

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies



**Mémoire de Fin d'Etudes en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master
Académique en Sciences de la Nature et de la Vie**

Option : Biotechnologie Végétale

Thème :

**Etude phytochimique, analytique, antimicrobienne et
pharmaco-toxicologique des rameaux feuillés
du cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.)**

Réalisé par : Boughérara Yousra

Soutenu le: 02/07/2014

Devant le jury composé de :

M^{me} Allal L.	Professeur	Université Blida 1	Présidente
M^{me} Amrine SC.	Maitre assistante B	Université Blida 1	Examinatrice
M^{me} Benzahra S.	Doctorante	Université Blida 1	Examinatrice
M^{me} Amara N.	Maitre assistante A	Université Blida 1	Promotrice

2013-2014

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier :

Notre promotrice, M^{me} AMARA N. Maitre assistante A à l'université de Blida1 pour sa patience, ses encouragements et les efforts fournis.

M^{me} Allal L. Professeur à l'université de Blida1 d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de ce mémoire.

M^{me} Amrine SC. Maitre assistante B à l'université de Blida1 d'avoir consacré une partie de son temps pour examiner notre travail et faire partie du jury.

M^{me} Benzahra S. Doctorante à l'université de Blida1 d'avoir consacré une partie de son temps à examiner ce mémoire et faire partie du jury.

Nous tenons à remercier vivement tout le groupe du CRD El-Harrach en particulier M^{me} Zahi C., M^{me} Mazouzi N., M^{me} Chahdan S., M^r Dahmen M., et M^r Bouziane M.

Nous tenons à remercier M^{me} Amam S., pour nous avoir permis de manipuler au laboratoire du PFE du département de Biologie.

Nous exprimons nos vives gratitudee à tous nos enseignants, qui nous ont donné tant de sciences au cours de ces années.

Enfin, merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A l'âme de mon père, qui nous a quitté depuis 10 ans.

A ma chère mère, pour ses mains qui ont tant travaillé pour moi, pour son cœur qui a été toujours une source de tendresse et l'exemple de dévouement, pour son sourire qui m'a réchauffé et pour son regard et son duaa qui m'ont vraiment encouragé.

*A mon cher mari **Mhamed**, pour sa patience et son aide durant tous les mois de la réalisation de ce mémoire, merci mon cher mimo.*

*A ma chère sœur **Meriem**, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi.*

A mes cousines : Malika, Sarha, Doudja, Ikram, Ferial, Kenza et Imene.

A mes amies : Soumiya, Rym, Amina, Naziha, Selma, Zahra, Fatima, Kholoud, Sarah, Amel et Hadjer.

A ma belle famille.

A toute ma famille paternelle et maternelle.

A toute la promotion de biotechnologie végétale : 2013/2014.

Yusra

Résumé

Le présent travail, est une contribution, à l'étude phytochimique et analytique, suivie par la mise en évidence de quelques activités biologiques et l'étude de la toxicité des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L.

Le screening phytochimique, a révélé la présence des flavonoïdes, des tannins catéchiques, des tannins galliques, des saponosides, des leuco-anthocyanes, des glycosides, des coumarines et des mucilages et l'absence des anthocyanes et des alcaloïdes dans les rameaux feuillés de la plante étudiée.

L'extraction méthanolique, de la poudre des rameaux feuillés du Cyprès vert, a donné un rendement de 44 %.

Le dosage spectrophotométrique, nous a permis de quantifier les teneurs en polyphénols totaux, qui ont été de 471,05 µg/mg éq acide gallique et 442,00 µg/mg éq acide gallique respectivement pour l'extrait méthanolique et l'infusé. Ce dosage, nous a permis aussi de quantifier la teneur en flavonoïdes, qui a été de 6,69 mg/ g éq Rutine.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien, a montré que, globalement, les bactéries à Gram+ ont été plus sensibles que celles à Gram- vis-à-vis l'extrait phénolique et l'infusé à 10% des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. Tandis que, les souches fongiques étudiées, ont été sensible qu'à l'extrait.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire, a révélé que, l'infusé à 10% des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. possède une activité anti-inflammatoire avec un taux de réduction d'œdème de 56,20%.

Le test limite de la toxicité de l'infusé, exécuté à une dose de 2000mg/kg, a montré que rameaux les feuillés *Cupressus sempervirens* L. sont relativement considérés non toxiques.

Mots clés: *Cupressus sempervirens* L., screening phytochimique, activité antimicrobienne, activité anti- inflammatoire, toxicité.

Summary

This work is a contribution to the phytochemical and analytical study followed by setting in evidence of some biological activities and a study of toxicity on the stems leafed of *Cupressus sempervirens* L.

The phytochemical screening, revealed the presence of flavonoids, tannins, Gallic-tannins, saponins, glycosides, coumarins, anthocyanins, leuco-anthocyanins and alkaloids are absents in stems leafed of the studied plant.

The methanolic extraction of stems leafed of *Cupressus sempervirens* L.gave a yield at 44%.

The assay spectrophotometric, has allowed us to quantify the concentrations of totals polyphenols, wich were 471,05 µg/mg and 442,00 equivalent gallic acid from extract and infusion respectively. This assay, has also allowed us to quantify the concentrations of flavonoides, wich were 6,69 mg/g eq Rutin.

The evaluation of the antimicrobial activity, showed that Gram+ bacteria were more sensitive than Gram- bacteria against the extract and the infusion about stems leafed of *Cupressus sempervirens* L.but the yeast tested were sensitive just against extract.

The study of anti-inflammatory activity revealed that the infusion of stems leafed has reducing swelling with a rate of 56, 20%.

The limit toxicity test of infusion at a concentration of 2000 mg / kg, showed that the stems leafed of *Cupressus sempervirens* L. are considered relatively no-toxic.

