle chromane
flavonoïdes

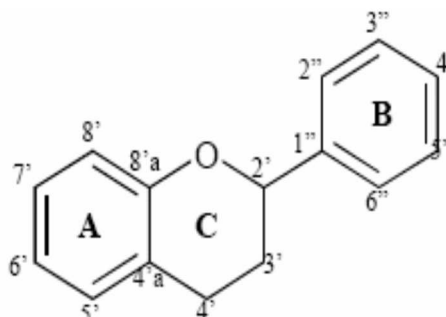


Figure 7: Structure générale des flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C₂-C₃, du groupe 3-Oet la fonction 4-oxo (Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonols ; isoflavonols ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003) (figure 8).

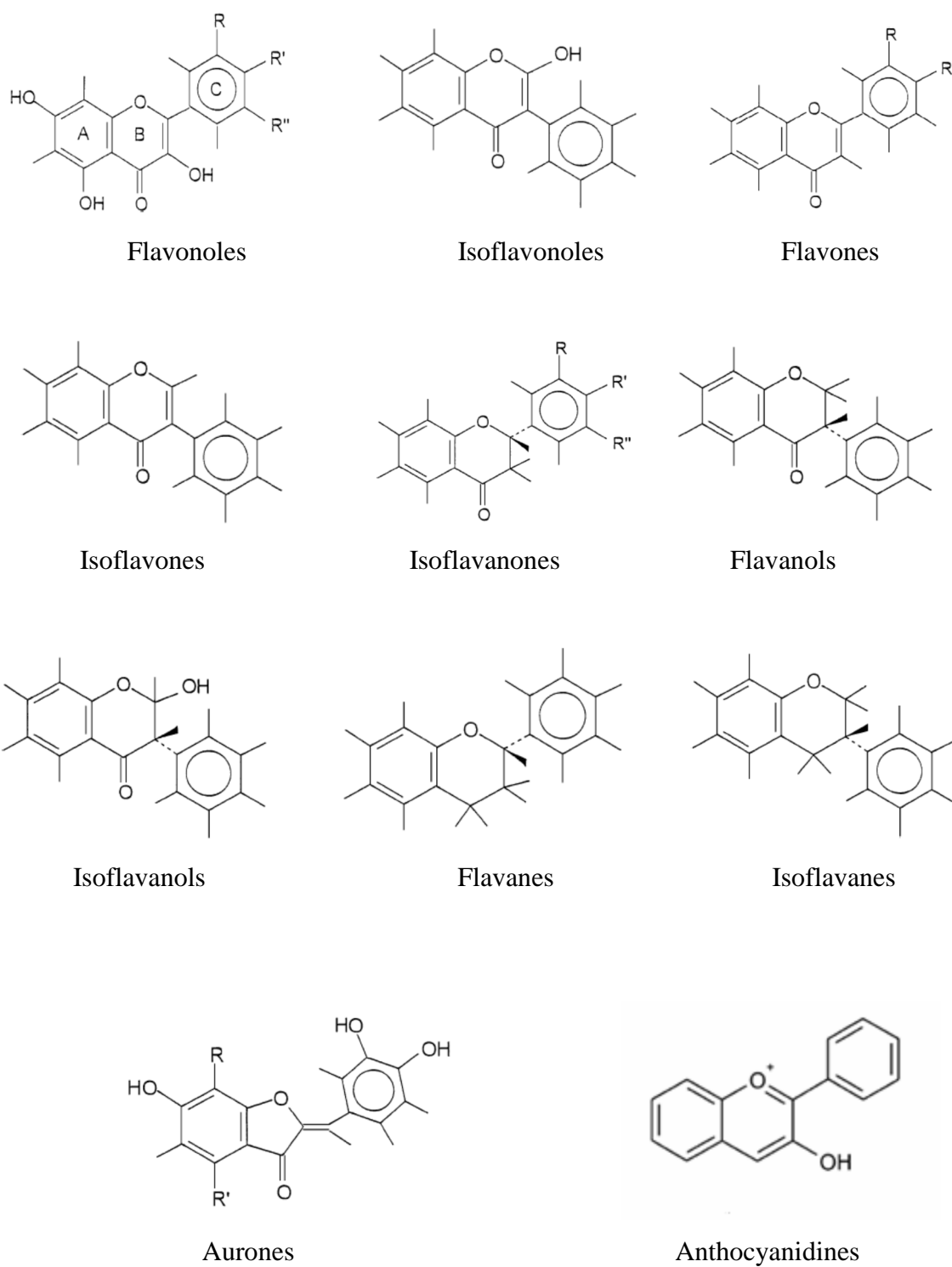


Figure 8 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002).

II-3-3- Anthocyanosides :

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (**Bruneton, 1993**). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylium. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (**Bahorum, 1997**).

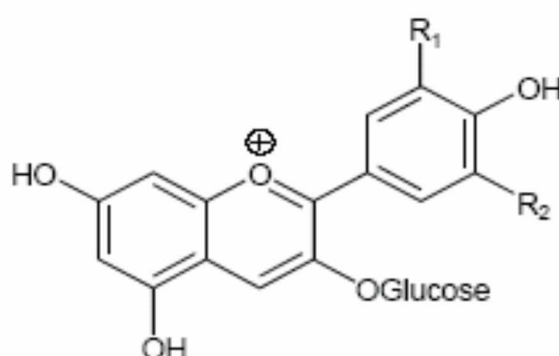


Figure 9 : Structure des anthocyanosides (**Bahorum, 1997**).

II-3-4-Tannins :

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Haslam, 1996 ; Cowan, 1999**). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Scalbert, 1991**). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

- ✚ **Tannins hydrolysables** qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (**figure 10**) (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).

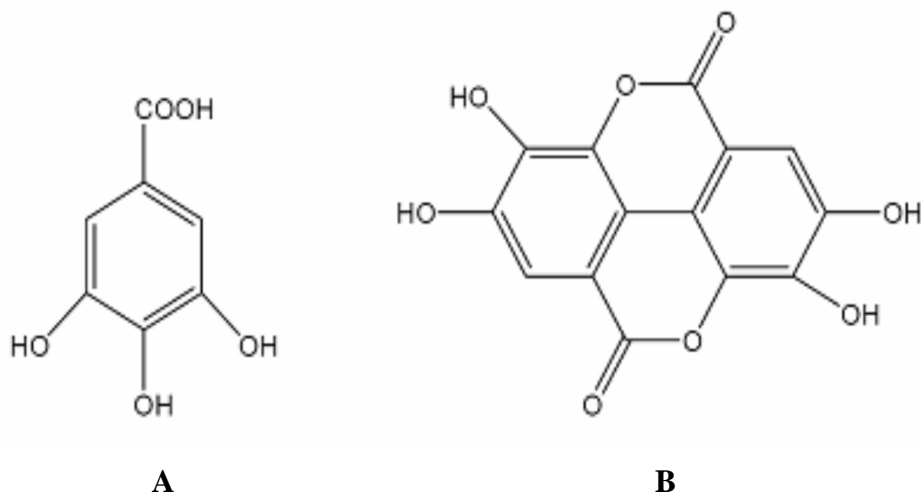


Figure 10: Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

✚ *Tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols* qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit de polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (**Bruneton, 1999**).

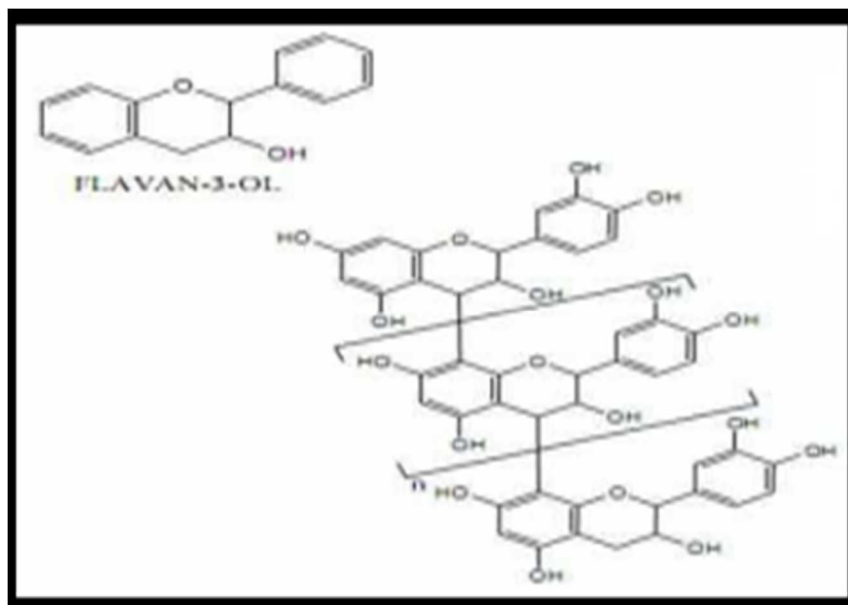


Figure 11: Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

II-3-5-Phénols simples et les acides phénoliques :

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

II-3-5-1-Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque :

Les acides phénols en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique (**Bruneton, 1993**).

II-3-5-2-Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique :

La plupart des acides phénols en C₆-C₃ (acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents (**Bruneton, 1993**). Les acides cinnamique et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation (**Cowan, 1999**).

II-3-5-3-Phénols simples :

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Cowan,1999**).

II-3-6- Coumarines :

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (**O’Kennedy et Thornes, 1997**) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l’état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l’odeur caractéristique du foin (**Cowan, 1999**).

II-3-7- Quinones :

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l’oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Elles sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan, 1999**).

II-3-8- Stilbènes :

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₂-C₆ comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l’attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (**Crozier et al., 2006**).

II-4- Propriétés biologiques des polyphénols :

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergiques, anti-atherogéniques, anti-inflammatoires, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (**Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007**). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle

important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de

l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001).

Les effets bénéfiques **des polyphénols** intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle *et al.*, 2004).

En ce qui concerne **les flavonoïdes**, ces composés peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes (Hodek *et al.*, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker *et al.*, 1996 ; Benavente-Garcia *et al.*, 1997). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Anderson *et al.*, 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres parts, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et le fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (Hennebelle *et al.*, 2004).

Les **anthocyanes** sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (vigne rouge, *Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.) (Hennebelle *et al.*, 2004). Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes, les anthocyanidines ont montré leur effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines (Zhang *et al.*, 2005).

Les **tanins** sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (Chung *et al.*, 1998). Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (chêne, *Quercus* spp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* spp.) seraient de bons sédatifs cardiaques (Hennebelle *et al.*, 2004). Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (Rahman *et al.*, 2006), ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro* (Yoshida *et al.*, 1999).

Les **coumarines** sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (Hennebelle *et al.*, 2004). Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (Anderson *et al.*, 1996).

Les **acides phénols et ces dérivés** sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (Hennebelle *et al.*, 2004). Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (Bossokpi, 2002). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un

traitement efficace pour ce type de cancer (**Kawada et al., 2001 in Rangkadilok et al., 2007**). Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (**Lee et al., 2005**).

Certaines **quinones**, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), les sénés (*Cassia* spp.) et les aloès (*Aloe* spp.). D'autres activités antidépressives (hypericin), anti-protozoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable. (**Bruneton, 1993 ; Hennebelle et al., 2004**).

Introduction :

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants en faveur des oxydants, entraînant des dommages cellulaires (Atamer, 2008). Il se développe lorsque les radicaux libres (molécules oxydantes) sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par les systèmes de défense antioxydant. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire (Picchi, 2006), un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, pollution atmosphérique, métaux toxiques) (Moller et al., 1996 ; Valko et al., 2006; Valko et al., 2005).

III-1- Les radicaux libres :

III-1-1-Définition :

Un 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. (Benhaamou, 2012).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques atomiques ou moléculaires contenant un électron libre ou plus non appariés. Les réactions chimiques donnent naissance à ces espèces pour catalyser le milieu et elles disparaissent à la fin de la réaction. (ALI KALLA, 2012)

III-1-2- types des radicaux libres :

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les **radicaux primaires** à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}). (Benhaamou, 2012)

Les autres radicaux libres, dits **radicaux secondaires** telles que l'oxygène singulier O_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).

La durée de vie des radicaux libres est très courte, elle est d'ordre de picoseconde (10^{-12} seconde). La caractéristique commune des radicaux libres est la grande réactivité chimique (**Benhaamou, 2012**). Le volume, la position stérique et la mésomérie de l'atome ou la molécule sont directement liés à la stabilité des radicaux libres. (**Benhaamou, 2012**)

III-1-2-1- Radicaux libres actifs (radicaux non stables):

Ce sont des radicaux libres de très courte durée de vie, de petite masse atomique ou moléculaire et d'une énergie d'activation qui tend vers le zéro. A titre d'exemple de cette famille on cite: H_2O^+ , $I_2^{\cdot-}$, $O^{\cdot}H$, NO^{\cdot} , CH_5^+ , $C^{\cdot}H_3$. (**Benhamou, 2012**).

II-1-2-2- Radicaux libres stables:

Ce sont des radicaux libres de grande durée de vie qui passe de quelques secondes à quelques heures voire quelques jours. Ces radicaux sont caractérisés par leur grande masse moléculaire et leur très grande stabilité et par suite leur énergie d'activation très limitée. Les radicaux libres issus des corps aromatiques présentent les exemples les plus concrets de cette famille à l'image du triphénylméthyle (TP₃M), les radicaux issus du diphenylpicrylhydrazyle (DPPH) et les radicaux du diphenyle d'oxyde nitrique (Ph₂NO). (**Benhamou, 2012**).

III-3- Origine de production des ERO :

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et Hausswirth, 2006**). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- Des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (**Arausseau, 2002**) ;
- Des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (**Milan, 2004 ; Van Antwerpen, 2006**) ;
- Du système xanthine déshydrogénase/ oxydase activé lors d'ischémie-reperfusion (**Li et al., 2002 ; Valko et al., 2004 ; Valko et al., 2006**) ;
- D'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement (**Tamer, 2003**).

III-4- Réactions auto oxydantes:

Un nombre très important de réaction d'oxydation en chimie organique fait appel au mécanisme des radicaux libres. L'oxydation organique est par définition l'effet de l'oxygène de l'air sur les corps organiques en présence des facteurs et des conditions favorisant l'oxydation. Citons les initiateurs aux radicaux libres et la sensibilité des réactifs à l'absorption de la lumière (**Turbo, 1982**).

La décomposition des produits alimentaires est l'un des sujets importants de l'auto-oxydation organique. Les chaînes carboniques non saturées des acides gras s'oxydent facilement en acides carboxyliques de masses moléculaires inférieures et caractérisés par une odeur désagréable. Notons comme exemple de cette auto-oxydation la consommation des produits alimentaires par exposition à l'air ou à la lumière pour une grande durée. La peroxydation des solvants par action de l'oxygène de l'air est un second exemple de cette gamme de réaction (**Vollhardt et Chore, 1999**).

III-5- Réactions d'oxydations dans le système biologique:

Les réactions radicalaires, sans aucun doute, contribuent à la croissance du corps humain et à sa conservation (**Dominique, 2004**). Ceux-ci sont dus au rôle important des réactions dans les manifestations biologiques (**ALI KALLA, 2012**), vu la présence des radicaux libres dans les cellules humaines, particulièrement dans l'étape d'autoplastie biosynthèse ou durant l'étape de destruction des corps bioactives (**Olive, 1998**). L'oxygène est l'élément de base dans les cellules où se passent l'oxydation, cette oxydation n'est que l'effet de l'oxygène sur les différents corps organiques de la cellule. L'importance de cette réaction réside dans l'obtention de la quantité d'énergie nécessaire pour la formation d'autres corps organiques notamment les corps cellulaires. Une partie de cette énergie a pour destination d'effectuer les différentes activités fonctionnelles (mouvements, croissance, ingestions, dégagements ...) (**Favier, 2003**).

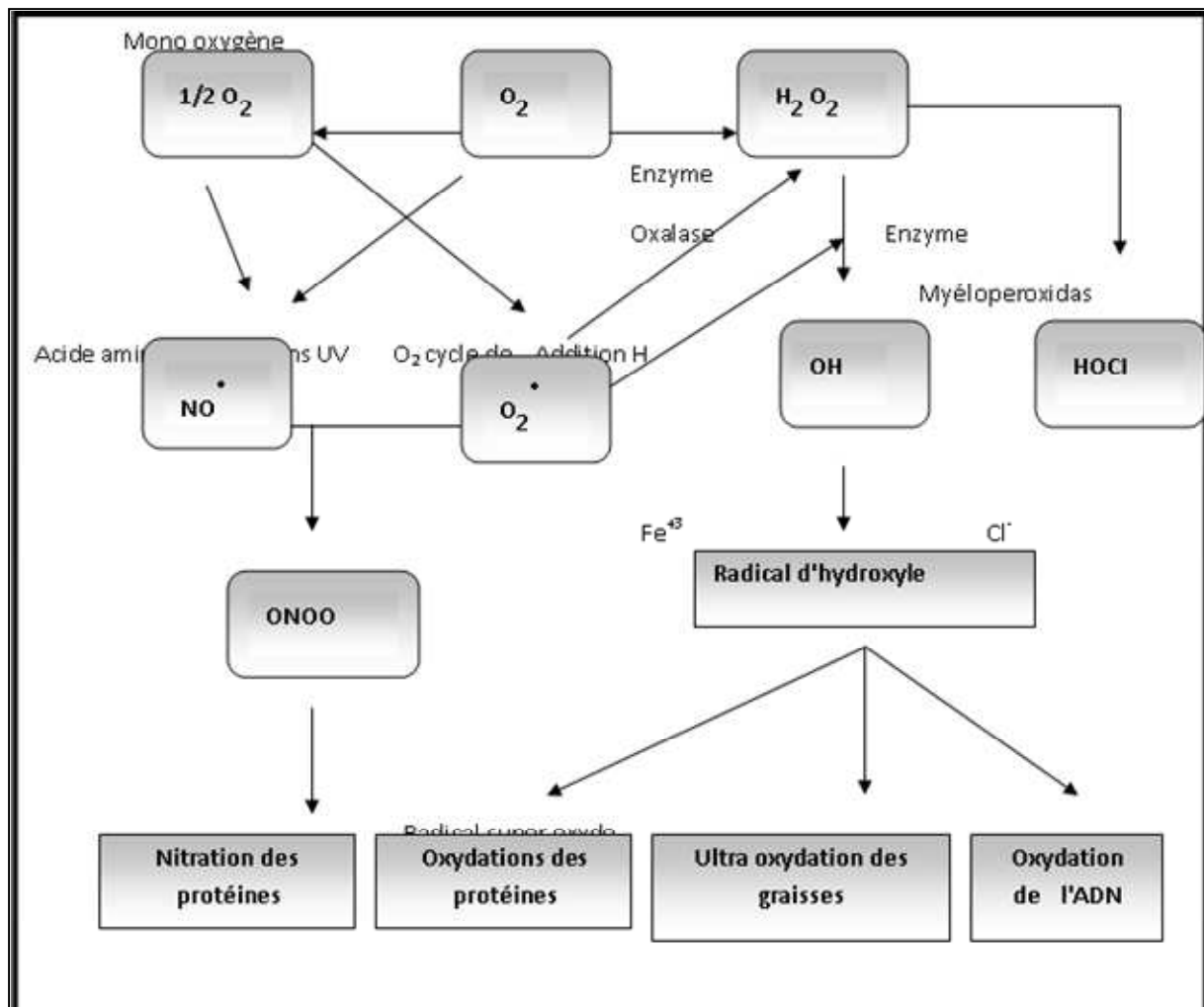
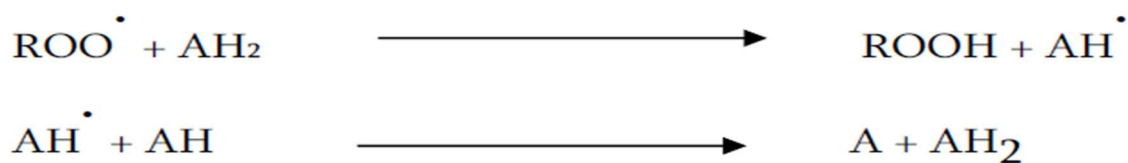


Figure 12 : Organigramme des origines des radicaux libres oxydants et les types des réactions d'oxydation appliquées en biologie (ALI KALLA, 2012)

III-6- Définition des antioxydants:

Les antioxydants sont des corps donneurs d'atomes d'hydrogène (Hilcentr, 2003), ou des molécules qui, par action sur les radicaux, les transforment en corps stables. Les équations suivantes schématisent ces réactions :



III-7- Dommages oxydatives des radicaux libres :

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (**Rahman, 2002**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (**Aurausseau, 2002 ; Valko et al., 2006**). Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies (**Aruoma, 1998**). Parmi les, nous citons, les maladie d'Alzheimer (**Smith et al., 1996 ; Smith et al., 2004**), de Parkinson (**Bolton et al., 2000**), de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (**Ali et al., 2008**), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (**Jha et al., 1995**), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (**Georgetti et al., 2003**) et le cancer (**Ali et al., 2008**).