Keywords: *Cupressus sempervirens* L., phytochemical screening, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, toxicity.

الملخص

من خلال هنا العمل , تطرقنا إلى دراسة نباتية كيميائية و تحليلية , متبوعة بدراسة لنشاط ضد الميكروبي و ضد الإلتهاب و سمية الأغصان المورقة لنبتة شجرة الحياة.

إختبار الفحص الكيميائي النباتي أثبت وجود مركبات الفلافونيد, الصابونوسيد, لوكوانتوسيان, الجليكوسيدات, الكومارين و الهلام النباتي مع انعدام الانتوسيانين و القلويدات داخل الأغصان المورقة للنبتة المدروسة.

الإستخلاص الميثانولي من مسحوق الأغصان المورقة لشجرة الحياة, أعطى مردود 44 % .
الفحص الطيفي ,مكننا من قياس البولفينول العام, حيث كان 05, 471 ميكروغرام /غرام و 442 ميكروغرام /غرام
معادل حمض الغال بالنسبة للمستخلص الميثانولي و المصبوب, علما أن نفس الفحص,مكننا من قياس تركيز الفلافونيد, الذي كان 6,69 ملغ/غ معادل روتين.

تقييم النشاط ضد الميكروبي بين عامة أن, البكتيريا الموجبة كانت حساسة أكثر من البكتيريا السالبة تجاه المستخلص الميثانولي و المائي أما الفطريات المدروسة فكانت حساسة فقط اتجاه المستخلص الميثانولي.

دراسة نشاط ضد الإلتهاب أظهرت أن المستخلص المائي من الأغصان المورقة لشجرة الحياة فعال ضد الإلتهاب بنسبة 20 , 56 بالمئة.

من خلال فحص السمية بجرعة 2000 كغ/ مغ استطعنا التوصل إلى أن الأغصان المورقة للنبتة المدروسة غير سامة.
الكلمات المفاتيح : شجرة الحياة , الفحص الكيميائي النباتي, النشاط ضد الميكروبي, نشاط ضد الإلتهاب, السمية.

Liste des abréviations

CRD: Centre de recherche et de développement.

ISO: International Standard Organization.

NOS: Nitrique Oxyde Synthétase (enzyme).

O.N.A.B: Office National d'Alimentation du Bétail..

USDB: Université Saad Dahlab de Blida.

UV : Ultra-Violet.

PFE : Projet de Fin d'Etudes.

ATCC: American Type Culture Collection.

éq: équivalent.

T: Température

E: Eclairage.

Glossaire

Aflatoxines : Ce sont des substances élaborées par des champignons (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus sp*) dont la toxicité ne s'exerce pas sur l'hôte, mais sur les consommateurs (**Corbaz, 1990**).

Analgésique ou Antalgique : C'est un médicament capable de diminuer la perception des sensations douloureuses sans entraîner la perte de conscience (**Rech, 2001**).

Antitussif : Correspond à un médicament calmant la toux (**Kenbaum, 2008**).

Antispasmodique ou spasmolytique : c'est un médicament susceptible d'entraîner un relâchement des muscles lisses (**Kenbaum, 2008**).

Aponévrose plantaire : C'est la membrane conjonctive, qui enveloppe les muscles et dont les prolongements ou tendons fixent les muscles aux os (**Chaouche-Mazouni, 2008**).

Arthrite : C'est une maladie, qui s'attaque aux articulations (**Laurier et Lepage, 1992**).

Astringent : Désigne ce qui, renforce les muqueuses et la peau, réduisant ainsi les sécrétions et les saignements (**Iserin, 2001**).

Asphyxie : C'est un terme médical signifiant l'arrêt plus au moins long, de la circulation d'oxygène dans le corps (**Dodelin et al., 2007**).

Carragénine : C'est un Mucopolysaccharide sulfaté extrait d'une algue marine. (**Teucher et al., 2005**).

Chélation : C'est la constitution d'un ion ou d'un atome métallique par un ligand, conduisant à un chélate (**Larousse, 2004**).

Convulsion : C'est la contraction violente et involontaire d'un ou plusieurs muscles (**Teucher et al., 2005**).

Leucotriènes : C'est des substances qui augmentent la perméabilité des vaisseaux. En association avec les prostaglandines, elles peuvent déclencher l'ensemble les symptômes caractéristiques d'une inflammation (**Keinz et al., 2001**).

Œdème : C'est un gonflement anormal d'un tissu (**Gucrin et Thieulle, 2005**).

Glossaire

Phéromones sexuelles : Ce Sont des substances émises par les femelles, ils se dispersent dans l'atmosphère à de grandes distances et attirent les individus de sexe opposé pour l'accouplement (**Guét, 2003**).

Prostaglandine : C'est une substance isolée dans le liquide séminale et la prostate, mais aussi dans de nombreux tissus et organes, et douée de propriétés physiologiques très diverses (**Chaouche-Mazouni, 2008**).

Psychotropes : Se dit de toute substance capable de modifier le comportement psychique (**Aït Youssef, 2006**).