III-8- Moyens de défense contre les radicaux libres :

D'après **Halliwel (1994)**, un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

Les systèmes de lutte contre les **ERO** sont classés dans 3 catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (**Viot, 2004**).

III-8-1- Prévention à plein temps :

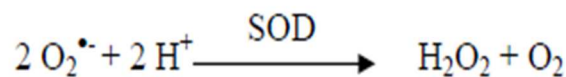
Ce type est un système qui agit en permanence pour but de prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres. (**Nabila, 2012**).

III-8-2- Détoxification active suite à une attaque oxydante :

Ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes (Valko *et al.*, 2006).

III-8-2-1- Super oxyde dismutase (SOD) :

Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde (H₂O₂) et en oxygène.



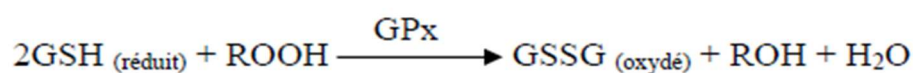
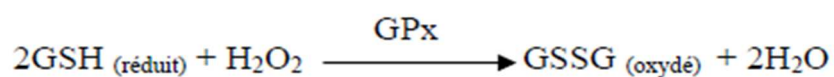
Dans l'être humain, il y a 3 isoformes des SOD à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (Landis et Tower, 2005).

III-8-2-2- Catalase :

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (Valko *et al.*, 2006). Elle permet de convertir deux molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂.

**III-8-2-3- Glutathion peroxydase :**

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Valko *et al.*, 2006).



III-8-3- Détoxification passive :

Elle permet la réduction des radicaux oxygénés qui ont pu passer les deux premières lignes de la défense. Elle incluse tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les polyamines, l'acide lipoïque, etc.... (Svoboda et Hampson, 1999 ; Valko *et al.*, 2006).

III-8-3-1- Vitamine E (tocophérol) :

Elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (Pryor, 2000 ; Valko *et al.*, 2006). Durant la réaction antioxydante, le α -tocophérol est converti en radical α -tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy).

III-8-3-2- Vitamine C (acide ascorbique) :

Ses propriétés antioxydants sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton. Ce radical peut facilement s'oxyder en captant l'anion superoxyde et certaines espèces radicalaires (perhydroxyles et peroxyles) (Valko *et al.*, 2006, Van Antwerpen, 2006).

III-8-3-3- Caroténoïdes :

L'activité antioxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure (Mortensen *et al.*, 2001). Généralement, elles interagissent avec les radicaux libres (ROO \cdot , R \cdot) par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical (El-Agamey *et al.*, 2004).

III-8-3-4- Acide lipoïque (acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque ; C₈H₁₄O₂S₂) :

Cet acide est aisément absorbé et converti rapidement dans de nombreux tissus à la forme réduite dithiol, l'acide dihydrolipoïque (**figure 13**) (**Smith et al., 2004**). Il joue un rôle important dans le piégeage des **ERO**, la régénération des antioxydants endogènes et exogènes tels que les vitamines C et E et le glutathion, la chélation des métaux Cu²⁺ et Fe²⁺ (**Valko et al., 2006**).

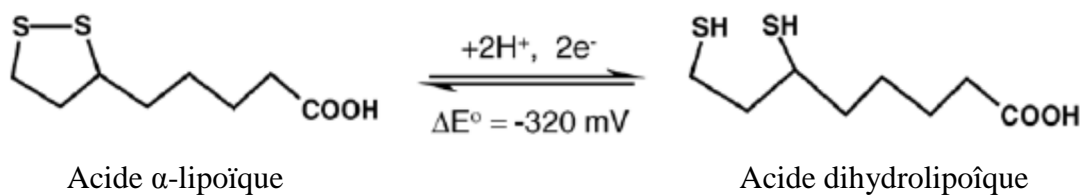


Figure 13 : Structure de l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque (**Valko et al., 2006**).

III-8-3-5- Alumine :

Il se trouve en grande quantité dans le plasma possède une fonction thiol qui lui permet de jouer un antioxydant puissant à fixer les différents métaux (Cu²⁺, Fe³⁺...) et de prévenir leur effets oxydants (**Halliwell et Gutteridg, 1990**)

III-8-3-6- Composés phénoliques :

Ces substances sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (**Rice-Evans et al., 1996 ; Kolesnikov et Gins, 2001**). Vue leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (**Rice-Evans et al., 1995; Cook et Samman, 1996; Valko et al., 2006**).

III-9- Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* :

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques (**Ali et al., 2008 ; Scherer et Godoy, 2009**). Elles peuvent être classées

en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang et al., 2005**).

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (**Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998**).

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habileté du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux ($HOCl$), de l'hydroxyle ($\cdot OH$), des anions superoxyde ($O^{\cdot-2}$), du peroxyde ($ROO\cdot$) et de l'oxyde nitrique ($NO\cdot$) (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Parmi ces techniques, nous citons :

- La méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao et al., 1993**) ;
- La méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) (**Miller et al., 1993**) ;
- La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) (**Benzie et Strain, 1996**) ;
- La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (**Brand-Williams et al., 1995**) ;
- La méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- diméthyl- ρ phenylenediamine) (**Li et al., 1994**) ;
- La méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) (**Winston et al., 1998**) ;
- La méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) (**Wayner et al., 1985**) ;
- La méthode photochimiluminescence (PCL) (**Popov et al., 1987**) ;
- La méthode d'hémolyse (**Charfi, 1995**).

Introduction :

De nos jours, la découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Ces composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à détecter et doser certains principes actifs existants dans la plante. Ces derniers peuvent servir à la découverte des agents thérapeutiques, économiques.

Avant d'entamer la partie matériels et méthode, il nous semble nécessaire de définir les objectifs de notre travail afin de justifier le choix des différentes techniques de manipulation

Notre étude a comme objectif de vise les principaux axes suivants :

- Faire un screening phytochimique afin de déterminer les différentes familles des composés chimique qui existent dans nos deux plantes
- Extraire quelques composés phénoliques afin de les mettre en évidence par des tests chimique et biologique.
- Quantifier quelques familles de ses principaux composés tels que les polyphénols.
- Evaluer le pouvoir antioxydant de nos extraits par la méthode de FRAP ainsi que par la méthode de réduction du radical libre DPPH•
- Evaluer l'activité antimicrobienne par le biais de 06 souches bactériennes et 02 souches fongiques à l'aide des tests de sensibilités afin de déterminer le pouvoir inhibiteur de nos extraits vis-à-vis ces différents microorganismes.

IV-1- Matière végétale :

IV-1-1- Le matériel végétal :

Les parties aériennes (feuilles et tiges) de nos deux plantes *Juniperus phoenicea* L. *Cotula cinerea* (Del)., ont été récoltées dans le sud de l'Algérie successivement dans la zone d'Arbaouat dans la wilaya d'El Bayadh et la zone d'Abadla à la wilaya de Béchar au mois de mai 2015..

Tableau 2 : superficies et coordonnées des zone de récolté

	Arbaouat	Abadla
Superficie	1 370 Km ² .	2 870 Km ²
Coordonnées	33° 05' 18" Nord ; 0° 34' 52" Est.	31° 01' 00" Nord 2° 44' 00" Ouest



Figure 14 : image satellite des zones de récolte à gauche **Arbaouat**, à droite **Abadla**

Les deux plantes ont été identifiées par **Pr Hasnaoui Oukacha**, professeur de botanique à la faculté de biologie à l'université de Saïda.

Au laboratoire, les parties aériennes récoltés ont été découpées en petites morceaux et séchées à l'ombre dans un endroit bien aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière, pour préserver le maximum l'intégrité des molécules.



Figure 15 : séchage de *Juniperus phoenicea* L.

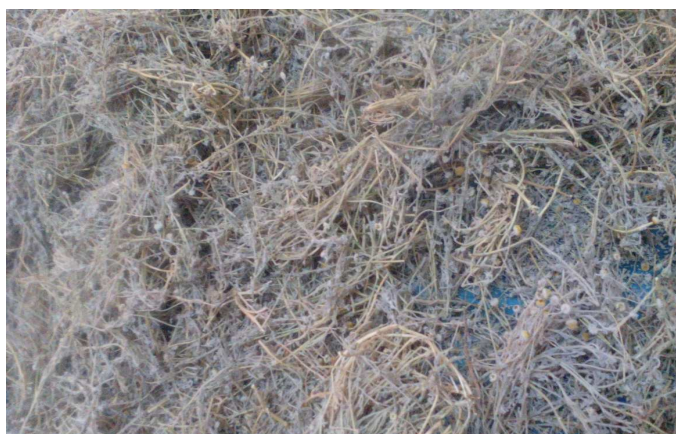


Figure 16: séchage de *Cotula cinerea* (Del).

Le matériel végétal préparé est broyé et soumis à des extractions afin d'extraire les différentes classes de composés chimiques contenues dans les deux plantes pour effectuer les tests phytochimiques.

IV-1-2-Préparation des extraits :

Les extractions solide / liquide de ces plantes ont été réalisées selon trois modes de préparation : infusion, décoction et macération décrits par **Paris et al., en (1969)**.

IV-1-2-1- Infusion en milieu aqueux:

- ✚ Verser 100 ml d'eau distillée bouillante sur 5g du matériel végétal.
- ✚ Agiter et laisser le mélange refroidir.
- ✚ Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

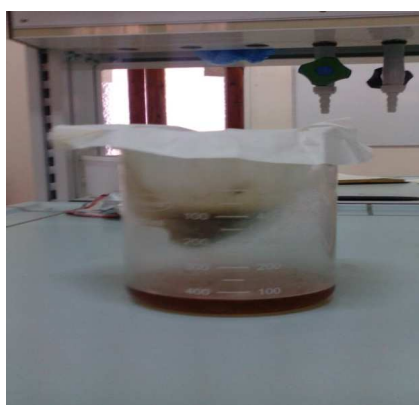


Figure 17: infusion du matériel végétal

IV-1-2-2- Décoction en milieu aqueux :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et à l'aide d'une plaque chauffante sous agitateur.

- ✚ Mélanger 5g du matériel végétal avec 100ml d'eau distillée.
- ✚ Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure.
- ✚ Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

IV-1-2-3- Décoction alcoolique :

- ✚ Mélanger 5g de matériel végétal avec 100ml d'éthanol.
- ✚ Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure.
- ✚ Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.



Figure 18: décoction du matériel végétal.

IV-1-2-4- Macération en milieu aqueux :

- ✚ Dans un Erlenmeyer, mettre 5g du matériel végétal avec 100ml d'eau distillée, sous agitation, à une température ambiante, pendant 24h.
- ✚ Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.

IV-1-2-5- Macération alcoolique :

- ✚ Dans un Erlenmeyer, mettre 5g du matériel végétal avec 100ml d'éthanol, sous agitation, à une température ambiante, pendant 24h.
- ✚ Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.



Figure 19 : Macération du matériel végétal.

Tous les extraits préparés pour le screening phytochimique sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière.

IV-2- Screening phytochimique :

Dans le cadre de la recherche de ces molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est préférable de déterminer leurs compositions chimiques par une étude phytochimique afin de détecter les classes des composés existants dans les différents organes des plantes.

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

IV-2-1- Différentes classes recherchées :

IV-2-1-1- Les tannins :

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleu-verte celle des tannins catéchiques (Trease et Evans, 1987).

IV-2-1-2- Les flavonoïdes :

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait éthanolique avec 1ml de HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des

flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (Cavé, 1993).

IV-2-1-3- Les anthocyanes :

Un volume de 2ml d'infusé aqueux est additionné à 2ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Debray *et al.*, 1971 ; Paris *et al.*, 1969).

IV-2-1-4- Les alcaloïdes :

Nous avons procédé à une macération de 24 heures de 2grammes de poudre végétale mélangés à 50ml de H₂SO₄ dilué au demi et à de l'eau distillée. Nous avons filtré le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50ml de filtrat. Ensuite nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons introduit 1ml du macéra. Nous avons ajouté dans le tube n° 1, 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le tube n° 2, 5 gouttes de réactif de Wagner.

La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (Paris *et al.*, 1969).

IV-2-1-5- Stérols et triterpènes :

Deux essais ont été effectués :

➤ **Essai 1 :** Test pour les stérols et stéroïdes :

Un volume de 10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme anhydre. Ensuite, on mélange 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C) (Trease et Evans, 1987).

➤ **Essai 2 :** Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques :

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydre acétique/ chloroforme (5/5 : V/V) ; puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (**réaction de Liebermann-Burchardt**).

Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques (Trease et Evans, 1987).

IV-2-1-6- Les saponosides :

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Nous avons procédé à une décoction de 2 grammes de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée qu'on porte à ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3cm de diamètre interne) avec 1,2, ... 10ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes.

Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en centimètre. Si elle est proche de 1 cm dans le 10^{ème} tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{Hauteur de mousse (en cm) dans le 10}^{\text{ème}} \text{ tube} \times 5 / 0,0 X$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (Dohou et al., 2003).

IV-2-1-7- Les composés réducteurs :

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer.

Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (Trease et Evans, 1987).

IV-2-1-8- L'amidon :

On chauffe 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaOH saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouter ensuite le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-violacé (Bruneton, 1999).

IV-3- Extraction des composés phénoliques :

Les extractions sélectives des principales familles des composés phénoliques ont été effectuées sur la partie aérienne des deux plantes étudiées la *Juniperus phoenicea* L. et la *Cotula cinerea* (Del) après avoir été broyées et soumis à un dégraissage à l'aide d'un Soxhlet et avec l'hexane comme solvant durant six heures.



Figure 20 : dégraissage par soxhlet.

IV-3-1- Extraction des polyphénols totaux :

La poudre (10 gramme) de partie aérienne pour les deux plantes est placée dans un Erlenmeyer contenant 100 ml d'une solution acétone/eau (70/30 ; V/V) pendant 24 heures. Après la filtration, les solutions acétone/eau sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type (**Heidolph Laborota efficient, WB eco**) à 60°C. Les résidus secs pesés sont repris par 3 ml de méthanol. (**Trease et Evans, 1987**).

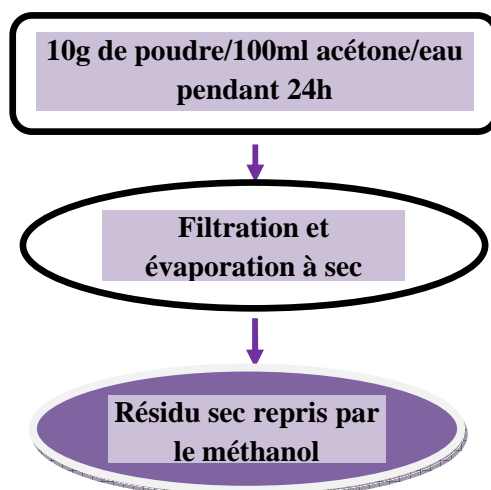


Figure 21 : Protocole d'extraction des polyphénols totaux.

IV-3-2-Extraction des flavonoïdes :

Les extractions des flavonoïdes de *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del.), sont réalisées par la méthode décrite par **Bekkara et al, (1998)** « fractions d'acétate d'éthyle et 1-butanol ».

Une masse de 15 gramme de tourteau (la poudre dégraissée) de la partie aérienne est mise en contact avec 100ml d'une solution de méthanol/eau (80/20 ; V/V) pendant 24 heures.

L'extrait récupéré est ensuite évaporé à sec ($T=60^{\circ}\text{C}$) à l'aide d'un rotavapeur type (**Heidolph Laborota efficient, WB eco**). Le résidu sec obtenu est partagé entre 15 millilitres d'acétate d'éthyle et 15 millilitres d'eau distillée chaude dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée puis séchée par un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par 3 ml de méthanol. La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est partagée avec 15 millilitres du 1-butanol. La phase 1-butanol est séchée au rotavapeur à 60°C . Le résidu sec pesé, est repris par 3 millilitres de méthanol.

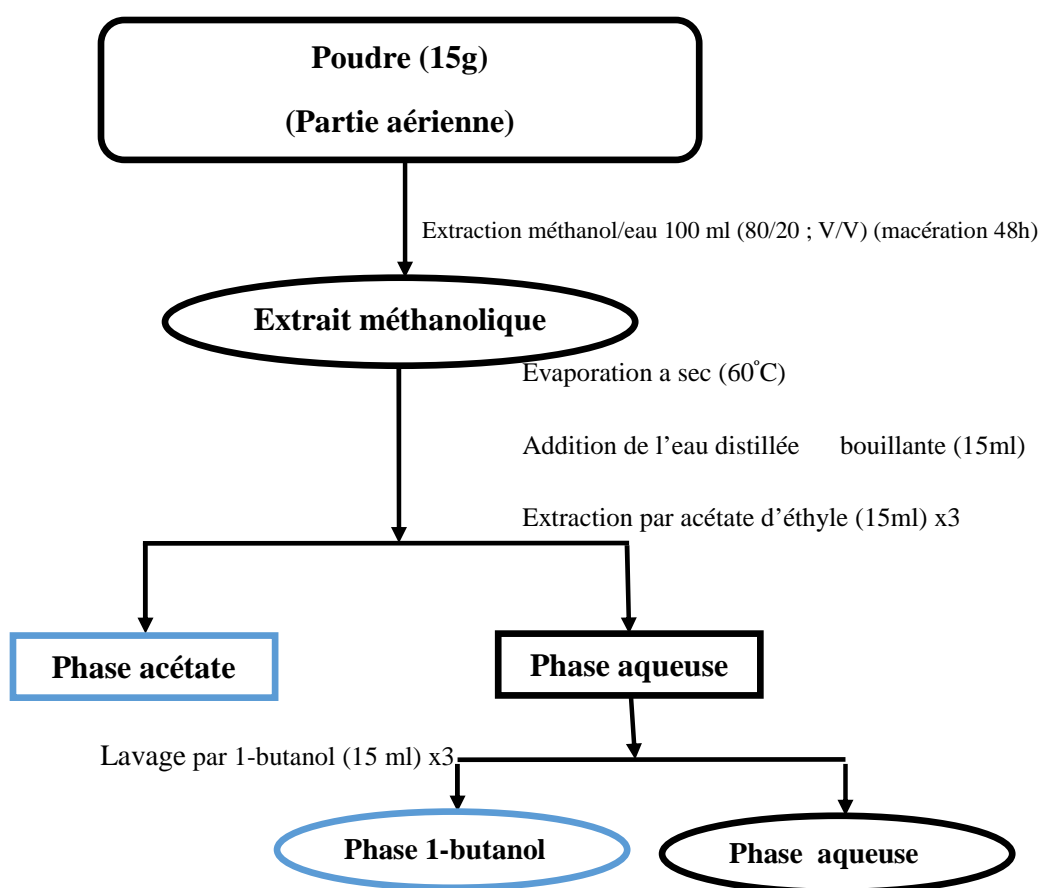


Figure 22: Schéma d'extraction des flavonoïdes (Bekkara et al., 1998).

IV-3-3-Extraction des tannins :

L'extraction des tannins est obtenue en suivant la méthode de **Zhang et al., en (2008)**. Le broyat (partie aérienne) correspondant à 15 grammes est extrait par 100 millilitres du mélange acétone/eau distillée (70/30 ; V/V) durant trois jours à la température ambiante. La solution est filtrée et évaporée à 40 °C à l'aide d'un rota-vapeur type (**Heidolph Laborota efficient, WB eco**) pour éliminer l'acétone. Puis, la phase aqueuse est lavée par 15ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides.

Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse est extraite trois fois avec 15 millilitres d'acétate d'éthyle. La phase organique ainsi obtenue est évaporée à sec à 40 °C puis pesée et reprise par 3 millilitres de méthanol.

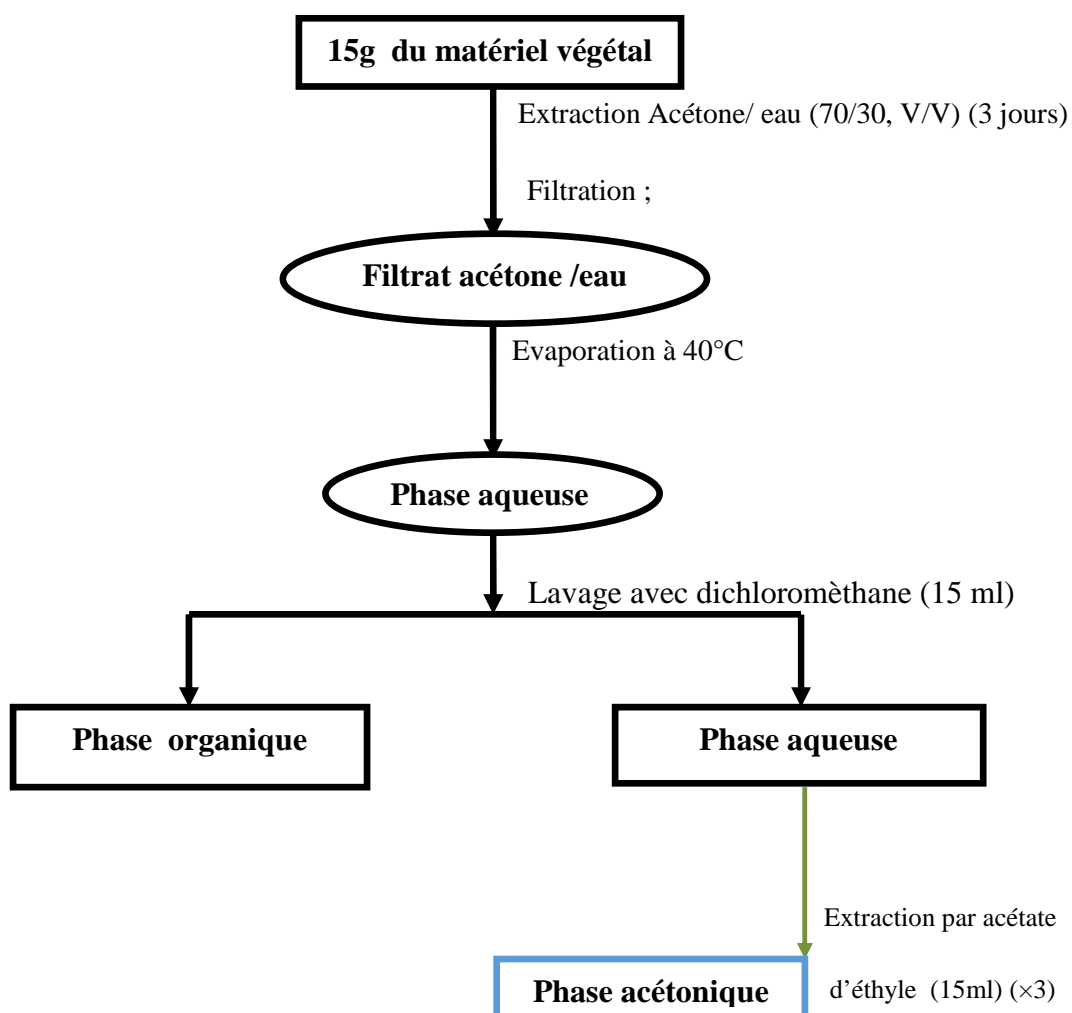


Figure 23: Protocole d'extraction des tanins.

➤ **Calcul des rendements en extraits secs :**

Nous pouvons déterminer le rendement de différentes parties pour les deux plantes en extraits secs en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt \%} = \frac{P_1 - P_2}{P_3} \times 100$$

- ◆ **P₁** : poids du ballon après évaporation ;
- ◆ **P₂** : poids du ballon avant évaporation ;
- ◆ **P₃** : poids de la matière végétale de départ.

IV-4- Dosage des composés phénoliques :

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits des parties aériennes et des racines de *Juniperus* et *Cotula* a été effectué spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu (Wong et al., 2006).

➤ **Principe :**

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéro-polyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéro-polyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (Daels-rakotoarison, 1999).

➤ **Mise en œuvre pratique :**

La teneur totale en phénols totaux des extraits bruts de la plante étudiée est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Wong et al., 2006 ; Biglari et al., 2008 ; Wang et al., 2008).

Une quantité de 100µl de l'extrait est mélangée avec 2,5ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) et laissée réagir pendant 5 minutes. 2,5ml d'une solution saturée de Na₂CO₃ sont ensuite ajoutés, après une heure à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 725nm (Wong et al., 2006).

Les résultats sont exprimés en milligrammes-équivalent d'acide gallique/gramme de matière végétale sèche.

Une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de l'acide gallique à différentes concentrations est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons.

IV-5- Étude de l'activité antioxydant :

IV-5-1- Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxydant power*) :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Pan et al., en (2008)**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} . La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm.

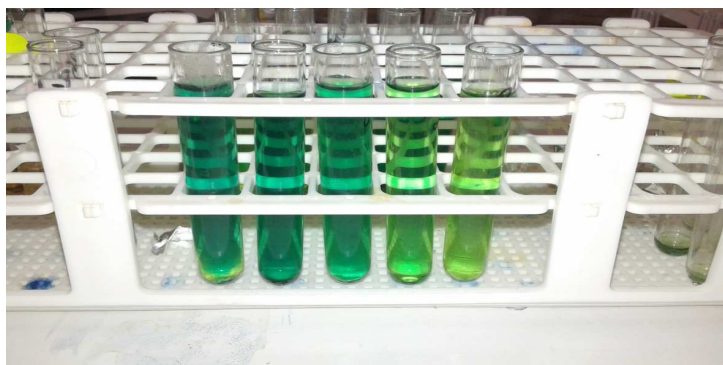


Figure 24: Réduction du fer ferrique en fer ferreux.

➤ Mise en œuvre pratique :

Un volume égal à 1ml de l'échantillon à différentes concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2mg/ml) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2M (pH = 6.6) et 2,5 millilitres d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 tpm pendant 10 minutes. 2,5ml du surnageant sont ajoutés à 2,5ml d'eau distillée et 500µl d'une solution de $(\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O})$ à 0.1% sont ajoutés également au mélange.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type (**BIBBY, Anadéo**).

L'acide ascorbique et le BHT sont utilisés comme contrôles positifs dans cette expérience aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

➤ Expression des résultats :

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes

concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

IV-5-2- Piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

Le DPPH[•] (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans UV à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Bozin *et al.*, 2008).

La méthode de DPPH[•] présente plusieurs avantages du fait qu'elle est indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH[•] (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH[•]. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.



Figure 25 : Réduction de radical DPPH[•] (de couleur violette au diphényl picryl-hydrazine (de couleur jaune).

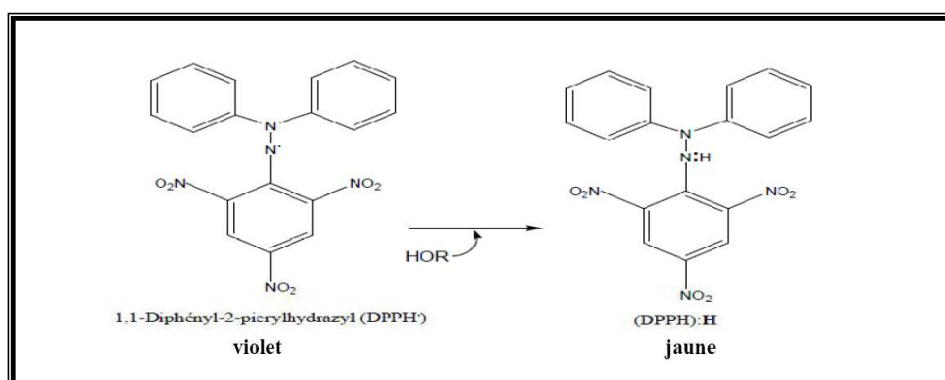


Figure 26: Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH[•]

➤ **Mise en œuvre pratique :**

Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH•, est celui de **Benhammou et al., (2007)**.

A différentes concentrations, 50µl de chaque extrait à différentes concentrations, sont ajoutés à 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH• à $6,34 \cdot 10^{-5}$ M (0,0025g dans 100ml méthanol) ; pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH• à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à la température ambiante, la réduction du DPPH• s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution.

La lecture des absorbances est effectuée à 515nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type **(BIBBY, Anadéo)**.

➤ **Expression des résultats :**

• **Calcul des pourcentages d'inhibition :**

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I\% = [(A_0 - A_T) / A_0] * 100$$

◆ A_0 : Absorbance du contrôle ;

◆ A_T : Absorbance du test effectué.

• **Calcul des IC₅₀ :**

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour *Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH•. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions logarithmiques des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées (**Bertoncelj et al., 2007 ; Marxen et al., 2007 ; Scherer et al., 2009 ; Fabri et al., 2009**).

IV-5-3- Calcul de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity) :

Nous pouvons déduire l'activité anti-radicalaire de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des IC₅₀ trouvées (**Maisuthisakul et al., 2007**).

$$AAR = 1/IC_{50}$$

L'activité antiradicalaire et les pourcentages d'inhibition sont comparés avec ceux de l'acide ascorbique.

IV-6- Etude de l'activité antimicrobienne :

Pour la mise en évidence de l'activité antibactériennes, six (06) souches bactériennes (03 souches à Gram positif et 03 souches à Gram négatif) et deux (02) levures ont été testées vis-à-vis des extraits sélectifs des parties aériennes de *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del).

Tableau 3 : Les différents microorganismes utilisés.

	Microorganisme	Référence	
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram +
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	Gram -
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790	

Les souches microbiennes ont été choisies soigneusement selon les différences de la structure de la paroi (Gram+ et Gram) et selon les dégâts potentiels qu'ils posent en clinique et le défi qu'ils opposent à l'antibiothérapie moderne.

IV-6-1- Préparation de L'échantillon d'extraits sélectifs :

Les extraits sélectifs des deux plantes sont dilués avec une petite quantité de DMSO afin d'obtenir une gamme de concentration allant de 100mg/ml à 0.024mg/ml.

IV-6-2-Préparation des précultures :

La sensibilité des bactéries et des levures vis-à-vis les extraits sélectifs peut être étudiée par la technique de culture en milieu liquide ou par la

technique de diffusion en milieu solide. Pour notre part nous avons utilisé la méthode de diffusion par disque en milieu solide coulé en boîte de pétri.

i. Bactéries :

Les six souches bactériennes conservées sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant 20ml de gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h, afin de stimuler leur croissance.

ii. Champignons :

Les levures sont ensemencées par la méthode des stries sur milieu *Sabouraud* en boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 25°C pendant 48h.

iii. Conservation des cultures :

La conservation des souches bactériennes se fait dans des tubes de gélose nutritive inclinée à une température de 4°C.

IV-6-3- Tests d'activité antimicrobienne des extraits :

IV-6-3-1- Préparation des inoculums :

L'activité antimicrobienne des extraits est tout d'abord analysée pour leur zone d'inhibition par la méthode de diffusion sur des milieux solides. Les inoculums sont préparés en diluant une masse cellulaire dans la solution de NaCl à 0,9 %, ajusté à l'échelle de McFarland 0,5, confirmée par une lecture spectrophotométrique sur le spectrophotomètre de type (**BIBBY, Anadéo**), à 625nm ($\lambda = 0,08 - 0,1$, correspondant à 10^8 UFC/mL) pour les bactéries et 530nm ($\lambda = 0,12 - 0,15$, correspondant à $1-5 \times 10^6$ UFC/mL) pour les levures. (**Pfaller et al.,1998**).

IV-6-3-2- Ensemencement et application des disques :

Un millilitre de suspension normalisée des micro-organismes testés (10^6 UFC/ml pour les levures et bactéries sauf, *S. aureus* à 10^7 UFC/ml a été répandu sur les plaques des milieux solides, de gélose de Mueller-Hinton pour les bactéries, et de Sabouraud pour les levures. (**Testoreet al.,2004**).

Les suspensions ont été ensemencées sur la surface, à l'aide d'un écouvillon, des plaques des milieux solides. Après séchage, un disque en papier stérile (6mm de diamètre)

imprégnés de 10 μ l des extraits sélectif (1mg/disque) ont été appliqués dans la boîte de Pétri. Un disque préparé dans le même État avec seulement le volume correspondant de DMSO a été utilisé comme contrôle négatif. L'activité a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone inhibitrice en mm après incubation à 37° C/24h pour les bactéries, à 30° C / 48h pour levures (**Beddou et al.,2014**). L'amoxicilline, l'ampicilline et la gentamicine ont été utilisés comme des témoins positifs contre toutes les souches.

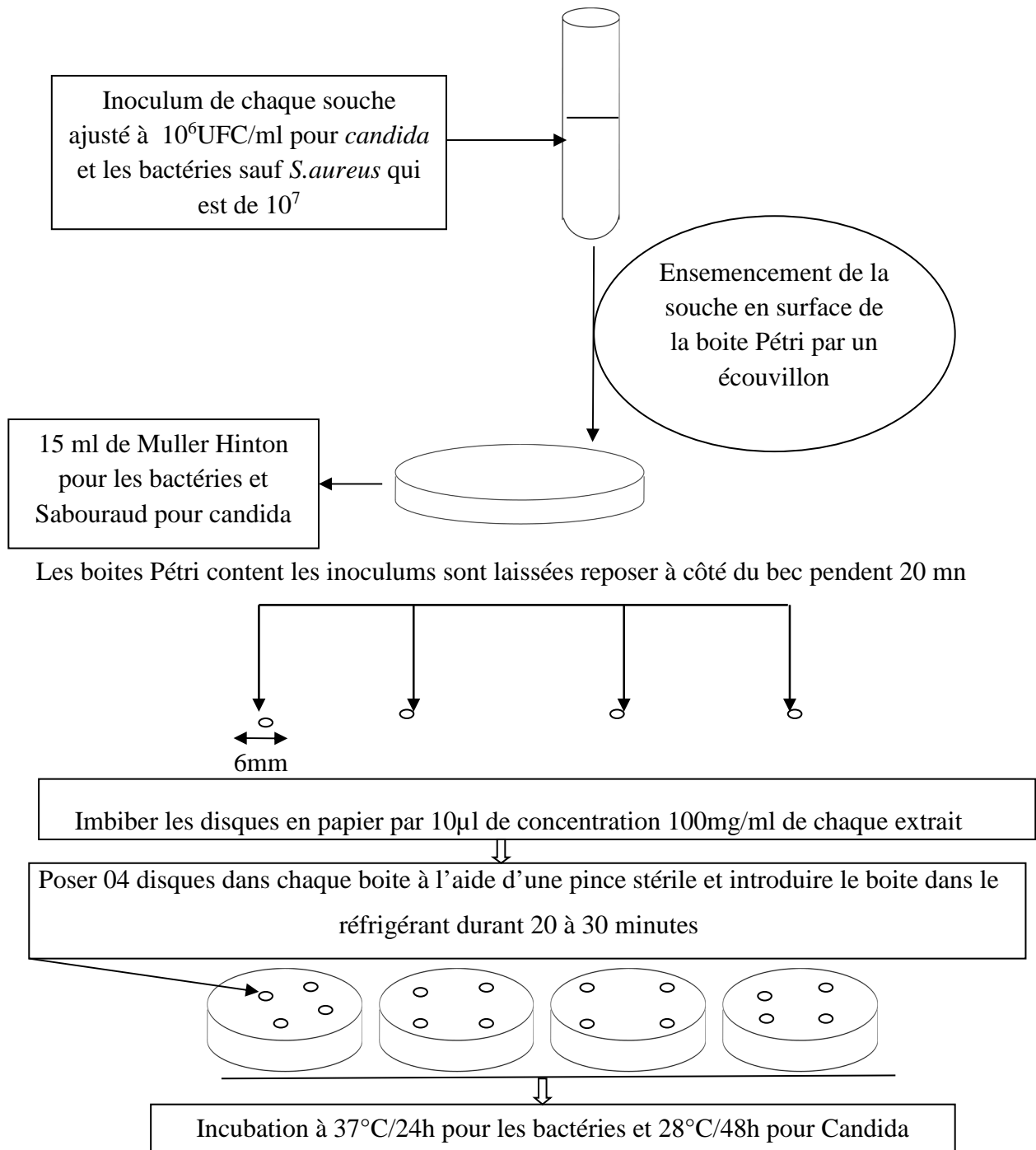


Figure 27 : Schéma descriptif de la préparation des disques et de l'ensemencement des souches microbiennes.