Vasoconstricteurs : C'est terme, qui signifie toute substance provoquant une diminution du calibre artériocapillaire (**Stora, 2010**),

Liste des figures

Figure 01 : Arbre du cyprès vert.....	5
Figure 02 : Tronc du cyprès vert.....	6
Figure 03 : Rameaux feuillés juvéniles du cyprès vert.....	6
Figure 04 : Rameaux feuillés du cyprès vert avec inflorescences.....	6
Figure 05 : Schéma simplifié des voies principales, conduisant à la synthèse des métabolites secondaires et leur interaction avec les métabolites primaires.....	9
Figure 06 : Structure chimique de quelques coumarines.....	11
Figure 07 : Structures chimiques des différentes classes des flavonoïdes.....	13
Figure 08 : Schéma général de la procédure expérimentale, effectuée sur les rameaux feuillés du cyprès vert « <i>Cupressus sempervirens</i> L. ».....	19
Figure 09 : Protocole expérimental de l'extraction méthanolique des rameaux feuillés du cyprès vert « <i>Cupressus sempervirens</i> L. ».....	23
Figure 10 : Différentes étapes de l'activité antimicrobienne.....	31
Figure 11 : Différentes étapes de l'activité anti-inflammatoire.....	33
Figure 12 : Etapes du test limite de toxicité.....	35
Figure 13 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	39
Figure 14 : Zones d'inhibition des souches microbiennes : <i>Escherichia coli</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus subtilis</i> vis-à-vis l'extrait.....	43
Figure 15 : Absence de zones d'inhibition (9mm) pour <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , et <i>Beauveria bassiana</i> vis-à-vis l'infusé.....	44
Figure 16 : Zones d'inhibition des souches bactériennes : <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus épidermidis</i> et <i>Bacillus subtilis</i> vis à vis l'infusé.....	44
Figure 17 : Pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les lots T, R et E.....	47
Figure 18 : Balance analytique.....	ANNEXE2
Figure 19 : Plaque chauffante	ANNEXE2
Figure 20 : Tests du screening phytochimique.....	ANNEXE3

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PARTIE I : Recherche bibliographique	
I.1. Phytothérapie et plante médicinales	
I.1.1. Historique.....	3
I.1.2. Définition de la phytothérapie et des plantes médicinales.....	3
I.1.3. Avantages de la phytothérapie.....	3
I.2. Généralités sur la plante : Cyprès vert (<i>Cupressus sempervirens</i> L.).....	5
I.2.1. Historique médicale.....	5
I.2.2. Systématique.....	5
I.2.3. Description botanique.....	5
I.2.4. Noms vernaculaires.....	7
I.2.5. Habitat.....	7
I.2.6. Mode de multiplication.....	7
I.2.7. Exigences pédoclimatiques du cyprès vert	7
I.2.8. Parties utilisées.....	8
I.2.9. Composition chimique.....	8
I.2.10. Propriétés thérapeutiques et utilisations de <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	8
I.3. Métabolites secondaires	
I.3.1. Classes des métabolites secondaires.....	10
I.3.1.1. Composés phénoliques.....	10
I.3.1.2. Composés azotés.....	15
I.3.1.3. Glycosides.....	15
I.3.1.4. Terpénoides	15
I.3.1.5. Mucilages.....	16
I.3.2. Intérêt des métabolites secondaires.....	16

SOMMAIRE

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique.....	17
II.1.2 Matériel non biologique.....	18

II. 2. Méthodes

II.2.1. Taux d'humidité.....	20
II.2.2. Tests du Screening phytochimique.....	20
II.2.3. L'extraction méthanolique.....	22
II.2.4. Analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible.....	25
II.2.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	25
II.2.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	26
II.2.5. Les activités biologiques.....	28
II.2.5.1. Activité antimicrobienne	28
II.2.5.2. Activité anti-inflammatoire	32
II.2.6. Etude du test limite de toxicité.....	34

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats de l'étude phytochimique.....	36
III.1.1. Détermination du taux d'humidité.....	36
III.1.2. Screening phytochimique.....	36
III.2. Résultat du rendement de l'extraction méthanolique.....	38
III.3. Résultat de l'analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible	39
III.3.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux.....	39
III.3.2. Résultats du dosage des flavonoïdes.....	41

SOMMAIRE

III.4. Résultats de l'étude des activités biologiques.....	42
III.4.1. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	42
III.4.2. Résultats de l'activité anti-inflammatoire.....	47
III.5. Résultats du test limite de toxicité.....	49
CONCLUSION.....	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	52
ANNEXES	

Introduction

La phytothérapie, existe depuis des temps et tire ses ressources exclusivement des plantes, en utilisant des posologies courantes et classiques. Les hommes, ont toujours pratiqué cette médecine douce, élémentaire et efficace, en transmettant de génération en génération leur savoir empirique (**Moatti et al., 1983**).

Les métabolites secondaires restent l'objet de nombreuses recherches *in Vivo* et *in Vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les huiles essentielles auxquelles de nombreux effets thérapeutiques sont attribués (**Favier, 2003**).

L'Algérie, de part son climat et ses terrains fertiles, possède une flore très riche et offre des conditions de développement de nouvelles exploitations agricoles, des plantes médicinales et aromatiques (**Beloued, 2005**).

A cet effet, et dans le cadre de la contribution à la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à l'étude des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. Car, cette plante, possède un large spectre d'intérêts thérapeutiques grâce aux polyphénols de ses rameaux feuillés. Mais, qui n'ont pas été suffisamment étudiés contrairement aux huiles essentielles de cette plante, qui ont été l'objet de nombreux travaux antérieurs.

L'objectif de notre travail, consiste à réaliser :

- Une étude phytochimique, pour déterminer le taux d'humidité de la poudre des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. et la mise en évidence de quelques métabolites secondaires dans la poudre et dans l'infusé à 10% des rameaux feuillés du cyprès vert.
- Une Extraction méthanolique, de la poudre des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. afin d'évaluer son rendement.
- Une analyse quantitative par spectrophotomètre UV- visible, pour déterminer la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique (1mg/1ml) et l'infusé et la teneur en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique (10mg/1ml).

Introduction

- Une étude microbiologique : pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'extrait phénolique (1mg du résidu sec/ 1ml d'éthanol) et l'infusé à 10% des rameaux feuillés du cyprès vert sur quelques souches microbiennes.
- Une étude de l'activité anti-inflammatoire de l'infusé à 10% des rameaux feuillés de la plante étudiée.
- L'étude toxicologique : qui a pour but d'étudier la toxicité de l'infusé par le test limite.