IV-6-3-3- Etude et détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode de microdilution sur bouillon tel que décrit par **Okusa et al, en (2007)** avec des modifications mineures. Les extraits sélectifs des plantes ont été dissous dans le DMSO (25mg/250µl) et ajusté jusqu'à 5ml avec Muller Hinton bouillon (pour essai antibactérien) ou Sabouraud Dextrose bouillon (pour le test d'anticandidal), la concentration finale de DMSO étant de 5%. Cette solution a été transférée en plaques 96 puits (200 µl/puits) et dilués en série (base 2 logarithmiques dilutions) avec Muller Hinton bouillon ou avec bouillon de Sabouraud Dextrose. Des cultures jeunes de 24h de souches microbiennes ont été remuées avec NaCl 0.9% pour atteindre 0,5 McFarland (10^8 cellules/ml pour les bactéries et 10^6 cellules/ml pour les levures), puis dilué à 1/100 pour atteindre 10^6 et 10^4 cellules/ml pour les bactéries et les levures, respectivement et inoculés dans les plaques de 96 puits (100 µl/puits). Les cultures ont été incubées à 37° C pendant 24h. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration de l'échantillon qui empêche la croissance des micro-organismes dans les puits de microdilution.

Les extraits avec CMI inférieure à 100 µg/ml sont considérés comme nettement actif, $100 < \text{CMI} < 625$ µg/ml sont considérés comme modérément actifs et les CMI les plus élevés que 625 µg/ml sont considérés comme faiblement active (**Kuete, 2010**).

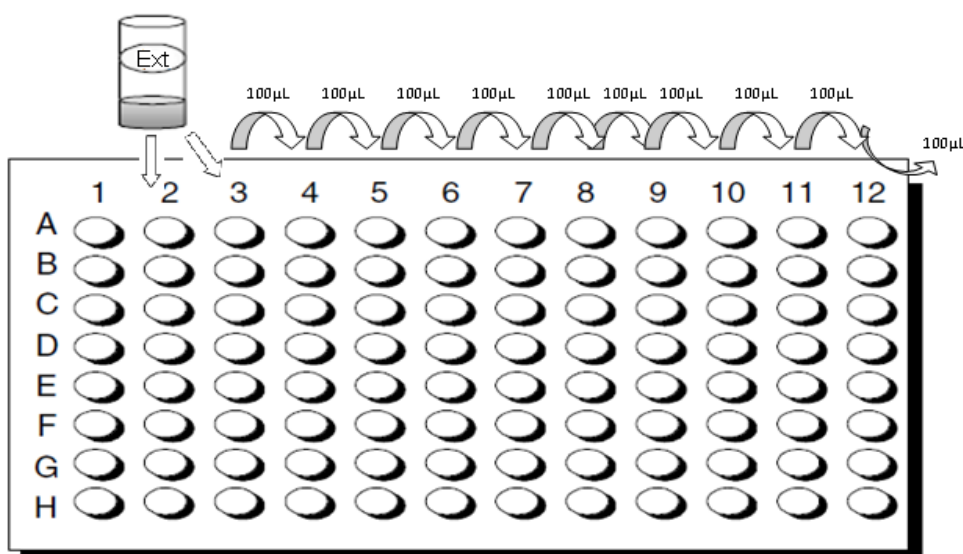


Figure 28 : Schéma descriptif de la Préparation et ensemencement des microplaques

V-1-Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés phénolique existantes dans la partie aérienne de *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del.), par des réactions de caractérisation qualitatives et semi quantitatives.

Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats expérimentaux du screening phytochimique sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Résultat du screening phytochimique

Composé cherché	plante	
	<i>Juniperus phoenicea</i> L.	<i>Cotula cinerea</i> (Del).
Tanins	++ tannins galliques	+ tannins catéchiques
Flavonoïdes	++	+
Anthocyanes	-	-
Alcaloïdes	+	+
Stérols et Triterpènes	+	+
Saponosides	+ I = 1100	+ I = 1400
Composés Réducteurs	-	-
Amidon	-	+

(+) = présence en faible quantité ; (++) = présence en quantité moyenne ; (-) = absence.

V-2- Extractions sélectives :

L'étude phytochimique basée sur des tests de laboratoire a permis de caractériser les familles de composés chimiques existantes dans nos plantes. Ceci nous a incités à effectuer

des extractions sélectives de ces derniers afin de déterminer leurs teneurs et étudier leurs activités chimiques et biologiques.

Tableau 5 : Rendement en extraits sélectifs

extrait plante	Polyphénols totaux	Tanins	Flavonoïdes fraction acétate	Flavonoïdes fraction 1-butanol
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	26 %	6.49 % ± 2.67	3.53 % ± 0.29	3.73 % ± 2.59
<i>Cotula cinerea</i> (Del).	27.7 %	4.89 % ± 1.48	3.18 % ± 0.50	1.22 % ± 0.03

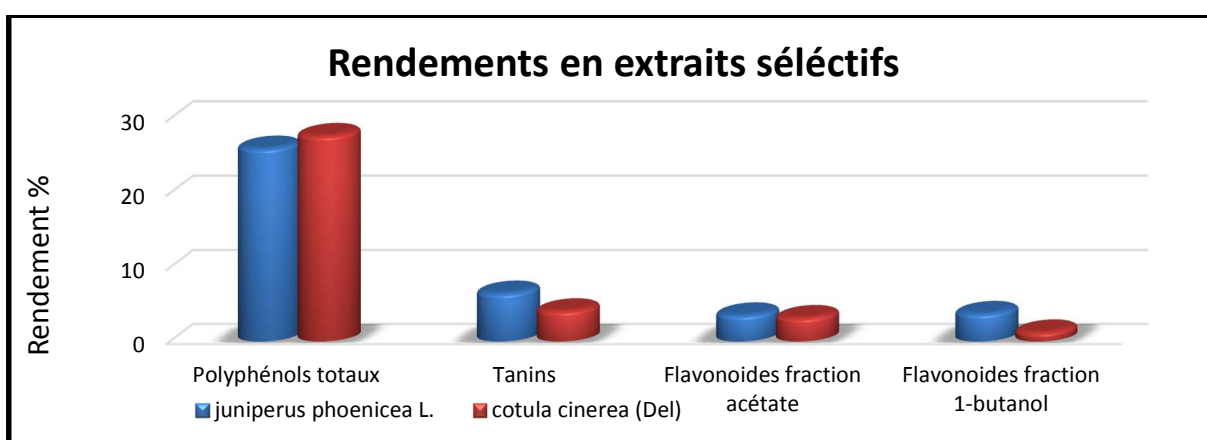


Figure 29 : comparaison entre les rendements en extraits sélectifs entre les deux plantes.

En effet et selon les résultats inscrits dans le **tableau (4)**, il est prouvé que les polyphénols sont présent en quantité très importante dans nos deux plante *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del.), avec des rendements quasi proches, les flavonoïdes et les tanins sont présents en quantités moins importantes chez les deux plante la quantité la plus faible est enregistrée chez *Cotula cinerea* (Del.), de l'ordre de (1.22%) en fraction 1-butanol des flavonoïdes

V-3- Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées parce qu'elles sont réputées pour leurs excellentes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Pour ces raisons, un dosage de ces composés a été effectué pour les deux plantes *Juniperus phoenicea* L. *Cotula cinerea* (Del) et ce, par la méthode spectrophotométrique

au réactif de Folin-Ciocalteu. Les teneurs obtenues sont exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau(5)**, La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans **la figure(30)**.

Selon les résultats du dosage de polyphénols on'a enregistré 217.2 et 276.74 mg EAG/g respectivement pour *Juniperus phoenicea* L. et *C. cinerea* (Del) , on remarque dans les deux plantes des teneurs relativement fortes en polyphénols totaux.

En définitif, on peut dire que la *Cotula cinerea* (Del)., possède une teneur en polyphénols relativement élevé proche à *Juniperus phoenicea* L. Ces résultats importants reflètent les données trouvées dans la **figure(29)** où nous avons enregistré des rendements élevés des polyphénols totaux ce qui prouve la richesse de chaque plante en polyphénols à savoir les flavonoïdes et les tanins.

Tableau 6 : résultats du dosage des polyphénols totaux

Plante	Polyphénols totaux en mg EAG/g
<i>Juniperus phoenicea</i> L	217.2
<i>Cotula cinerea</i> Del	276.74

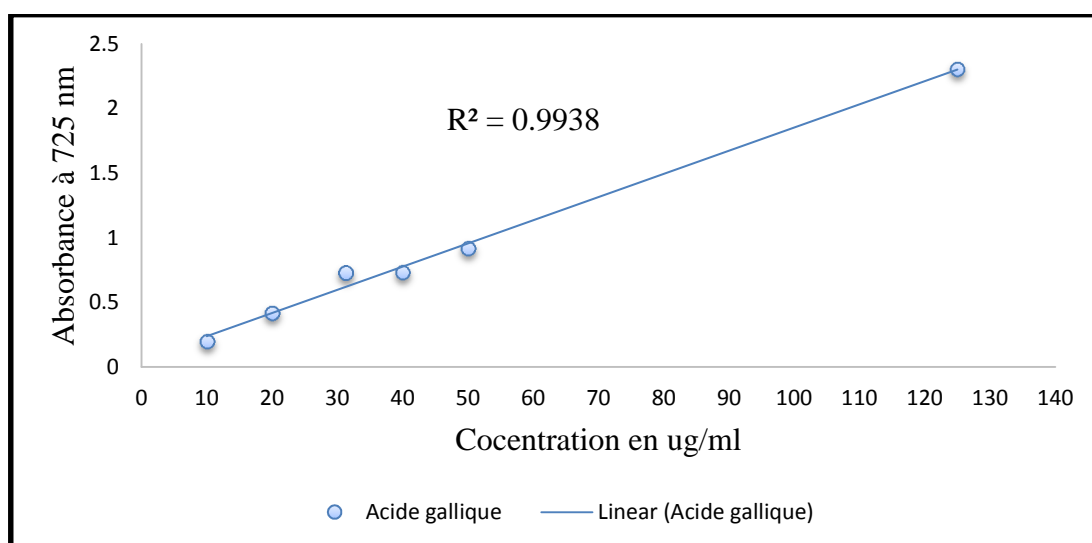


Figure 30 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

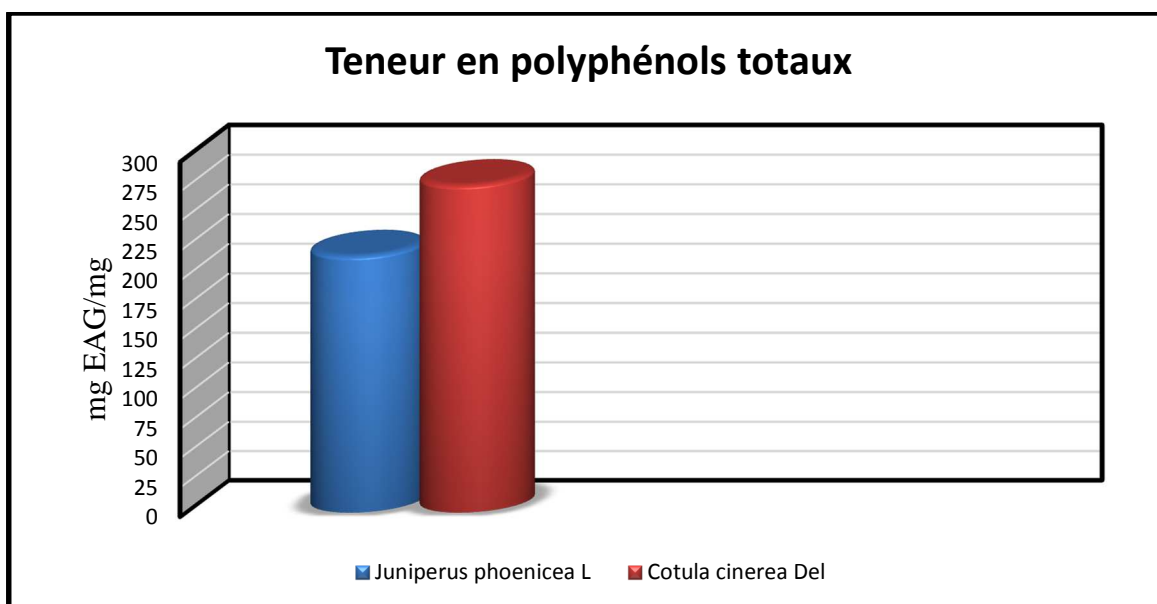


Figure 31 : comparaison entre les teneurs en polyphénols totaux dans les deux plantes.

V-4- Etude de l'activité antioxydante :

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des plantes a été réalisée par deux techniques chimiques (La réduction de fer (FRAP) et le piégeage du radical libre DPPH).

V-4-1- Réduction de fer (FRAP) :

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . Cette puissance de réduction est un des mécanismes antioxydants.

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les extraits sélectifs (polyphénols totaux, tanins et les deux fractions, acétate et 1-butanol, des flavonoïdes) des deux plantes étudiées *Juniperus phoenicea* L. et *C. cinerea* (Del). Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour les extraits. Les résultats représentés dans **les figures (32-33)** nous ont montré que la capacité de réduction du fer ferrique est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

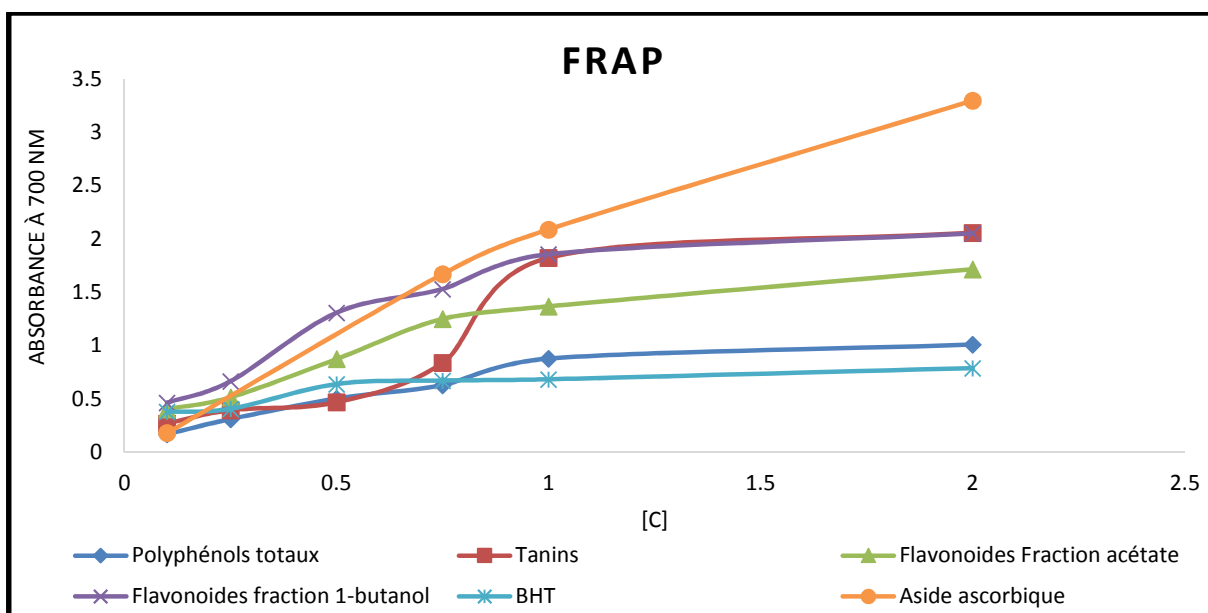


Figure 32 : Résultat de la méthode FRAP des extraits de *Juniperus phoenicea* L.

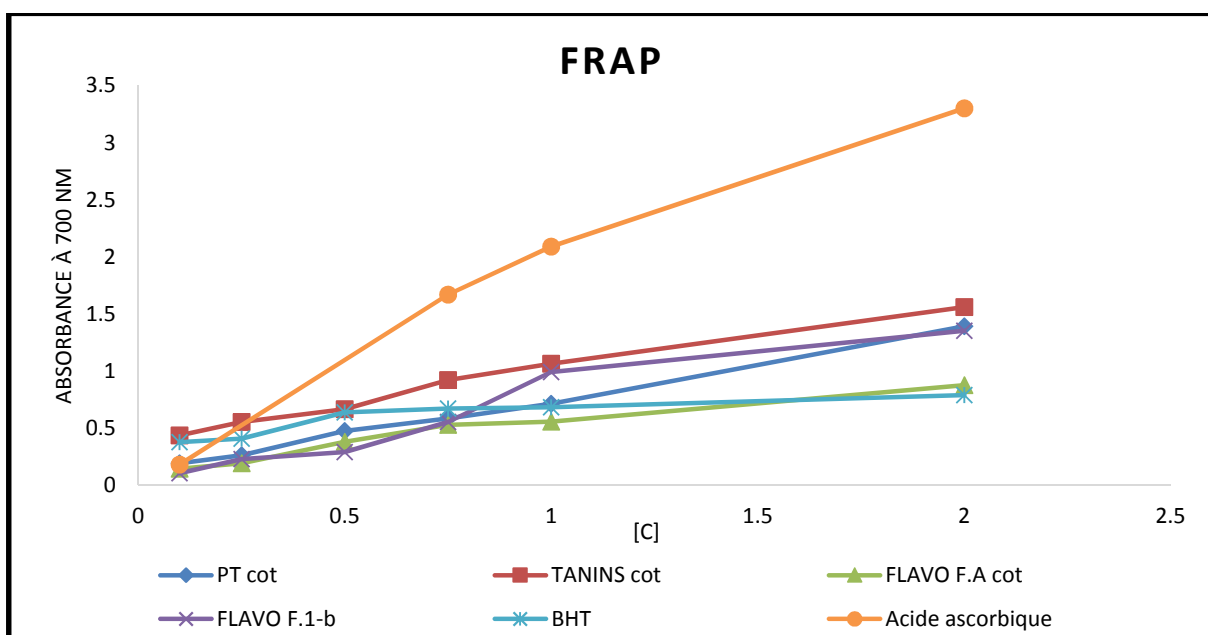


Figure 33 : Résultat de la méthode FRAP de *Cotula cinerea* (Del).

Pour les extraits sélectifs des deux plantes étudiées *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del.), le profil de réduction du fer augmente avec une élévation des concentrations utilisées. Cette augmentation est plus marquée dans le cas des tanins et des flavonoïdes fraction 1-butanol de *Juniperus phoenicea* L., avec ($D_{0} = 2.059$ - $D_{0} = 2.052$) respectivement.

Nous remarquons qu'à la concentration de 2 mg/ml, les polyphénols, les tanins, les flavonoïdes fraction acétate et les flavonoïdes fraction 1-butanol de *Juniperus phoenicea*

L., et les les polyphénols, les tanins, les flavonoïdes fraction acétate et les flavonoïdes fraction 1-butanol de *Cotula cinerea* (Del)., ont une capacité élevées à réduire le fer avec des Do : (dans l'ordre Do = 1.009 - Do= 2.059 - Do = 1.71 – Do = 2.052 – Do = 1.39 – Do = 1.55 – Do = 0.877 - Do= 1.353), comparativement à celle du BHA et moyenne comparativement à celle de l'acide ascorbique (Do = 0.789 – Do = 3.3), respectivement.

V-4-2- Piégeage du radical libre DPPH[•] :

Le pouvoir antioxydant des extrais sélectif augmente en fonction de la concentration avec des IC₅₀ relativement considérable ce qui indique que nos deux plantes possède un pouvoir fortement considérable à réduire le radical libre DPPH[•].

Tous les extraits ont montré des pouvoir de piégeage du radical DPPH[•] proche avec celui de l'acide ascorbique (IC₅₀ d'acide ascorbique 0.20mg/ml) sauf les deux fractions des flavonoïdes de *Juniperus phoenicea* L., qui ont montré des IC₅₀ plus forte que celle de l'acide ascorbique (**0.19mg/ml**) pour la fraction acétate et (**0.08mg/ml**) pour la fraction 1-butanol.