I. Recherche bibliographique

I.1. Phytothérapie et plantes médicinales

I.1.1. Historique

Les découvertes les plus anciennes, prouvant l'utilisation des plantes à des fins médicinales datent de 5000 ans. La première ordonnance connue, au 3^{ème} millénaire avant Jésus-Christ, en Mésopotamie (l'Irak actuel), prescrivait déjà des remèdes à base de saule pour soigner les maux de tête. La pharmacopée chinoise, connue depuis plusieurs millénaires et les papyrus des civilisations pharaoniques, constituent autant de preuves de l'ancienneté de la phytothérapie. Hippocrate, consacra une grande partie de son existence à l'étude de cette médecine par les plantes (**Winckle, 2006**).

Les arabes avaient, aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie tels qu'Abu Baker al-Razzi ou Rhazés (865-925). Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne et Ibn al Baytar, ainsi ce sont les arabes, qui donnèrent à la pharmacie son caractère scientifique. Les traditions pharmaceutiques arabes, passèrent en Europe et influencèrent profondément les grandes universités au 9^{ème} siècle (**Amar, 1995**).

I.1.2. Définition de la phytothérapie et des plantes médicinales

Selon **Roland(2002)**, la phytothérapie, est le traitement par les plantes, du grec « pythos qui signifie ; plantes » et « thérapie ; soin ou cure ».

La phytothérapie désigne, le traitement curatif ou préventif des maladies, par l'utilisation des préparations obtenues à partir des plantes entières ou d'organes de plantes : feuilles, fleurs, racines, fruits et graines (**Fintelman et Weiss, 2004**).

Selon **Paris et Schawenberg (1977)**, une plante médicinale, est toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces, peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation.

I.1.3. Avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. Elle permet d'avoir recours à des traitements individualisés alors que, le médicament chimique, est composé d'une seule molécule. La plante possède une action douce, mais plus profonde grâce à la synergie de toutes les substances, qu'elle contient, dénuées le plus souvent de tout effet secondaire toxique. L'emploi médicinal des plantes, apparait de plus en plus souvent, comme une réponse aux problèmes générés par les médicaments chimiques (**Winckle, 2006**).

I. Recherche bibliographique

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme et elle est souvent associée aux traitements classiques.

Elle connaît de nos jours, un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus les effets secondaires, induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (**Deuroy et al., 1978**).

I. Recherche bibliographique

I.2. Généralités sur la plante : Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.)

I.2.1. Historique médicale

Le Cyprès vert, est une espèce très ancienne (ère tertiaire-5,3 millions d'années). Il possède une longévité exceptionnelle, certains cyprès contemporains, ont été estimés âgés de 2000 ans (**Fournier, 2010**). Dans l'antiquité, les Grecs ont soigné la dysenterie, les crachats, l'asthme et la toux en administrant les cônes de cyprès concassés et marinés dans du vin (**Iserin, 2001**). Les Assyriens et les Romains, ont utilisé les fruits, en cônes, appelés noix ou galbules de cyprès, dont les principes actifs sont d'excellent vaso-constricteurs (**Bianchini et Corbetta, 1975**).

I.2.2. Systématique

Selon **Farjon (2005)** et **Zsolt et Istvan (2012)**, le cyprès vert appartient au :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Gymnospermes
- Classe : Pinopsida
- Ordre : Pinales
- Famille : Cuprécées
- Genre : *Cupressus*
- Espèce : *Cupressus sempervirens* L.

I.2.3. Description botanique

Aspect : Le cyprès vert, est un arbre de 20 à 25 mètres de haut ou plus. Il peut revêtir une forme étalée ou au contraire très allongée. La forme la plus courante possède un tronc droit (**figure 01**), des branches dressées et proches du tronc et présente un port très étroit et allongé, à sommet très effilé (**Dupéat et Polese, 2008**).



Figure 01 : Arbre du cyprès vert (**Original, 2014**).

I. Recherche bibliographique

Tronc : l'écorce du tronc, est fine, de couleur gris foncé, fissurée, se détachant en bandelettes (**figure 02**).



Figure 02 : Tronc du cyprès vert (**Original, 2014**).

Feuilles : les feuilles sont opposées, Squamiformes, de couleur vert foncé, mesurant de 2 à 5 mm de long sur les pousses principales. Elles sont pointues et légèrement distantes, mesurant 1mm de long sur les pousses latérales (**Figure03**). Elles sont jointives comme les tuiles d'un toit (**Bartels , 1997**).



Figure 03 : Rameaux feuillés juvéniles du cyprès vert (**Original,2014**).

Cônes : Le cyprès vert est un arbre monoïque. Les cônes femelles (**Figure04**), sont globuleux et ovoïdes, mesurant de 8 à 40mm de long et sont formés de 4 à14 écailles également disposées par paire opposées-décussés. Ils sont d'abord verts très fermés, puis secs à maturité (ils atteignent leur maturité entre 18 à 24 mois). Les cônes mâles restent petits, de couleur vert jaunâtre et mesurant 3 à 8 mm de long. Les graines sont petites et mesurant de 4 à 7mm de long (**Bartels, 1998**).