A partir de ces résultats enregistrés lors de notre étude on peut déduire que la *J. phoenicea* possède un pouvoir anti oxydant plus fort que la *C. cinerea*.

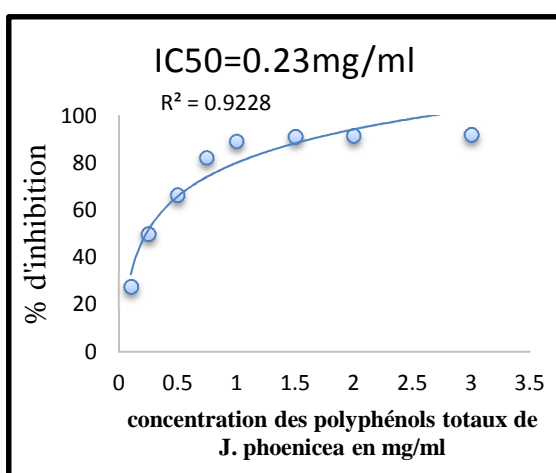


Figure 34 : Pouvoir antioxydant des

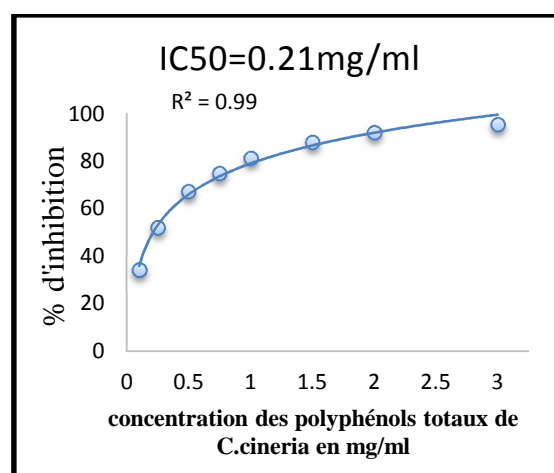


Figure 35 : Pouvoir antioxydant des

polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L. Polyphénols totaux de *Cotula cinerea* Del.

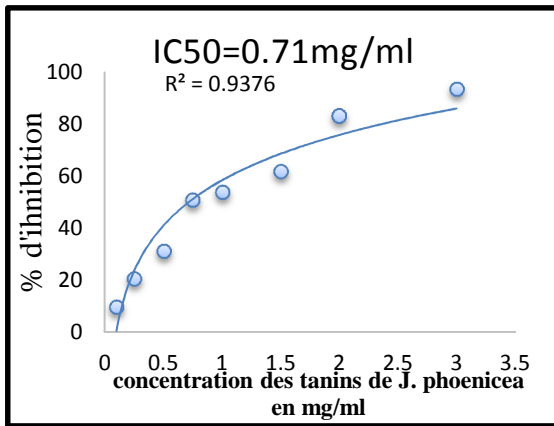


Figure 36: Pouvoir antioxydant des Tanins de *Juniperus phoenicea* L.

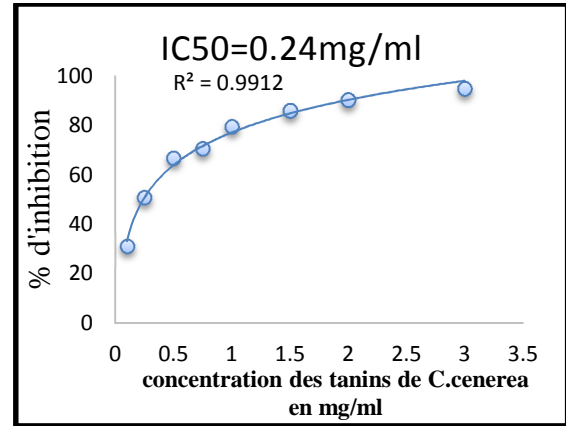


Figure 37 : Pouvoir antioxydant des de *Cotula cinerea* (Del).

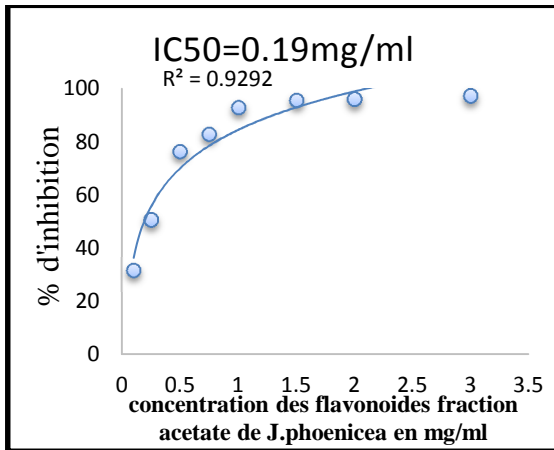


Figure 38 : Pouvoir antioxydant des Flavonoïdes fraction acétate de *Juniperus phoenicea* L.

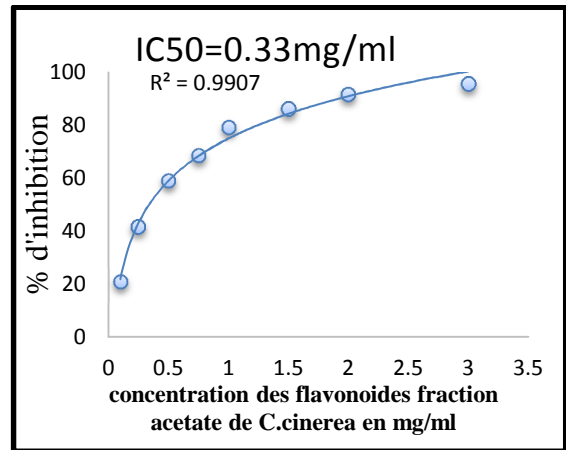


Figure 39 : Pouvoir antioxydant des Flavonoïdes fraction acétate de *Cotula cinerea* (Del).

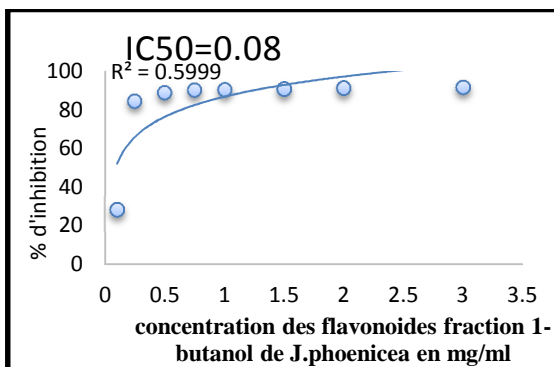


Figure 40 : Pouvoir antioxydant des Flavonoïdes fraction 1-butanol de *Juniperus phoenicea* L.

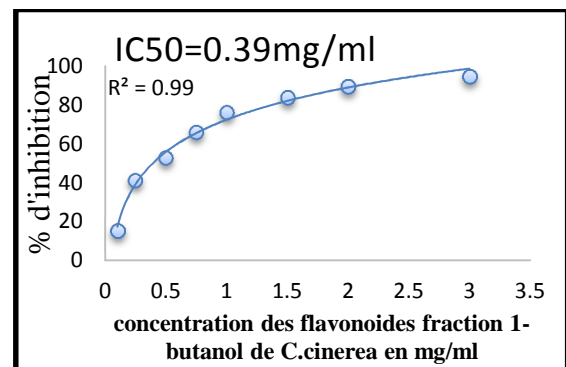


Figure 41 : Pouvoir antioxydant des Flavonoïdes fraction 1-butanol de *Cotula cinerea* (Del).

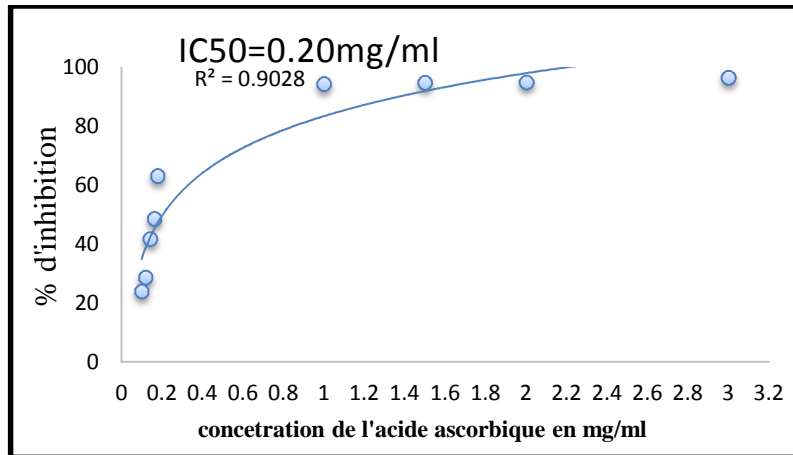
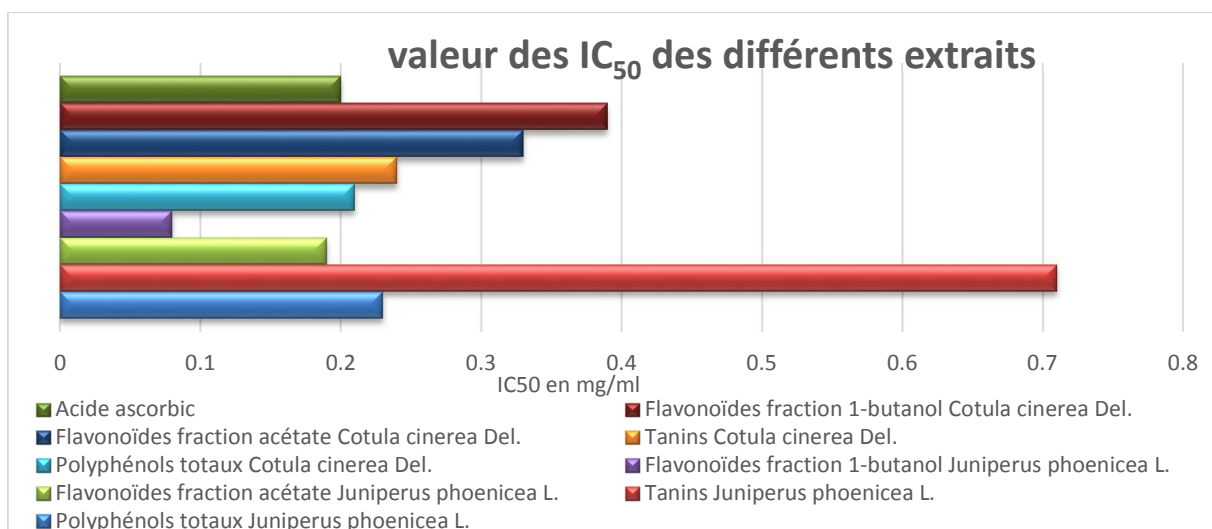


Figure 42 : pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique

Tableau 7 : les valeurs des IC₅₀ des différents extraits

Extrait	IC ₅₀ en mg/ml
Polyphénols totaux <i>Juniperus phoenicea</i> L.	0.23
Tanins <i>Juniperus phoenicea</i> L.	0.71
Flavonoïdes fraction acétate <i>Juniperus phoenicea</i> L.	0.19
Flavonoïdes fraction 1-butanol <i>Juniperus phoenicea</i> L.	0.08
Polyphénols totaux <i>Cotula cinerea</i> Del.	0.21
Tanins <i>Cotula cinerea</i> Del.	0.24
Flavonoïdes fraction acétate <i>Cotula cinerea</i> Del.	0.33
Flavonoïdes fraction 1-butanol <i>Cotula cinerea</i> Del.	0.39
Acide ascorbique	0.20

Figure 43 : Comparaison entre les IC₅₀ des différents extraits

V-4-3- Activités antiradicalaire (AAR) : 1/IC₅₀

Tableau 8 : Activité antiradicalaire des différents extraits :

Extrait	AAR
Polyphénols totaux <i>Juniperus phoenicea</i> L.	4.34
Tanins <i>Juniperus phoenicea</i> L.	1.4
Flavonoïdes fraction acétate <i>Juniperus phoenicea</i> L.	5.26
Flavonoïdes fraction 1-butanol <i>Juniperus phoenicea</i> L.	12.5
Polyphénols totaux <i>Cotula cinerea</i> (Del).	4.76
Tanins <i>Cotula cinerea</i> (Del).	4.16
Flavonoïdes fraction acétate <i>Cotula cinerea</i> (Del).	3.03
Flavonoïdes fraction 1-butanol <i>Cotula cinerea</i> (Del).	2.56
Acide ascorbique	5

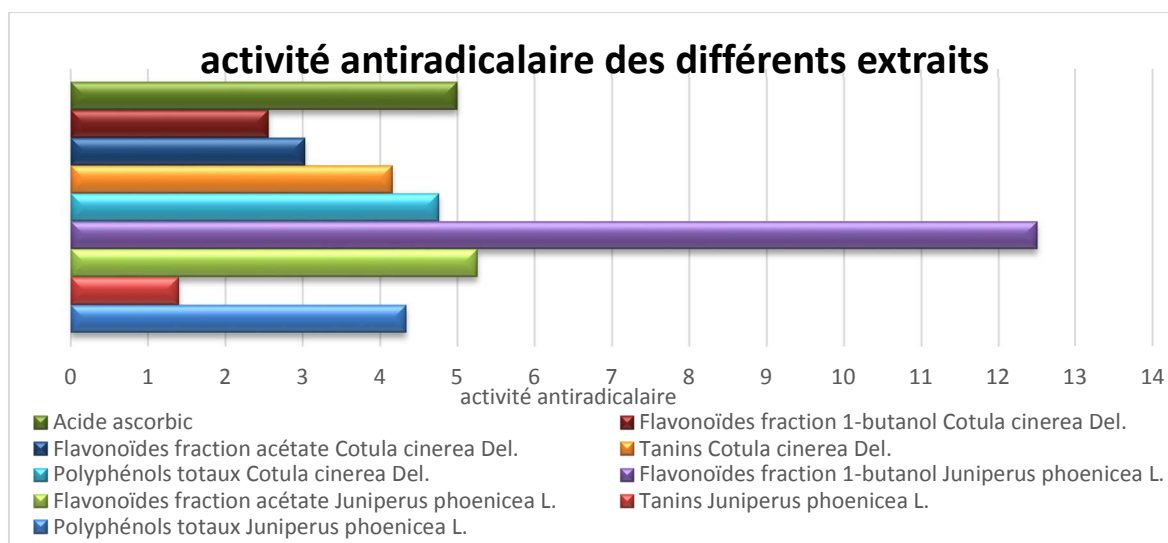


Figure 44 : comparaison entre les activités antiradicalaires des différents extraits

V-5- Activités antimicrobienne :

V-5-1- Testes de sensibilité : Méthode de diffusion sur disques :

Le teste de sensibilité consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits des deux plantes. Nous avons testé l'activité de huit extraits par la méthode des disques.

Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques. Les diamètres de celles-ci sont donnés sur le **tableau(9)**

Tableau 9 : diamètre d'inhibition des bactéries vis-à-vis les différents extraits en mm.

		Diamètre d'inhibition (mm)								
les extraits		PTj	Tj	F.FAj	F.F1-bj	PTc	Tc	F.FAc	F.F1-bc	
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	12	10	8	11	6	10	8	7	Gram +
	<i>Listeria monocytogenes</i>	15	7	14	8	9	10	9	8	
	<i>Bacillus subtilis</i>	10	11	14	12	14	16	22	20	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	8	8	6	7	6	12	8	11	Gram -
	<i>Escherichia coli</i>	10	8	7	10	7	8	10	7	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	13	15	16	15	12	13	10	
Levures	<i>Candida albicans</i>	11	8	10	6	7	8	10	13	
	<i>Candida albicans</i>	18	7	10	7	8	10	10	9	

PTj : Polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L.; **Tj** : Tanins *Juniperus phoenicea* L. ; **F.FAj** : Flavonoïdes fraction acétate. *Juniperus phoenicea* L. ; **F.F1-bj** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Juniperus phoenicea* L. ; **PTc** : Polyphénols totaux de *Cotula cinerea* (Del). ; **Tc** : Tanins. *Cotula cinerea* (Del). ; **F.FAc**: Flavonoïdes fraction acétate. *Cotula cinerea* (Del). ; **F.F1-bc** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Cotula cinerea* (Del).

➤ **NB** : le diamètre de disque est calculé y compris le diamètre de la zone d'inhibition

Les diamètres des zones d'inhibition moins de 7 mm ont été enregistrées comme inactifs, entre 7 et 10 mm ont été enregistrés comme faiblement active, de 10 mm et moins de 15 mm, ont été enregistrés comme modérément actif et beaucoup active quand un diamètre d'inhibition de la croissance ont été de plus de 16 mm.

Le tableau suivant résume le degré de sensibilité des différentes bactéries vis-à-vis nos extraits

Tableau 10 : degrés de sensibilité des ouches vis-à-vis les différents extraits

		Degré de sensibilité								
Extrait	PTj	Tj	F.FAj	F.F1-bj	PTc	Tc	F.FAc	F.F1-bc		
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	M.A	F.A	F.A	M.A	I	F.A	F.	I	Gram +
	<i>Listeria monocytogenes</i>	M.A	I	M.A	F.A	F.A	F.A	F.A	F.A	
	<i>Bacillus subtilis</i>	F.A	M.A	M.A	M.A	M.A	B.A	B.A	B.A	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	F.A	F.A	I	I	I	M.A	F.A	M.A	Gram -
	<i>Escherichia coli</i>	F.A	F.A	I	F.A	I	F.A	M.A	I	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B.A	M.A	M.A	B.A	M.A	M.A	M.A	F.A	
Levures	<i>Candida albicans</i>	M.A	F.A	F.A	I	I	F.A	F.A	M.A	
	<i>Candida albicans</i>	B.A	I	F.A	I	F.A	F.A	F.A	F.A	

I : inactive ; **F.A** : Faiblement actif ; **M.A** : modérément actif ; **B.A** : bien actif

PTj : Polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L. ; **Tj** : Tanins *Juniperus phoenicea* L. ; **F.FAj** : Flavonoïdes fraction acétate. *Juniperus phoenicea* L. ; **F.F1-bj** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Juniperus phoenicea* L. ; **PTc** : Polyphénols totaux de *Cotula cinerea* (Del). ; **Tc** : Tanins. *Cotula cinerea* (Del). ; **F.FAc** : Flavonoïdes fraction acétate. *Cotula cinerea* (Del). ; **F.F1-bc** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Cotula cinerea* (Del).