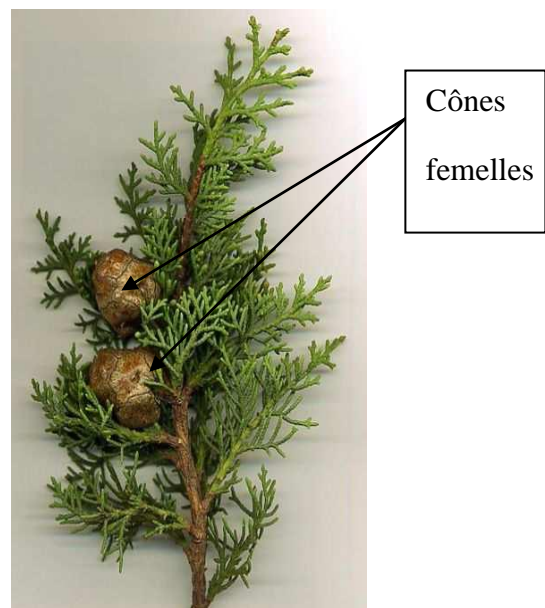


Figure 04 : Rameaux feuillés du cyprès vert avec inflorescences

I. Recherche bibliographique

I.2.4. Noms vernaculaires

Nom français : Cyprès vert, Cyprès de Provence et Cyprès pyramidale (**Fourmier, 2010**).

Nom algérien : Ceronal, Carou et Bestana (**Ali-Delille, 2010**).

Nom arabe : Chadjarat al hayat (**Koubaissi, 1971**).

Nom targui ou berbère : Tididi et Irz (**Beloued, 2001**).

I.2.5. Habitat

Le cyprès vert, préfère des habitat variés, depuis le niveau de la mer jusqu'à les altitudes élevées dans les régions montagneuses (**Judd et al., 2002**). Il pousse en Turquie et dans le bassin méditerranéen (**Iserin, 2007**) et Il est fréquemment, cultivé et naturalisé en Europe du sud (**Hensel, 2008**).

Le cyprès vert, est localisé dans les régions tempérées chaudes ou subtropicales de l'hémisphère nord (l'Amérique du nord, l'Amérique centrale, le nord de l'Afrique « Algérie, Maroc et Tunisie », le moyen orient, l'Himalaya, la Chine méridionale et le nord du Vietnam) (**Ducrey et al., 1999**).

I.2.6. Mode de multiplication

La multiplication se fait, par semi au printemps, après avoir pris soin de conserver les graines au froid durant trois mois (pour respecter la dormance) et le bouturage en fin d'été (**Boujemaa et Cherni, 2005**).

I.2.7. Exigences pédoclimatiques du cyprès vert

- ❖ **Climat** : Le cyprès vert, est planté au nord de son aire naturelle à condition que, les températures hivernales ne descendent pas au dessous de -12°C . C'est une espèce sensible au gel (**Nedelec et al., 1993**).
- ❖ **Caractères pédologiques** : Le cyprès vert, est un arbre, qui se développe dans les sols bien drainés et calcaires, car il craint l'humidité excessive (**Benjamaa, 2004**).

I. Recherche bibliographique

I.2.8. Parties utilisées

Les parties utilisées, sont les jeunes rameaux feuillés et les cônes récoltés encore verts (Dupérat et Polese, 2008).

I.2.9. Composition chimique

La composition des différents organes, du cyprès vert est connue. Elle est caractérisée par la présence de bi-flavonoïdes dans ses rameaux : biflavones 8-8 (type cupressuflavone) et 8-3 (type amentoflavone). Les rameaux fournissent également une petite quantité d'huile essentielle. Les cônes renferment, des acides diterpéniques et des dérivés flavaniques (Rombi et Robert, 2007).

I.2.10. Propriétés thérapeutiques et utilisations de *Cupressus sempervirens* L.

L'aromathérapie exploite, son astringence et sa capacité de contracter les veines pour diminuer les ruptures des capillaires. C'est un tonique circulatoire dans le cas de varices et d'hémorroïdes, antibactérien, antitussif et antispasmodique pour réduire la toux. En phytothérapie, il est prescrit pour freiner le système parasymphatique et stimuler les œstrogènes (Bremness, 2005).

Les cônes du cyprès vert, sont utilisés sous forme d'infusion, de poudre ou d'extrait entrant dans des spécialités pharmaceutiques (gélules, comprimés et solutions buvables) (Goetz et Michel, 2008). Les cônes pulvérisés, entrent comme parfum dans les poudres composées, pour les dents dont le « traité des odeurs » et les rameaux feuillés, traités par le benzène, sont utilisés dans la parfumerie française. L'essence du cyprès, possède une efficacité contre la coqueluche (Aubaile et Nave, 2002).

Le cyprès vert, est fréquemment cultivé en Algérie, pour constituer des haies protectrices contre le vent et utilisé également, dans le reboisement du barrage vert (Beloued, 2001).

I. Recherche bibliographique

I.3. Métabolites secondaires

Une des singularités des végétaux, est de former de nombreux composés dont le rôle, au niveau de la plante, est mal connu ; le fait que, ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces indique, qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme générale et qu'ils n'exercent pas de fonction directe, au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétale : Ce sont les métabolites secondaires (**Guignard, 2000**).

Ils dérivent néanmoins de voies de biosynthèse (**Figure 05**) provenant, du métabolisme primaire (**Pillet, 2001**).

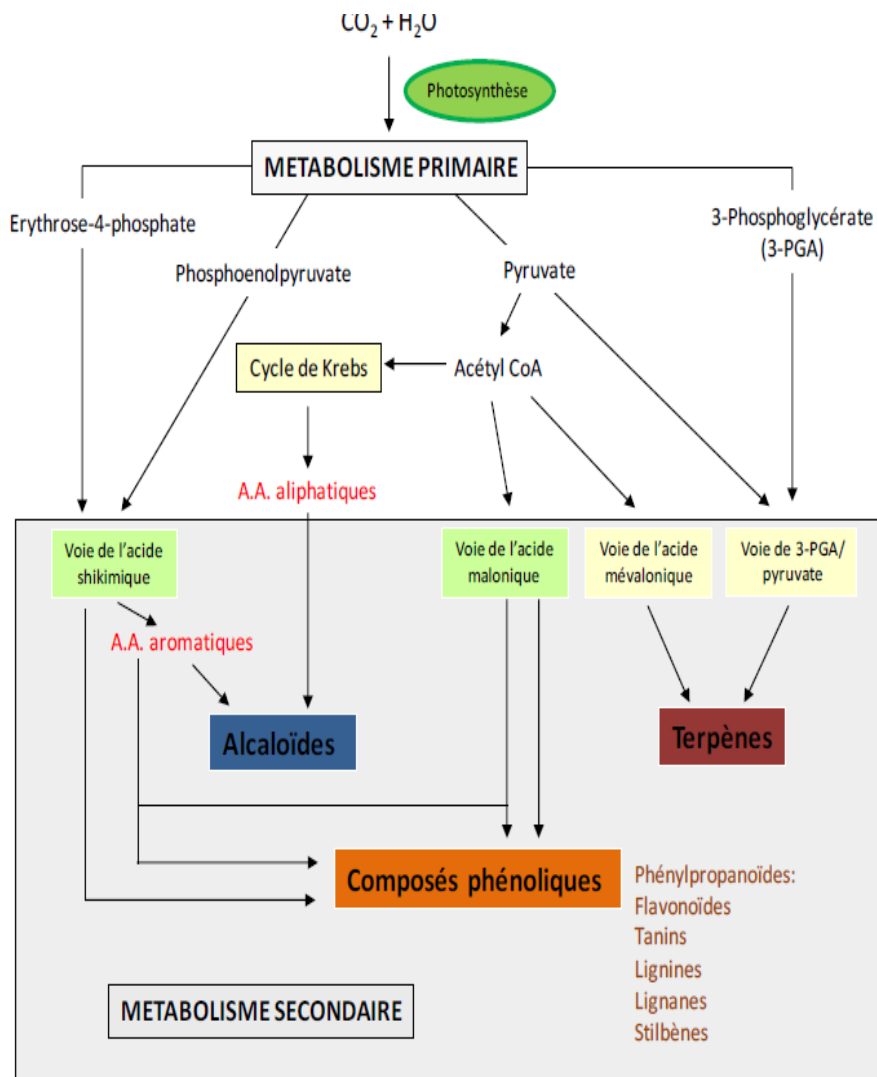


Figure 05 : Schéma simplifié des voies principales, conduisant à la synthèse des métabolites secondaires et leur interaction avec les métabolites primaires (**Pillet, 2001**).

I. Recherche bibliographique

I.3.1. Classes des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires comportent trois classes :

I.3.1.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques, sont l'une des trois grandes familles des métabolites secondaires, comprenant les acides phénols, les flavonoïdes et d'autres formes plus condensées comme les tannins (**Vercautern et al., 1998**). Ce sont des molécules biologiques, qui ont en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques (structures aromatiques), portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, modifiées ou pas. Comme c'est le cas pour la quasi-totalité des substances naturelles, qualifiées de métabolites secondaires. Leur répartition qualitative et quantitative, est inégale selon les espèces (**Sarni-Manchado et al., 2006**). D'où leur utilisation en tant que, marqueurs biochimiques en chimio-taxonomie, pour caractériser les cultivars ou leur variété en différentes espèces **in** (**Ouafi, 1987 ; 2007**).

Les polyphénols sont, des métabolites secondaires, intervenant comme antioxydants et protecteurs vis-à-vis des radicaux libres. Leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques. Ils sont utilisés dans les domaines de l'agroalimentaire et de la pharmacologie (**Allemand, 2005**).

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs classes :

A. Acides phénoliques

Les acides phénoliques, sont des composés phénoliques, dont la structure est caractérisée, par l'existence d'un seul noyau benzénique. Ils sont présents dans la majorité des végétaux, à l'état combiné (sous forme de liaison ester ou osidique), comme ils peuvent exister à l'état libre. Ils appartiennent à deux groupes (**Ribereau- Gayon, 1986**).

➤ Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques, sont les dérivés de l'acide benzoïque. Ils ont une formule de type C₆-C₁. Certains dérivent de l'acide shikimique et d'autres de la dégradation de l'acide cinnamique (**Sarni- Manchado et Cheynier, 2006**).

I. Recherche bibliographique

➤ Acides hydroxycinnamiques

C'est une classe très importante d'acides phénoliques, ayant une structure de base en (C₆-C₃), rarement présents à l'état libre. Ils existent souvent sous forme estérifiées ou de glycoside (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**)

➤ Coumarines

Elles sont des composés dérivés de l'acide hydroxycinnamique, par cyclisation interne de la chaîne latérale de celui-ci. A l'état naturel, elles se présentent à la fois sous forme hétérosidique et sous forme complexe, telles que les aflatoxines (**Gazengel et Orcchioni, 2001**).

Les coumarines les plus fréquentes, sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent, respectivement, aux acides : p-coumarique, caféique et férulique. Signalons également, la fraxétine et la daphnéine (**figure 06**) (**Dean, 1963**).



Figure 06 : Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).

Les coumarines possèdent, un tropisme nerveux et sanguin (anti-coagulant). Leur action sur le système nerveux, est sédative (calmante). Certaines coumarines, ont des propriétés anti-infectieuses vis à vis *Echerichia Coli* (**Gazengel et Orcchioni, 2001**).

B. Flavonoïdes

Les flavonoïdes, sont des combinaisons naturelles de phénol, avec des noyaux aromatiques. Ce sont des pigments, quasiment universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont également présents, dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant la protection des tissus, contre les effets nocifs du rayonnement UltraViolet (**Guignard, 1996**).