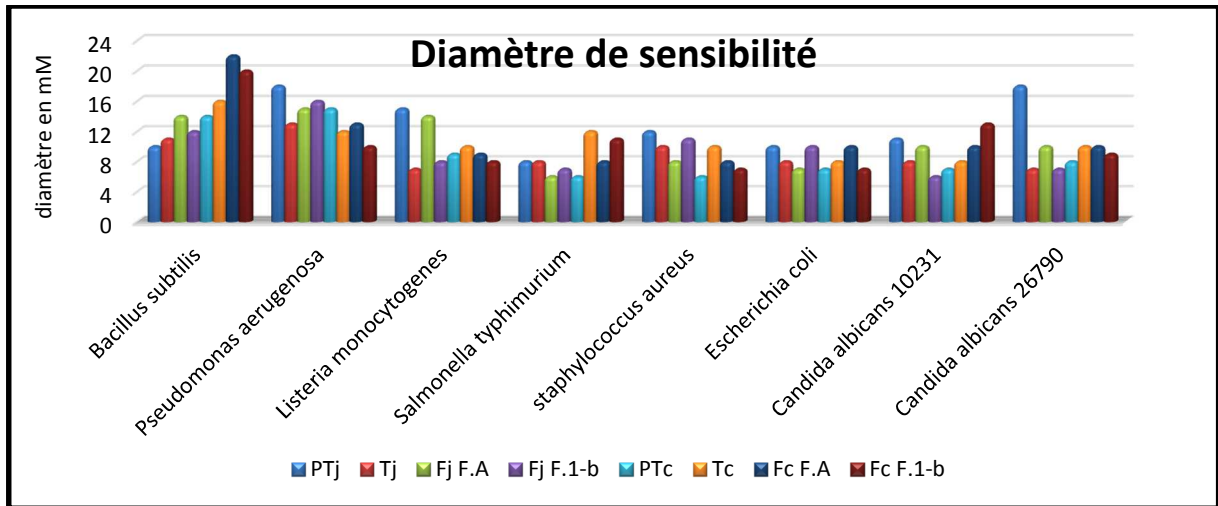


Figure 45: comparaisons des diamètres d'inhibition des différentes bactéries vis-à-vis les différents extraits.

PTj : Polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L.; **Tj** : Tanins *Juniperus phoenicea* L. ; **F.FAj** : Flavonoïdes fraction acétate. *Juniperus phoenicea* L. ; **F.F1-bj** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Juniperus phoenicea* L. ; **PTc** : Polyphénols totaux de *Cotula cinerea* (Del). ; **Tc** : Tanins. *Cotula cinerea* (Del). ; **F.FAc** : Flavonoïdes fraction acétate. *Cotula cinerea* (Del). ; **F.F1-bc** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Cotula cinerea* (Del).

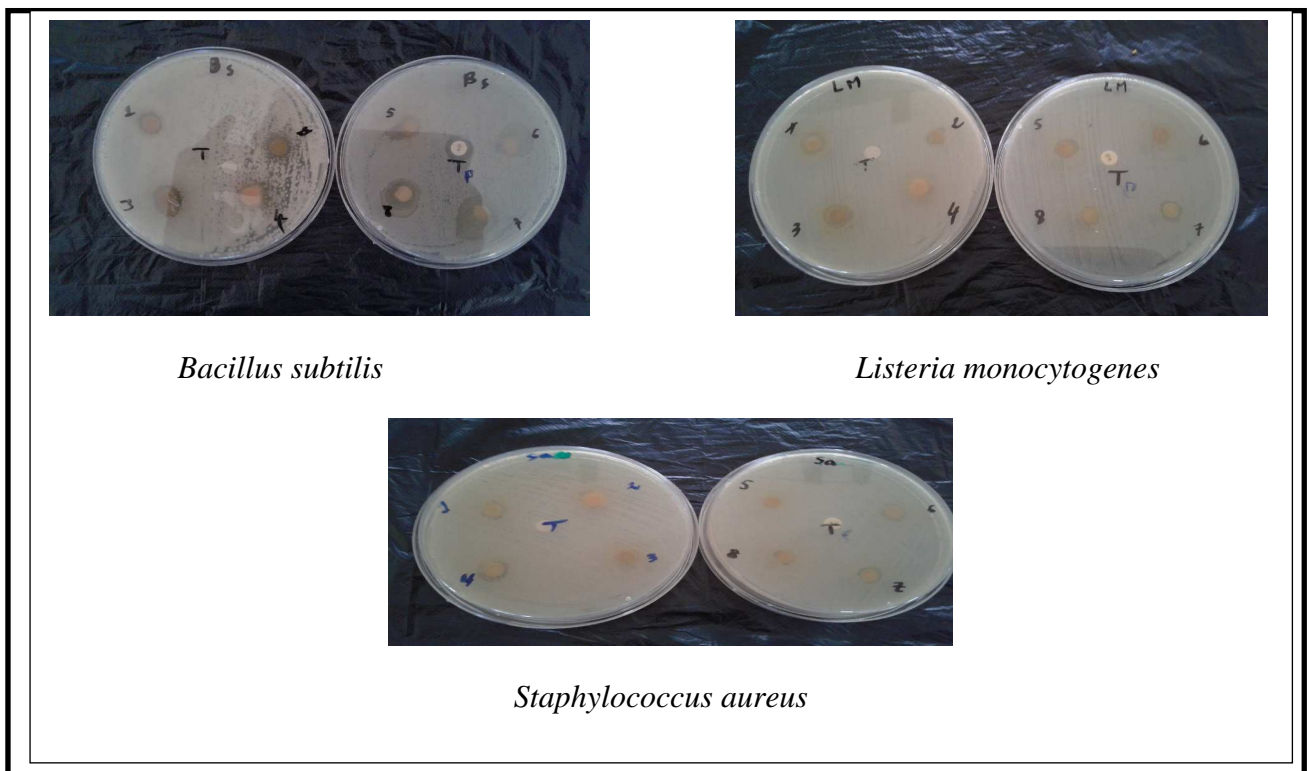


Figure 46 : sensibilité des bactéries à Gram +

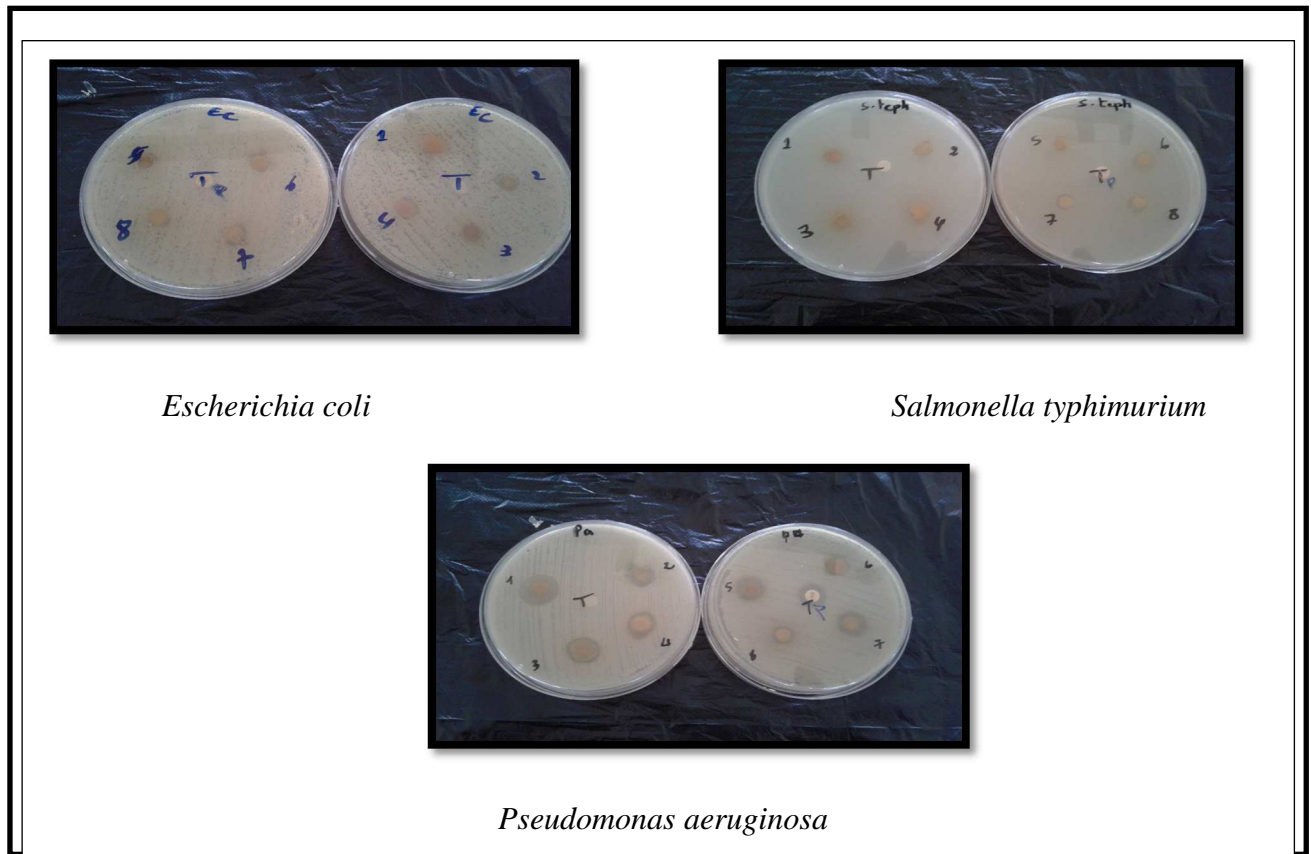
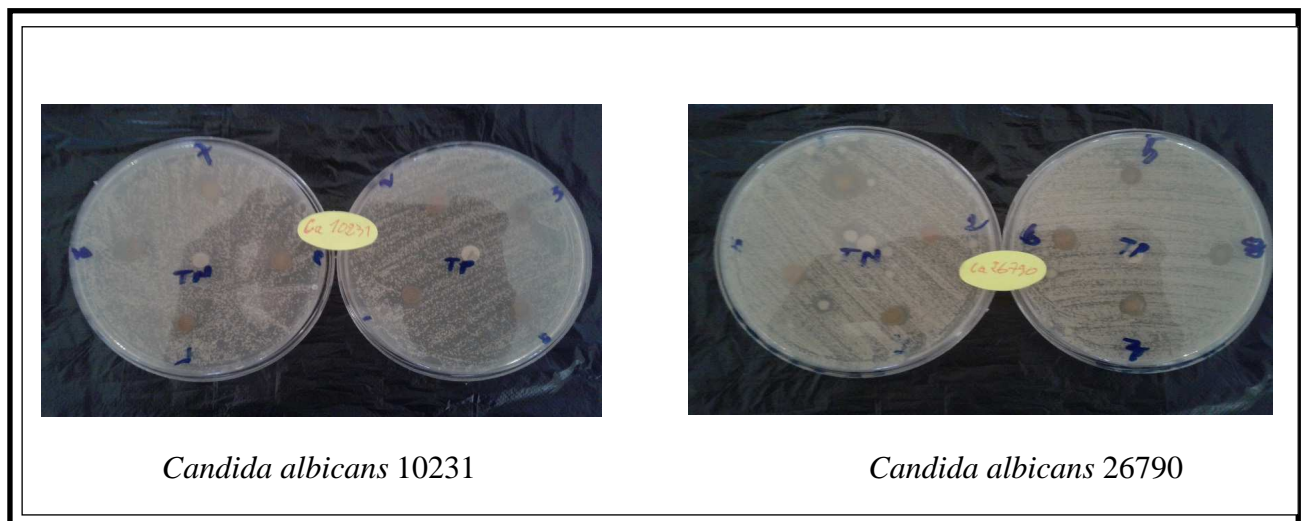


Figure 47 : sensibilité des bactéries à Gram –

Figure 48 : sensibilité des *Candida albicans*

1 : Polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L. ; **2** : Tanins *Juniperus phoenicea* L. ; **3** : Flavonoïdes fraction acétate. *Juniperus phoenicea* L. ; **4** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Juniperus phoenicea* L. ; **5** : Polyphénols totaux de *Cotula cinerea* (Del). ; **6** : Tanins. *Cotula cinerea* (Del). ; **7** : Flavonoïdes fraction acétate. *Cotula cinerea* (Del). ; **8** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Cotula cinerea* (Del). ; **T** : DMSO.

Tableau 11 : résultat du test de l'antibiogramme

		Antibiotique	AMX	AMP	GN
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>		7	7	-
	<i>Listeria monocytogenes</i>		-	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i>		7	14	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>		-	-	16
	<i>Escherichia coli</i>		9	17	19
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		10	19	16
Levures	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		-	8	-
	<i>Candida albicans</i> ATCC 26790		-	8	-

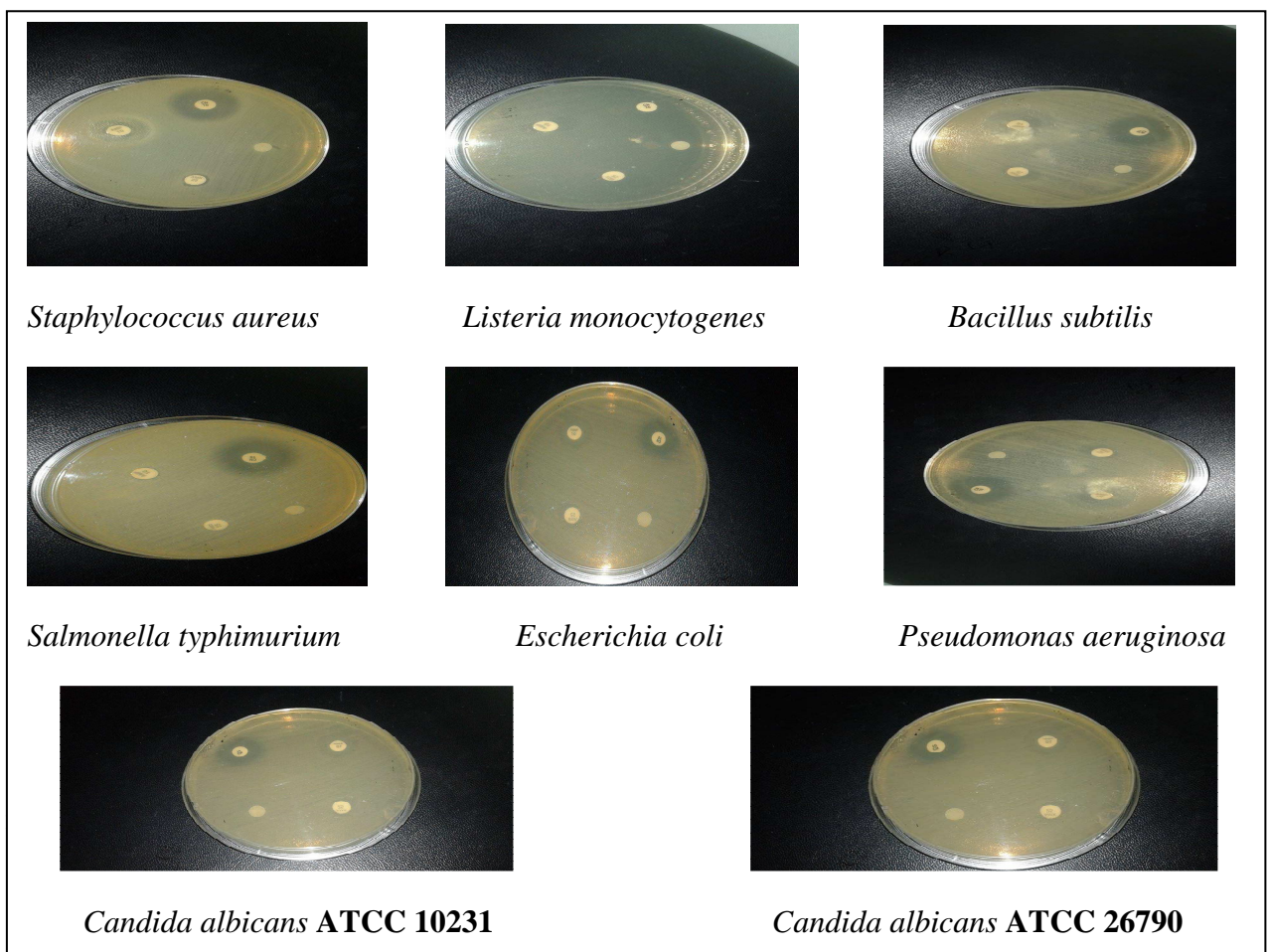


Figure 49: résultats de l'antibiogramme

V-5-2- Concentration minimale inhibitrice :

L'évaluation des concentrations minimales inhibitrices des polyphénols totaux, des tanins et des flavonoïdes, fraction acétate et 1-butanol, des deux plantes *Juniperus phoenicea* L. *Cotula cinerea* (Del.), nous a permis de mettre en évidence les concentration minimales de nos extraits qui à partir desquelles les bactéries que nous avons testé sont inhiber, ces résultats sont présenter dans le tableau suivant.

Tableau 12 : Les différentes concentrations minimales inhibitrices des différents extraits.

		Concentration minimale inhibitrice en mg/ml							
Les extraits		PTj	Tj	F.FAj	F.F1-bj	PTc	Tc	F.FAc	F.F1-bc
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.093	0.18	0.046	0.093	0.093	0.093	0.093	0.023
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.18	0.093	0.93	0.18	0.046	0.18	0.046	0.046
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.375	0.93	0.18	0.093	0.093	0.046	0.093	0.046
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.18	0.18	0.046	0.093	0.046	0.093	0.093	0.046
	<i>Escherichia coli</i>	0.375	0.375	0.093	0.18	0.093	0.093	0.093	0.046
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.375	0.18	0.18	0.093	0.046	0.18	0.046	0.093
Levures	<i>Candida albicans</i>	0.093	0.18	0.18	0.093	0.093	0.093	0.046	0.046
	<i>Candida albicans</i>	0.18	0.18	0.093	0.093	0.093	0.093	0.046	0.046

PTj : Polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L.; **Tj** : Tanins *Juniperus phoenicea* L. ; **F.FAj** : Flavonoïdes fraction acétate. *Juniperus phoenicea* L. ; **F.F1-bj** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Juniperus phoenicea* L. ; **PTc** : Polyphénols totaux de *Cotula cinerea* (Del). ; **Tc** : Tanins. *Cotula cinerea* (Del). ; **F.FAc**: Flavonoïdes fraction acétate. *Cotula cinerea* (Del). ; **F.F1-bc** : Flavonoïdes fraction 1-butanol. *Cotula cinerea* (Del).

Ces résultats confirment ceux obtenus avec le teste de sensibilité. En effet les souches testées sont inhibées à partir d'une concentration de 375µg/ml et la plus faible concentration minimale inhibitrice enregistrée est de 23µg/ml chez la fraction 1-butanol de *J. phoenicea* face à *Staphylococcus aureus*.

Discussion :

Les plantes représentent l'essentiel de la pharmacopée et l'avènement de la chimie moderne.

L'analyse phytochimique sur les extraits des végétaux est une étape préliminaire et d'une grande importance, puisqu'elle révèle la présence des constituants connus par leurs activités physiologiques et possédants des vertus médicinales, (**Sofowra,1993**).

Les recherches effectuées sur différents extraits sélectifs des parties aériennes des plantes *Juniperus phoenicea* L. *Cotula cinerea* (Del)., révèlent la présence des importants métabolites secondaires comme les saponosides, les flavonoïdes, les tanins ; les stérols et les terpènes qui sont des précurseurs de drogues très utiles en thérapie chimique (**Sofowra,1993**).

Des propriétés antibactériennes et cardiotoniques sont décrites chez les terpénoïdes, leur présence signifie que les plantes sont une bonne source de substances antibactériennes. (**Epanb et al., 2007 ; Kwaba et Tella, 2009**).

Comme on note la faible teneur de certains métabolites secondaire chez *Juniperus phoenicea* L. *Cotula cinerea* (Del)., comme l'amidon et les alcaloïdes et l'absence des composés réducteurs et en anthocyanes ce qui est en concordance avec les résultats obtenues par (**Fatiha, 2002**).

Vue La quantité importante des polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins, nous avons jugé judicieux de réaliser les extractions sélectives de ces différents composés d'où les rendements ont été déterminés par rapport à 100g de la matière végétale sèche.

Nous constatons que l'extrait phénolique de *Cotula cinerea* (Del)., enregistre un fort rendement de l'ordre de 27.7% suivi par celui de *Juniperus phoenicea* L. qui est de 26%.

En ce qui concerne les autre extraits des flavonoïdes (phase acétate d'éthyle et phase 1-butanol) et des tanins, les valeurs étaient moins importantes de l'ordre de 3.18% ; 1.22% ;

4.89% pour *Cotula cinerea* (Del.), et de l'ordre de 3.53 % ; 3.73 % ; 6.49 % : pour *Juniperus phoenicea* L.

La phytochimie quantitative a révélé des taux notables en polyphénols totaux pour les deux plantes *Juniperus phoenicea*, *Cotula cinerea* (Del.), le taux le plus élevé se rencontre chez la partie aérienne de *Cotula cinerea* (Del.), 276.74 mg EAG/g ., nos résultats obtenues chez *Cotula cinerea* (Del.), sont largement plus supérieur que celle trouver par **Benhamou en (2011)** qui est de 22.2 mg EAG/g.

Cette variabilité des teneurs en polyphénols chez ces espèces végétales est du probablement à la composition phénoliques des extraits (**Hayouni et al., 2007**), aux facteurs génotypiques (**El-Waziry, 2007**), les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (**Ksouri et al., 2008**), la nature du sol et le type du microclimat (**Atmani et al., 2009**) et aussi aux étages bioclimatiques où poussent ces plantes . Cette différence est observée dans les différentes études sur la partie des plante étudier, et peut être du à l'année de récolte et aux conditions climatiques.

Les antioxydants naturels des plantes incluent des composés phénoliques peuvent produire des effets bénéfiques de piégeage des radicaux libres (**Chang et al., 2002**).

Les extraits sélectifs de *Juniperus phoenicea* L., et de *Cotula cinerea* (Del.), ont montré des pouvoirs de réduction du fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} proportionnelles à l'augmentation de leurs concentrations et plus importants que le BHT.

A la concentration de 2 mg/ml, les polyphénols totaux, les tanins, et les deux fractions des flavonoïdes de *Juniperus phoenicea* L., ont montrés des capacités très élevées à réduire le Fe^{3+} avec des Do de : (1.009) pour les polyphénols totaux, (2.059) pour les tanins, (1.71) pour la fraction acétate des flavonoïdes, (2.052) pour la fraction 1-butanol des flavonoïdes, Les tanins et la fraction 1-butanol de *Juniperus phoenicea* L., ont enregistré des capacités de réduction de fer les plus élever avec (2.059) et (1.71) respectivement, par contre le BHT avec (Do = 0.789) c'est révélé moins actif que nos extraits qui sont avérés moyennement actifs par rapport avec l'acide ascorbique qui à démontrer une forte capacité à réduire le fer avec (Do = 3.3). pour les extraits sélectifs de *Cotula cinerea* (Del.), les résultats enregistrés étaient très significatifs et d'une forte capacité à réduire le fer avec et meilleurs que le BHT avec des Do de (1.39) pour les

polyphénols totaux, (1.55) pour les tanins, (0.877) pour la fraction acétate des flavonoïdes, (1.353) pour la fraction 1-butanol des flavonoïdes.

L'analyse de l'activité de réduction du radical DPPH[•] évalue la capacité de l'extrait à donner une molécule d'hydrogène ou à éliminer les radicaux libres. Le radical DPPH[•] est un radical libre stable et quand il réagit avec un composé antioxydant qui peut faire un don d'hydrogène, il est réduit à diphenylpicrylhydrazine. Les modifications de la couleur (c'est-à-dire du violet profond au jaune clair) peuvent être mesurées par spectrophotométrie (Azlim et al., 2010).

On considère les terpénoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes et les tanins comme des substances potentiellement antioxydantes (Madhuri et Pandey, 2009).

Cependant, la présence de ces substances indique dans nos extraits et fractions sont dotés d'une activité antioxydante. Le meilleur antioxydant naturel sont : les fractions butanoliques ou/et acétate d'éthyle non seulement pour ce test mais aussi pour l'autre méthode appliquée dans ce travail. les piègeurs les plus efficaces du radical libre DPPH[•] sont ceux possédants les valeur IC₅₀ les plus basses : chez *Juniperus phoenicea* L., la fraction 1-butanol d'une IC₅₀ : 0.08 mg/ml et la fraction acétate d'une IC₅₀ : 0.19 mg/ml sont plus basses que celui obtenue par le standard acide ascorbique IC₅₀ : 0.20 mg/ml. La fraction de polyphénol de *Cotula cinerea* (Del), IC₅₀ 0.21 mg/ml ainsi que la fraction acétate d'éthyle IC₅₀ : 0.33 mg/ml , fraction butanolique IC₅₀ : 0.39 mg/ml et la fraction tanins IC₅₀ : 0.24 mg/ml ce sont avérées efficaces mais faible par rapport au standard.

Les composés phénoliques peuvent aider à protéger les cellules contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres, Korakot et al., en (2006) ont signalé que l'extrait de plante riche en composés phénoliques mène à une activité antibactérienne.

L'activité antibactérienne des composés pénolique, outre plusieurs activités biologiques, peut être utilisée à la place des antibiotiques coûteux pour un contrôle efficace des agents pathogènes d'origine alimentaire. Les feuilles de *Juniperus phoenicea* L. peuvent être une source de médicaments antibactériens contre les bactéries Gram-positives, notamment contre les microorganismes multi-résistantes. (Abdenbi et al., en 2014).

Les résultats de l'essai de diffusion ont bien révélé que tous les extraits de la partie aérienne de *Juniperus phoenicea* montrent une activité sur les bactéries testées avec plus ou moins une inhibition de la croissance, selon les souches bactériennes, une activité antibiotique de type différent des bactéries comme comparer à la norme. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Malu et al., en (2009)**.

L'étude de *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits des polyphénols totaux, des tanins et des flavonoïdes des deux plantes *Juniperus phoenicea* L., et *Cotula cinerea* (Del.), a montré que ces extraits possèdent des pouvoirs inhibiteurs modérés à appréciables contre tous les microorganismes testés. Ce pouvoir varie selon l'espèce et la famille des microorganismes. Les polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L., se sont montrés modérément actif contre les bactéries à Gram+, En revanche *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* sont avérées très sensibles contre ce même extrait.

Abdelhamid et al., en (2012) ont déduit que l'effet de plusieurs extraits de *Cotula cinerea* (Del) par (infusion, décoction, macération ; percolation) sur: *E. coli* et *S. aureus* a donné des petits diamètres d'inhibition comparés avec celles que nous avons obtenus

Bensizerara et al., (2012) ont déduit que l'effet de plusieurs extraits de *Cotula cinerea* (Del), par (éther de pétrole, l'éthanol 70 %, n-butanol ; l'acétate d'éthyle) sur: *E. coli* ; *K. pneumonie* *S. aureus* a donné des petits diamètres d'inhibitions comparé avec celle que nous avons trouvé.

En revanche et d'après **Abdenbi et al., en (2014)**, les zones d'inhibitions obtenues par la méthode des disques varient entre 20 et 55 mm avec l'huile essentielle de *Cotula cinerea*, vis-à-vis les souches bactériennes (*Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli*). Avec les autres souches bactériennes (*Salmonella heidelberg*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), il n'y a pas une zone d'inhibition.

Ces résultats enregistrer lors de test de l'antibiogramme sur les microorganismes que nous avons utilisé par le biais d'Amoxicilline, Ampicilline et Gentamicine ont montré que les bactéries à Gram- ne sont pas sensible contre la Gentamicine, en revanche les diamètres d'inhibition donnés par l'ampicilline et l'amoxicilline se sont avérés relativement moyenne par rapport avec celle causés par nos extraits.

Toutes les souches testées vis-à-vis les extraits des polyphénols totaux, des tanins et des flavonoïdes des deux plantes *Juniperus phoenicea* L., et *Cotula cinerea* (Del), sont

inhibées à partir d'une concentration de 375µg/ml et la plus faible concentration minimale inhibitrice chez *J. phoenicea* enregistrée était de 46 µg/ml chez la fraction acétate face à *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*.

La concentration minimale inhibitrice des extraits sélectifs de *Cotula cinerea* (Del.), a été enregistrée chez la fraction 1-butanol à 23 µg/ml vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSION

Notre étude réalisée au Laboratoires de biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes à l'université de Saïda, nous a permis de mettre en évidence la présence des différentes familles de composés chimiques dans les deux plantes *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del.), ainsi que l'évaluation des activités biologiques et le pouvoir antioxydant de ces plantes.

Les tests phytochimiques ont montré la présence des polyphénols, des saponosides, des flavonoïdes, et des tanins en quantité importante.

Au cours de l'extraction sélective des composés, le plus fort rendement a été obtenu en polyphénols totaux (27.7%) pour l'espèce *Cotula cinerea* (Del)., et (26%) chez *Juniperus phoenicea* L., les flavonoïdes et les tanins ont donné des rendements relativement faibles par rapport aux polyphénols totaux, pour *Juniperus phoenicea* L. on'a eu (6.49%) en tanins et (3.53%) et (3.73%) en flavonoïdes pour la fraction acétate et la fraction 1-butanol successivement, pour *Cotula cinerea* (Del)., les rendements étaient de (4.89%) en tanins et (3.18%) et (1.22%) en flavonoïdes pour la fraction acétate et la fraction 1-butanol successivement.

Le dosage des polyphénols totaux des deux plantes a permis de mettre en évidence les teneurs de ce dernier (217.2 mg EAG/g) pour *Juniperus phoenicea* L. et (276.74 mg EAG/g) pour *C. cinerea*.

L'évaluation du pouvoir antioxydant des polyphénols totaux, des tanins et des fractions acétate et 1-butanol des flavonoïdes de *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del)., par la méthode de FRAP et le piégeage du radical libre DPPH• nous a permis de calculer les capacités de réduction de fer et des IC₅₀ relativement considérable ce qui nous a poussé à déduire que toutes ces extraits possèdent une activité antioxydante relativement forte par rapport avec le BHT et proche à celle de l'acide ascorbique.

Les capacités antioxydantes déterminées *in vitro* sont en relation directe avec le contenu en métabolites secondaires de chaque extrait et fraction et dépendent de l'ensemble des

substances antioxydantes, de leurs natures, de leurs teneurs et de leurs structures et de toutes les interactions moléculaire qui peuvent agir de façons synergique pour hausser cette activité.

Les antioxydants naturels des espèces végétales et locales et particulièrement celles des extrais sélectifs de *Juniperus phoenicea* L. et *Cotula cinerea* (Del)., peuvent êtres très utiles pour renforcer l'organisme dans le cas de stress oxydatif et de prévenir les différentes pathologies survenues lors d'une attaque radicalaire. (Nabavi et al., 2009).

L'étude du pouvoir antimicrobien a montré que les extraits de *Juniperus phoenicea* L., et *Cotula cinerea* (Del)., montré des capacités à inhiber toutes les souches microbiennes que nous avons utilisés allant de faiblement actif à fortement actif. La souche microbienne *Bacillus subtilis* a montré une très forte sensibilité contre les flavonoïdes de *Cotula cinerea* (Del). *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* se sont révélées très sensibles vis-à-vis les polyphénols totaux de *Juniperus phoenicea* L.

La mise en évidence de l'étude des concentrations minimales inhibitrices des extraits sélectifs de *Cotula cinerea* (Del). et *Juniperus phoenicea* L., possèdent des concentrations minimales inhibitrices allant de 0.375 à 0.023 mg/ml.

En fin, ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies (tests toxicologiques, mode d'action et d'application, etc.) et la caractérisation de ces extraits qui nécessite, peut-être, d'autres techniques de détection comme CPG-SM, HPLC-SM et RMN.

Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées parmi lesquelles on peut citer :

- Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo*
- Effectuer d'autre teste antiinflammatoires et anticancéreux
- Caractériser et isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques

Références Bibliographiques :

A

A. Ahmed, El sayed, N. H. El Negoumy., *J. Nat prod*, **1987**, 50, 519-520.

A. Radwane, M. Markouk, H. B. Lazrek, H. Amarouch, M. Jana., *Ann. Pharm. Fr*, **1998**, 56(6), 274-276.

Abdenbi Asma, Abdelwahed Djamel-Eddin, Bouaaza Mohammed Touati Boumediene, 2014. Screening Phytochimique Et Activite Antibacterienne De L'huile Essentielle De Cotula Cinerea (Gartoufa) Dans La Region De Bechar.

Afifi FU, Kasabri V (2013) Pharmacological and phytochemical appraisal of selected medicinal plants from Jordan with claimed antidiabetic activities. *Sci Pharm* 81: 889-932.

Ahmed, A.A., EL-Sayed, N.H., EL-Negoumy, S.I., Mabry, T. (1987). Flavonoids of *Cotula cinerea*. *J. Nat. Prod*, 50: 519.

Akrout A.; 1999. Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). Institut des régions arides, 4119 Medecine, Tunisie 289-292.

ALI KALLA, (2012) Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*. Thèse de doctorat en sciences chimiques, option : phytchimie UNIVERSITE MENTOURI – CONSTANTINE.

Ali, S.S., Kasaju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*, 41: 1–15.

Alibert, G., Ranjeva, R., Boudet, M.A. (1977). Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Veg*, 15 : 279-301.

Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. (1996). Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res*, 28 : 65-180.

Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 75: 199–212.

Atamer, A.. (2008). The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J. Int. Med. Res* **36**, 771-776.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, 112: 303–309.

Aurousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim*, 15 (1): 67-82.

Azlim A, Ahmed J, Syed Z, Mustapha S, Aisyah M, et al. (2010) International Food Research Journal 17: 1077-1084.

B

Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.

Barrero A. F., Herrador M. M., Arteaga P., Quflez del Moral J. F., Sánchez-Fernández E.; 2006. Chemical Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Juniperus phoenicea* L. from North Africa. *J. offssent. Oilles.*, 18,168-169.

Becker M., Picard J.-F., Tim bal J.; 1982. Larousse des arbres et arbustes. Librairie Larousse, 151-152 et 194-195.

Bellakhder J.; 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ilbiss Press, Paris, 27 1 272 et 764.

BELYAGOUBI Née BENHAMMOU NABILA (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A. (1997). Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 4505–4515.

Benhouhou, S., (1986). Contribution à l'étude de la flore de la région de Béni-Abbès. Undergraduate thesis. University of Algiers. 241 p.

Bensizerara D, Menasria T, Melouka M, Cheriet L, Chenchouni H. Antimicrobial activity of xerophytic plant (*Cotula cinerea* Delile, 1831) extracts against some pathogenic bacteria and fungi. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012;1-5.

Benzie, I. F. F. et Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.

Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, 13: 135.

Bonnier G.; 1990. La grande flore en couleurs. Tome 4 Ed. Belin, Paris, 1353-1355.

Bossokpi, I.P.L. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloides* LAM(Rutaceae). *Thèse de pharmacie, Bamako*, p 133.

Bouabdelli F, Djelloul A, Kaid-Omar Z, Semmoud A, Addou A. Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2012; 530- 535.

Boullard B.; 2001. Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Ed. Estem, Pans, 290.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol*, 28 : 25–30.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

Brzozowska, J., Hanower, P., Tanguy, J. (1973). Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12: 2353-2357.

C

Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.

Cavaleiro C., Rezzi S., Salgueiro L., Bighelli A., Casanova J., Cunha A. P.; 2001. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 1175-1183.

Chang M, Meiwen H, Chern J (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.

Charfi D., (1995). Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. de Sfax.

Chung, K., Wong, T.Y., Wei, C., Huang, Y., Lin, Y. (1998). Tannins and human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 38: 421-464.

Cook, N.C., Samman, S. (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J.Nutr Biochem*, 7(2): 66 76.

Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

D

Dubois, G.E., Grosbay, G.A., Saffron, P. (1977). Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *Science*, 195: 397-399.

Duke J.A.; 1998. Phytochemical Database. Ed. USDA-ARS-NGRL. Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland.

Dupont, F., Guignard, J.L. (2007). Abrèges botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée, Masson.

E

Edenharder, R., Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.

El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J. Mortensen, V., Phillip, D.M., Truscott, T.G. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Arch. Biochem. Biophys*, 430 (1): 37–48.

El-Waziry, A.M. (2007). Nutritive value assessment of ensiling or mixing Acacia and Atriplex using in vitro gas production technique. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3(6): 605-614.

Epand R., Savage T.B., Epand R.M. Bacterial lipid composition and antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Cerajenins). *Biochim et biophys Acta* **2007**, 1768(10), 2500-2509.

F

Fatiha Abdoun, 2002 .Journal of Ethnopharmacology, Cupressus dupreziana A. Camus: répartition, dépérissement et régénération au Tassili n'Ajjer, Sahara central Cupressus dupreziana A. Camus: distribution, decline and regeneration on the Tassili n'Ajjer, Central Sahara *Comptes Rendus Biologies*, Volume 325, Issue 5, May 2002, Pages 617-627.

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.

G

G. Dominique ; (2004), Etude de nouvelles réactions radicalaires application à la Synthèse d'alcaloïdes, *Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique*.

G. Olive; (1998), Synthèse de nouvelles nitrons du Type Pyrroline –N – Oxyde et leur utilisation en spin – trapping, *Thèse de doctorat, université d'Aix Marseille III*.

G.H. Mahran., Bull.Fac.Farm, Cairo Univ, 1975, 14(1), 237-246.

Garnier G., Bézanger-Beauquesne L., Debraux G.; 1961. Ressources médicinales de la flore française. Tome 1. Vigot Frères Éditeurs, Paris, 124-133.

Gauche, E., Hausswirth, C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*, 58 : 43-66.

Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S., Fonseca Maria, J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS Pharm Sci*, 5 (2) : 1-5.

GHABRIER J. Y., 2010. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France): 165.

Greger, H., Hofer, O. (1985). sesquiterpene-coumarin ethers and polyacetylenes from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry*, 24:85.

H

H. Zabeirou., mémoire d'ingénieur, ITAS, Univ Ouargla, **2001.**

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, 344 (8924): 721-724.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990), Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-85.

Hammiche, V., Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol*, 105 : 358–367.

Harbone, J.B. (1993). Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed; Academic Press: London.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67– 202.

Hayouni E. A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M.; 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, **105**, 1126 1134.

Heimeur, N., Idrissi Hassani, L.M., Amine Serghini, M. (2004). Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 3 (1): 37-42.

Hennebelle T. Investigation chimique, chimio-taxonomique de Lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larenda*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille 1, Ecole Doctorale Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement. France. **2006.**

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.

Hilcentr; (2003), Chimie organique hétérocyclique, *EDP. Sciences*.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21.

Hostettmann K., Potterat O., Wolfender J.-L.; 1998. The Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs. *Chimia*, 52, 10-17.