I. Recherche bibliographique

Selon **Bruneton (1999)**, les flavonoïdes, ont une large gamme d'effets pharmacologiques sur l'organisme. Ils augmentent la solidité des capillaires, participent au processus oxydants et désoxydant et produisent des effets spasmolytiques et anti-inflammatoires. Nous distinguons :

➤ B. 1. Hétérosides flavoniques

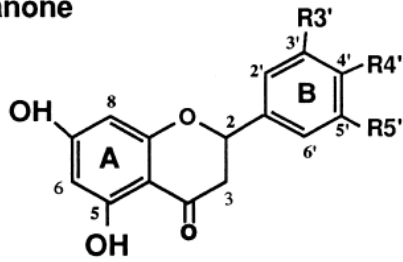
Les hétérosides flavoniques, résultent de la condensation, d'un groupement hydroxyle réducteur (hémiacétalique), d'un ose avec une substance non glucidique appelée **génine** ou **aglycone**. La diversité des hétérosides repose sur, la nature de l'atome de la génine portant l'hydrogène, qui se condense avec hydroxyle hémiacétalique, ainsi nous distinguons : les O- hétérosides ,qui sont les plus réponsus chez le règne végétal (hétérosides d'alcools, de phénols), les S-hétérosides,(hétérosides de thiols),les N-hétérosides (hétérosides d'aminés) et les C- hétérosides (liaison C-C entre l'ose et la génine) (**Gamet- Payrastre et al., 1999**).

➤ B.2. Aglycones flavoniques

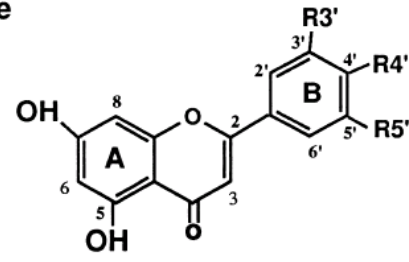
Les aglycones flavoniques, sont des composés très abondants, au niveau des feuilles et des tiges de la plupart des végétaux. Mais, ils sont assez rares au niveau des graines et des racines. Ils se divisent en: flavones (l'apigéninine et la lutéoline), flavonols (**Figure 07**) (le kaempférol, la quercétine et le myricétine), flavonones et dérivés voisins (**Ribereau-Gayon, 1986**).

I. Recherche bibliographique

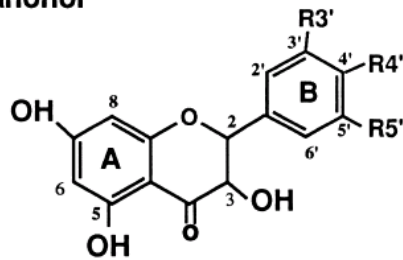
flavanone



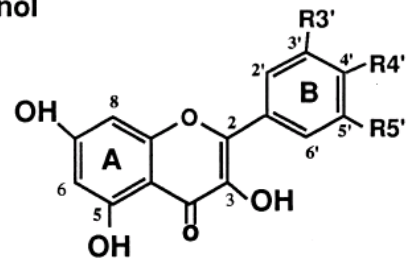
flavone



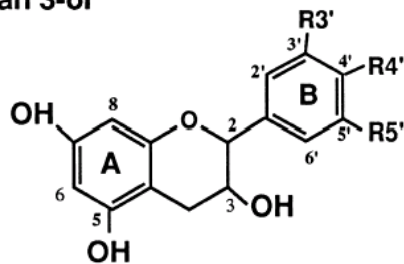
flavanonol



flavonol



flavan 3-ol



isoflavone

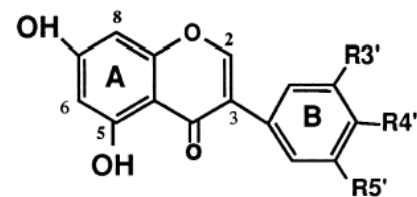


Figure 07: Structures chimiques des différentes classes de flavonoïdes (**Gamet-Payrastre et al., 1999**).

➤ B. 3. Anthocyanes

Les anthocyanes (proviennent du grec anthos : fleurs et kianos : bleu violet), sont des pigments végétaux, colorés selon le pH en rouge, violet ou bleu, du rouge orangé en milieu acide ou bleu mauve en milieu alcalin (**Audigie et Zonszain, 1991**).

Les anthocyanes, sont très répandus dans le règne végétal, sous forme d'hétérosides (anthocyanosides). Leur présence dans les plantes, est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues. Elles sont généralement localisées, dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau. Elles ont des propriétés antirhumatismales et anti-inflammatoires reconnues (**Bruneton, 2001**).

I. Recherche bibliographique

C. Tannins

Les tannins, sont connus depuis la plus Antiquité. Ils sont dérivés de l'acide gallique et d'autres acides polyphénoliques et ils résultent de l'estérification, par ces acides, des fonctions alcooliques du glucose. Leur structure chimique, est très variable mais comporte toujours une partie polyphénolique. Ils sont des substances d'origine organique, présentes dans pratiquement tous les végétaux et dans toutes leurs parties (écorces, racines et feuilles). Ils sont caractérisés par leur astringence, c'est à dire par une sensation de dessèchement dans la bouche (**Joslyn, 1964**).

Les tannins sont utilisés, depuis l'Antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux. Ils présentent des formes phénoliques condensées, capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter : gélatine, albumine et hémoglobine (**Allemand et al., 2005**).

Il est classique, de distinguer deux grands groupes de tannins différents, à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés ou proanthocyanidines Les tannins proanthocyanidines sont dotés d'activités antibactériennes et permettent de prévenir l'apparition d'infections urinaires (**Weinges, 1968**).

❖ Tannins condensés

Les tannins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légume, thé, dattes, ...) (**Haslam, 1998**).

❖ Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables, sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acides phénols ; la molécule glucidique, est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ces tannins, en raison de leurs nombreux groupements OH, se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (**Guignard, 1996**).