K

Kaouthar Liouane, Houda Ben Abdelkader, Karima Bel Hadj Saleh, Awatef Debbabi, Mohamed Ali Mahjoub, Khaled Said, Zine Mighri . 2009 Antioxidant and antimicrobial activity of *Cotula coronopifolia* (Asteraceae) growing in Tunisia Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products TJMPNP 2, 65-73.

Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol*, 331: 865- 873.

K.P.C. Vollhardt, S N.E. Chore; (1999), Traité de la chimie organique, *traduction 3ème éd. De Boeck et Lancier. s. a.*

Kolesnikov, M.P., Gins, V.K. (2001). Phenolic substances in medicinal plants. *Appl. Biochem. Micro*, 37 (4): 392-399.

Kwada A.D., Tella I.O. Determination of infochemicals and the phytochemical screening of the foliage and stem-bark of *Senna siamea* (lam.) in Yola, Adamawa State. *Journal of medicinal plants research* 2009, 3(9), 630-634.

Korakot C, Shioh Y, Chien Y, Jingtair S (2006) Effect of natural volatile compounds on antioxidant capacity and antioxidant enzymes in raspberries. *Postharvest Biology and Technology* 40: 106–115.

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

L

Landis, G.N., Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126: 365–379.

Larhsini, M., Markouk, M., Jaouhari, J.T., Bekkouche, K., Lazrek, H.B., Jana, M. (2002). The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother Res*, 1: S97-8.

Le Floc'h E.; 1983. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. *Publi. Sci. Tunisiennes, Programme "Flore et Végétation Tunisiennes"*. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, 402.

Larousse; 2001. Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, préparations, soins. Ed. Larousse, Londres, 14-29.

Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y. (2005). Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem*, 53 : 1990-1995.

Leong, LP., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75.

Li, C.Y., Jackson, R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol*, 282: C227–C241.

M

Madhuri S., pandey G. Some anticancer medicinal plants foreign and origin. *Current SCI* 2009, 96 (6), 779-783.

Malu S, Obochi G, Tawo E, Nyong B (2009) Antibacterial activity and medicinal properties of *Juniperus phoenicea*. *Global J Pure and Applied Science* 15: 365-368.

M.Markouk, H. B. Lazrek, M.Jana., *Fitotherapy research*, 1999, 13(3), 229-230.

Markouk, M., Bekkouche, K., Larhsini, M., Bousaid, M., Lazrek, H.B., Jana, M. (2000). Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. *J. Ethnopharmacol*, 73: 293–297.

Markouk, M., Redwane, A., Lazrek, H.B., Jana, M., Benjama, A. (1999). Antibacterial activity of *Cotula cinerea* Extracts. *Fitoterapia*, 70: 314-316.

Metwally, M.A., EL-Dahmy, S., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Dawidar, A.M., Metwally, S.A. (1986). Glaucolide-like sesquiterpene lactones from *Cotula cinerea*. *Phytochemistry*, 25:255.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol.*

Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat en Sciences Domains* : Pharmacochimie, Université Louis Pasteur Strasbourg I.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407–412.

Møller, P., Wallin, H. & Knudsen, L.E (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem. Biol. Interact* **102**, 17-36.

Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., Surbled, M. (1998). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).

Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Arch. Biochem. Biophys*, 385 (1) : 13–19.

Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218.

N

N. J.Turbo, A. Masayuki, L.R. Gould; (1982), *J.AM.Chem.Soc*, 104 856 -858.

Nabavi S, Ebrahimzadeh M, Fazelian M, Eslami B (2009) In vitro Antioxidant and Free radical scavenging activity of *Diospyros lotus* and *Pyrus boisieriana* growing in Iran. *Mag* 4: 122-126.

Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr*, 74 : 418–425.

Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1961). Synergistes naturels des auxinex et des giberellines. *Bull. Soc. Fr*, 26: 2237-2240.

Nyangono C, Chakokam N, Kuate 1, Ngondi1 J, Enyong J (2012) Effect of *Guibourtia tessmannii* extracts on blood lipids and oxidative stress markers in triton WR 1339 and high fat diet induced hyperlipidemic rats. *Biology and Medicine* 4: 01-09.

O

O’Kennedy, R., and Thornes, R.D. (ed) (1997). Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.

Ould El Hadj M. D., Hadj-Mahammed., M., Zabeirou, H. (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d’Ouargla (Sahara septentrional Est). *Courrier du Savoir – N°03*, 47-51.

P

Pandey KB et Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2009**, Vol. 2 (5) ; pp 270 – 278.

Peronny S. La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d’histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie. **2005**, pp 151.

Picchi A. (2006) Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prédiabetic metabolic syndrome. *Circ. Res* 99, 69-77.

Popov, I., Lewin, G., Baehr, R. (1987). Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, 46: 775–779.

Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Rad. Biol. Med.*, 28: 141–164.

Q

Quezel P, Santa S (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique. Tome II. Ed. CNRS, Paris.

Quezel P., Sauta S.; 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 34-36.

R

Rahman, I. (2002). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1(3) : 291-315.

Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 72: 1439-1452.

Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chem. Toxicol*, 45: 328-336.
Rev, 52: 673-839.

Rezzi S., Cavaleiro C., Bighelli A., Salgueiro L., Cunha A. P., Casanova J.; 2001. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 179-188.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, 22(4): 375-83.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 20: 933–956.

S

SANAGO R., 2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako (Mali): 53.

Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3): 121-137.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci. Technol. Int*, 4: 391-399.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.

Scherer, R., Godoy, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem*, 112: 654–658.

Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem*, 11: 1135– 1146.

Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., et al. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's [letter]. *Nature*, 382: 120.

Sofowra A. Medicinal plants and Traditionnal Medecin in africa. 2ème edition. Stecprim books Ltd, Ibadan, Nigeria ,1993.

Stassi V., Verykokidou E., Lou kis A., Harvala C., Philianos S.; 1996. The antimicrobial activity of the essential oil of four *Juniperus* species growing wild in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 11, 71-74.

Svoboda, K.P., Hampson, J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

T

Tamer Fouad, M.D. (2003). Free radicals, Types, sources and damaging reactions, Internal Medicine Articles. (<http://www.doctorslounge.com/primary/articles/>).

Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.

V

Valko, M., Izakovic, M., Mazur,M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem*, 266: 37–56.

Valko, M., Morris, H. & Cronin, M.T.D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem* 12, 1161-1208.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160: 1–40.

Van Acker, S., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., van der Vijgh, W.J.F. (1996).

Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol*, 56 : 935– 943.

Van Antwerpen, P. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène /chlorure. *Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques*, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.

Virost, S. (2004). Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l' $\alpha\beta$ -crystalline. *Thèse de doctorat*, Université Claude Bernard-Lyon 1.

W

Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. et Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187: 33-37.

Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med*, 24: 480–493.

Y

Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 : 113-122.

Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoi, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., et al. (1999). Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochem Pharmacol*, 58 : 1695–703.

Z

Zhang, Y., Vareed, S.K., Nair, M.G. (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci*, 76: 1465-1472.

Annexe I: Composition des milieux de culture.

Eau physiologique

Na Cl.....	9 g
Eau distillée.....	1000 ml qsp

Bouillon Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	02,0g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon.....	01.5g
Eau distillée.....	1000 ml qsp

pH : 7.4

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	4,0g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon.....	01.5g
Agar	15g
Eau distillée.....	1000 ml qsp

pH = 6,8 ($\pm 0,2$) à 37°C

Gélose nutritive

Extrait de levure.....	2 g
Extrait de viande.....	10g
Peptone.....	5 g
Glucose.....	20 g
Nacl.....	5g
Agar agar.....	20g
Eau distillée.....	1000 ml qsp

Bouillon nutritif

Extrait de levure.....	2 g
Extrait de viande.....	10g
Peptone.....	5 g
Glucose.....	20 g
Nacl.....	5g
Eau distillée.....	1000 ml qsp

Gélose Sabouraud

Peptone	10g
Glucose.....	40g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml qsp

PH 7,0

Bouillon Sabouraud

Peptone.....	10g
Glucose.....	40g
Eau distillée.....	1000 ml qsp.

NB : Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121 °C Pendant 15 min

Annexe II : Réactifs et réaction de caractérisation

Les réactifs utilisés lors des tests phytochimiques sont les suivants :

- **Réactif de Wagner :** Dissoudre 2g de KI et 1,27g d'I₂ dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100ml d'eau.
- **Réactif de Mayer :** Dissoudre 1,358 g de HgCl₂ dans 60ml d'eau et également 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau.
- **Réactif d'amidon :** Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5g d'iodure de potassium. Chauffer dans un bain marie 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition.

Annexe III : les tableaux réalisés lors de la mise en évidence du pouvoir anti oxydant :

La méthode FRAP :

➤ *Juniperus phoenicea* L.

Polyphénols Totaux					
[C]	Do1	Do2	Do3	Ecartype	Moyenne/absorbance
2	1.004	1.01	1.014	0.005033223	1.009333333
1	0.862	0.882	0.89	0.014422205	0.878
0.75	0.621	0.643	0.623	0.012165525	0.629
0.5	0.504	0.501	0.503	0.001527525	0.502666667
0.25	0.311	0.307	0.313	0.00305505	0.310333333
0.1	0.168	0.172	0.163	0.00450925	0.167666667

Tanins					
[C]	Do1	Do2	Do3	Ecartype	Moyenne/absorbance
2	2.057	2.062	2.058	0.002645751	2.059
1	1.825	1.821	1.827	0.00305505	1.824333333
0.75	0.837	0.842	0.835	0.003605551	0.838
0.5	0.474	0.472	0.461	0.007	0.469
0.25	0.395	0.392	0.394	0.001527525	0.393666667
0.1	0.266	0.272	0.268	0.00305505	0.268666667

Falavonoides fraction acétate					
[C]	Do1	Do2	Do3	Ecartype	Moyenne/absorbance
2	1.714	1.716	1.72	0.00305505	1.716666667
1	1.369	1.365	1.372	0.003511885	1.368666667
0.75	1.251	1.249	1.253	0.002	1.251
0.5	0.874	0.872	0.876	0.002	0.874
0.25	0.514	0.517	0.513	0.002081666	0.514666667
0.1	0.402	0.407	0.403	0.002645751	0.404

Flavonoides fraction 1-butanol					
[C]	Do1	Do2	Do3	Ecartype	Moyenne/absorbance
2	2.037	2.052	2.069	0.016010413	2.052666667
1	1.857	1.862	1.855	0.003605551	1.858
0.75	1.531	1.529	1.534	0.002516611	1.531333333
0.5	1.308	1.312	1.306	0.00305505	1.308666667
0.25	0.666	0.664	0.668	0.002	0.666
0.1	0.462	0.469	0.458	0.005567764	0.463

➤ *Cotula cinerea* (Del).

Polyphénols Totaux					
[C]	Do1	Do2	Do3	Ecartype	Moyenne/absorbance
2	1.388	1.402	1.385	0.009073772	1.391666667
1	0.713	0.717	0.715	0.002	0.715
0.75	0.583	0.585	0.589	0.00305505	0.585666667
0.5	0.473	0.482	0.471	0.005859465	0.475333333
0.25	0.263	0.267	0.258	0.00450925	0.262666667
0.1	0.193	0.188	0.197	0.00450925	0.192666667

Tanins					
[C]	Do1	Do2	Do3	Ecartype	Moyenne/absorbance
2	1.553	1.569	1.557	0.008326664	1.559666667
1	1.067	1.072	1.055	0.008736895	1.064666667
0.75	0.921	0.919	0.925	0.00305505	0.921666667
0.5	0.662	0.667	0.669	0.003605551	0.666
0.25	0.55	0.552	0.559	0.004725816	0.553666667
0.1	0.434	0.43	0.442	0.006110101	0.435333333

Falavonoides fraction acétate					
[C]	Do1	Do2	Do3	Ecartype	Moyenne/absorbance
2	0.879	0.872	0.882	0.005131601	0.877666667
1	0.558	0.552	0.557	0.00321455	0.555666667
0.75	0.525	0.529	0.532	0.003511885	0.528666667
0.5	0.383	0.387	0.375	0.006110101	0.381666667
0.25	0.198	0.182	0.196	0.008717798	0.192
0.1	0.145	0.151	0.142	0.004582576	0.146

Flavonoides fraction 1-butanol					
[C]	Do1	Do2	Do3	Ecartype	Moyenne/absorbance
2	1.351	1.359	1.349	0.005291503	1.353
1	0.985	0.992	1.001	0.008020806	0.992666667
0.75	0.558	0.552	0.555	0.003	0.555
0.5	0.291	0.285	0.295	0.005033223	0.290333333
0.25	0.229	0.232	0.226	0.003	0.229
0.1	0.101	0.103	0.109	0.004163332	0.104333333

➤ **Standards :**

Acide ascorbique	
[C]	Do
2	3.3
1	2.09
0.75	1.671
0.5	0.576
0.25	0.267
0.1	0.18

BHT	
[C]	Do
2	0.789
1	0.684
0.75	0.672
0.5	0.639
0.25	0.407
0.1	0.378

Réduction Du Radical Libre DPPH :

➤ *Juniperus phoenicea* L.

Polyphénols totaux						
[C+]	0.602					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.048	0.051	0.046	0.048333	0.002517	91.97121
2	0.049	0.052	0.054	0.051667	0.002517	91.4175
1.5	0.052	0.054	0.053	0.053	0.001	91.19601
1	0.068	0.065	0.062	0.065	0.003	89.20266
0.75	0.101	0.112	0.107	0.106667	0.005508	82.28128
0.5	0.201	0.199	0.207	0.202333	0.004163	66.38981
0.25	0.301	0.307	0.299	0.302333	0.004163	49.77852
0.1	0.431	0.437	0.442	0.436667	0.005508	27.46401

Tanins						
[C+]	0.658					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.043	0.045	0.04	0.042667	0.002517	93.5157
2	0.114	0.102	0.113	0.109667	0.006658	83.33333
1.5	0.251	0.236	0.267	0.251333	0.015503	61.80344
1	0.3	0.31	0.301	0.303667	0.005508	53.85005
0.75	0.326	0.323	0.32	0.323	0.003	50.91185
0.5	0.421	0.452	0.491	0.454667	0.035076	30.90172
0.25	0.509	0.534	0.527	0.523333	0.012897	20.46606
0.1	0.6	0.582	0.6	0.594	0.010392	9.726444

Flavonoïdes F. Acétique						
[C+]	0.607					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.015	0.018	0.013	0.015333	0.002517	97.47392
2	0.022	0.025	0.023	0.023333	0.001528	96.15596
1.5	0.024	0.026	0.028	0.026	0.002	95.71664
1	0.042	0.047	0.039	0.042667	0.004041	92.9709
0.75	0.102	0.107	0.101	0.103333	0.003215	82.97639
0.5	0.142	0.147	0.139	0.142667	0.004041	76.49643
0.25	0.295	0.306	0.297	0.299333	0.005859	50.68644
0.1	0.412	0.415	0.418	0.415	0.003	31.63097

Flavonoïdes F. 1-butanol						
[C+]	0.539					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.045	0.044	0.042	0.043667	0.001528	91.89858
2	0.047	0.048	0.045	0.046667	0.001528	91.34199
1.5	0.048	0.048	0.047	0.047667	0.000577	91.15646
1	0.048	0.049	0.052	0.049667	0.002082	90.78541
0.75	0.05	0.051	0.05	0.050333	0.000577	90.66172
0.5	0.058	0.057	0.058	0.057667	0.000577	89.30118
0.25	0.081	0.08	0.083	0.081333	0.001528	84.91033
0.1	0.387	0.385	0.386	0.386	0.001	28.3859

➤ *Cotula cinerea* (Del).

polyphénols totaux						
[C+]	0.623					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.031	0.028	0.025	0.028	0.003	95.50562
2	0.051	0.048	0.046	0.048333	0.002517	92.24184
1.5	0.072	0.073	0.078	0.074333	0.003215	88.06849
1	0.117	0.115	0.118	0.116667	0.001528	81.27341
0.75	0.153	0.158	0.157	0.156	0.002646	74.95987
0.5	0.203	0.199	0.207	0.203	0.004	67.41573
0.25	0.301	0.298	0.295	0.298	0.003	52.16693
0.1	0.402	0.408	0.42	0.41	0.009165	34.18941

Tanins						
[C+]	0.623					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.031	0.028	0.033	0.030667	0.002517	95.07758
2	0.061	0.058	0.057	0.058667	0.002082	90.5832
1.5	0.085	0.089	0.087	0.087	0.002	86.03531
1	0.129	0.132	0.125	0.128667	0.003512	79.34724
0.75	0.185	0.179	0.187	0.183667	0.004163	70.51899
0.5	0.203	0.213	0.205	0.207	0.005292	66.77368
0.25	0.304	0.313	0.301	0.306	0.006245	50.88283
0.1	0.425	0.428	0.432	0.428333	0.003512	31.24666

Flavonoïdes F. Acétique						
[C+]	0.607					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.028	0.025	0.024	0.025667	0.002082	95.77155
2	0.052	0.051	0.05	0.051	0.001	91.59802
1.5	0.081	0.082	0.087	0.083333	0.003215	86.27128
1	0.122	0.128	0.131	0.127	0.004583	79.07743
0.75	0.187	0.192	0.194	0.191	0.003606	68.53377
0.5	0.252	0.245	0.248	0.248333	0.003512	59.08841
0.25	0.352	0.358	0.354	0.354667	0.003055	41.57057
0.1	0.482	0.475	0.484	0.480333	0.004726	20.86766

Flavonoïdes F. 1-butanol						
[C+]	0.607					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.032	0.033	0.031	0.032	0.001	94.72817
2	0.067	0.061	0.063	0.063667	0.003055	89.51126
1.5	0.095	0.101	0.097	0.097667	0.003055	83.90994
1	0.142	0.144	0.148	0.144667	0.003055	76.16694
0.75	0.202	0.208	0.207	0.205667	0.003215	66.11752
0.5	0.283	0.287	0.285	0.285	0.002	53.04778
0.25	0.354	0.358	0.352	0.354667	0.003055	41.57057
0.1	0.512	0.515	0.518	0.515	0.003	15.15651

➤ **Standard :**

Acide ascorbique						
[C+]	0.609					
[C]	D1	D2	D3	Moy	Ecartype	%
3	0.02	0.021	0.02	0.020333	0.000577	96.66119
2	0.03	0.029	0.03	0.029667	0.000577	95.12863
1.5	0.032	0.03	0.031	0.031	0.001	94.90969
1	0.032	0.034	0.033	0.033	0.001	94.58128
0.75	0.037	0.035	0.036	0.036	0.001	94.08867
0.5	0.052	0.049	0.05	0.050333	0.001528	91.73508
0.25	0.053	0.054	0.053	0.053333	0.000577	91.24247
0.22	0.055	0.054	0.053	0.054	0.001	91.133
0.2	0.057	0.055	0.056	0.056	0.001	90.8046
0.18	0.203	0.22	0.249	0.224	0.023259	63.21839
0.16	0.307	0.315	0.317	0.313	0.005292	48.60427
0.14	0.361	0.359	0.34	0.353333	0.01159	41.98139
0.12	0.439	0.421	0.442	0.434	0.011358	28.73563
0.1	0.459	0.464	0.465	0.462667	0.003215	24.02846

Annexe IV : Tableau réalisé lors du traçage de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique :

[C]	125	50	40	31.25	20	10
Do	2.306	0.917	0.735	0.73	0.42	0.2