I. Recherche bibliographique

I.3.1.2. Composés azotés

➤ Alcaloïdes

Les alcaloïdes, sont souvent amers. Ce sont des composés azotés, basiques, d'où l'appartenance à la famille des amines. Ces derniers, les rendent pharmacologiquement très actifs. Ils existent sous forme de sels solubles (citrate, malate et benzoate) ou sous forme d'une combinaison avec les tannins (**Bruneton, 1999**).

Ils se rencontrent, surtout chez les Angiospermes. Ils sont très peu présents chez les thallophytes, les Ptéridophytes les Gymnospermes. Au niveau cellulaire, ils s'accumulent dans les vacuoles et constituent la source la plus importante de nos médicaments Les alcaloïdes ou les extraits qui, en renferment ont été utilisés, comme médicaments, relaxant musculaires, analgésiques, tranquillisants et psychotropes (**Guignard, 2000**).

I.3.1.3. Glycosides

Les glycosides, sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils se composent de deux parties, l'une contient un sucre, par exemple le glucose. Elle est le plus souvent inactive, mais exerce un effet favorable sur la solubilité du glucoside, sur son absorption et son transport vers les organes. L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie, la plus active, nommée aglycone (**Bruneton, 1993**).

➤ Saponines

Les saponines, sont des glycosides, qui se rencontrent dans une grande variété de végétaux. Elles ont un goût amer et la capacité de former une mousse, en présence d'eau (**Bernard et Larbier, 1992**). Ainsi la majorité des saponines, ont des propriétés hémolytiques. De nombreuses plantes contenant des saponines, sont utilisées en industrie pour les préparations galéniques et détergentes (**Oda et al., 2000 ; Sparg et al., 2004**).

I.3.1.4. Terpénoides

Les terpènes, sont des molécules organiques, constituées par un multiple de 5 atomes de carbone de formule générale $(C_5H_8)_n$. La molécule de base est l'isoprène. Ils sont classés, en fonction du nombre de leur unité isoprène en : Monoterpènes (10 atomes de carbone dans la molécule), sesquiterpènes (15 atomes de carbone) et diterpènes (20 atomes de carbones) (**Hadji-Minaglou et Kaloustian, 2012**).

I. Recherche bibliographique

II.3.1.5. Mucilages

Les mucilages sont, des polymères complexes, de nature d'hydrate de carbone avec des structures hautement ramifiées et complexes. Ils contiennent des proportions variées de D-arabinose, D-galactose et D-xylose. Ainsi que, l'acide galacturonique (**Mazliak, 1981**).

I.3.2. Intérêt des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires, ont plusieurs rôles importants, en effet ils peuvent dissuader les prédateurs (rôle de défense) : Les herbivores évitent, les plantes toxiques. Exemple : Les odeurs du Pélargonium, repoussent les herbivores. Ils peuvent également, attirer les pollinisateurs : Les Couleurs et aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : Certaines Orchidées, synthétisent, des phéromones sexuelles, qui sont des substances volatiles. Chez les insectes, ces mêmes substances, sont émises par les femelles pour attirer les mâles. De plus, ils découragent la compétition vis-à-vis d'autres espèces : C'est l'allélopathie. Certaines plantes émettent, des substances pour inhiber, la croissance des autres plantes. Exemple : Le noyer produit le juglans, qui inhibe la croissance des autres plantes, dans un rayon de 8m autour du tronc (**Bruneton, 1993**).

II. Matériel et méthodes

Notre expérimentation a été réalisée, pendant trois mois allant du mois d'Avril jusqu'au mois de Juin (2014) au niveau :

- ❖ Des laboratoires de pharmacotoxicologie et microbiologie du CRD SAIDAL d'El-Harrach, pour la réalisation de l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire et la toxicité.
- ❖ Du Laboratoire du PFE (département de biologie) université Saad Dahlab de Blida, pour la réalisation de l'extraction méthanolique, le screening phytochimique, le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des rameaux feuillés du cyprès vert.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

A) Matériel végétal

Le matériel végétal, est constitué de 179,42g des rameaux feuillés frais du cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.), récoltés au printemps (à la fin Mars).

La plante a été identifiée au niveau du département d'Agronomie de l'USDB (laboratoire de botanique) par M^{me} Briki F.

B) Micro-organismes

Le test antimicrobien a été réalisé sur les souches microbiennes illustrées dans le **Tableau I.**

Tableau I : Souches microbiennes utilisées

Souches bactériennes	Gram	ATCC	Famille
<i>Escherichia coli</i>	-	6051	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	6538	<i>Staphylococaceae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	+	6633	<i>Bacillaceae</i>
<i>Staphylococcus épidermidis</i>	+	9341	<i>Staphylococaceae</i>
<i>Candida albicans</i> (souche fongique)		24433	<i>Sacchromycetaceae</i>
<i>Beauveria bassiana</i> (souche fongique)		74040	<i>Ophiocordycipitaceae</i>

II. Matériel et méthodes

C) Matériel animal

Les souris, sont maintenues, dans des cages numérotées, qui sont en polypropylène, pour éviter les infections cutanées. Chaque cage doit porter les indications illustrées dans le **Tableau II**

Tableau II : Matériel animal utilisé

Matériel animal	Race	Sexe	Nombre	poids	Alimentation	Conditions d'élevage
Souris	Albinos	Mâles et femelles	18 : activité anti-inflammatoire 6 : Toxicité	De 18 à 22 g	Granulés et eau de robinet « O.N.A.B »	T :20à 24°C H : 50% E :10 heures

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé (l'appareillage, la verrerie, les réactifs et les milieux de culture) est illustré en **Annexe 1** et **Annexe 2**.

II.2. Méthodes

Nous avons adopté, pour la réalisation de notre étude ce plan général, qui résume la procédure expérimentale effectuée sur les rameaux feuillés du cyprès vert « *Cupressus sempervirens* L. » (**Figure 08**).

II. Matériel et méthodes

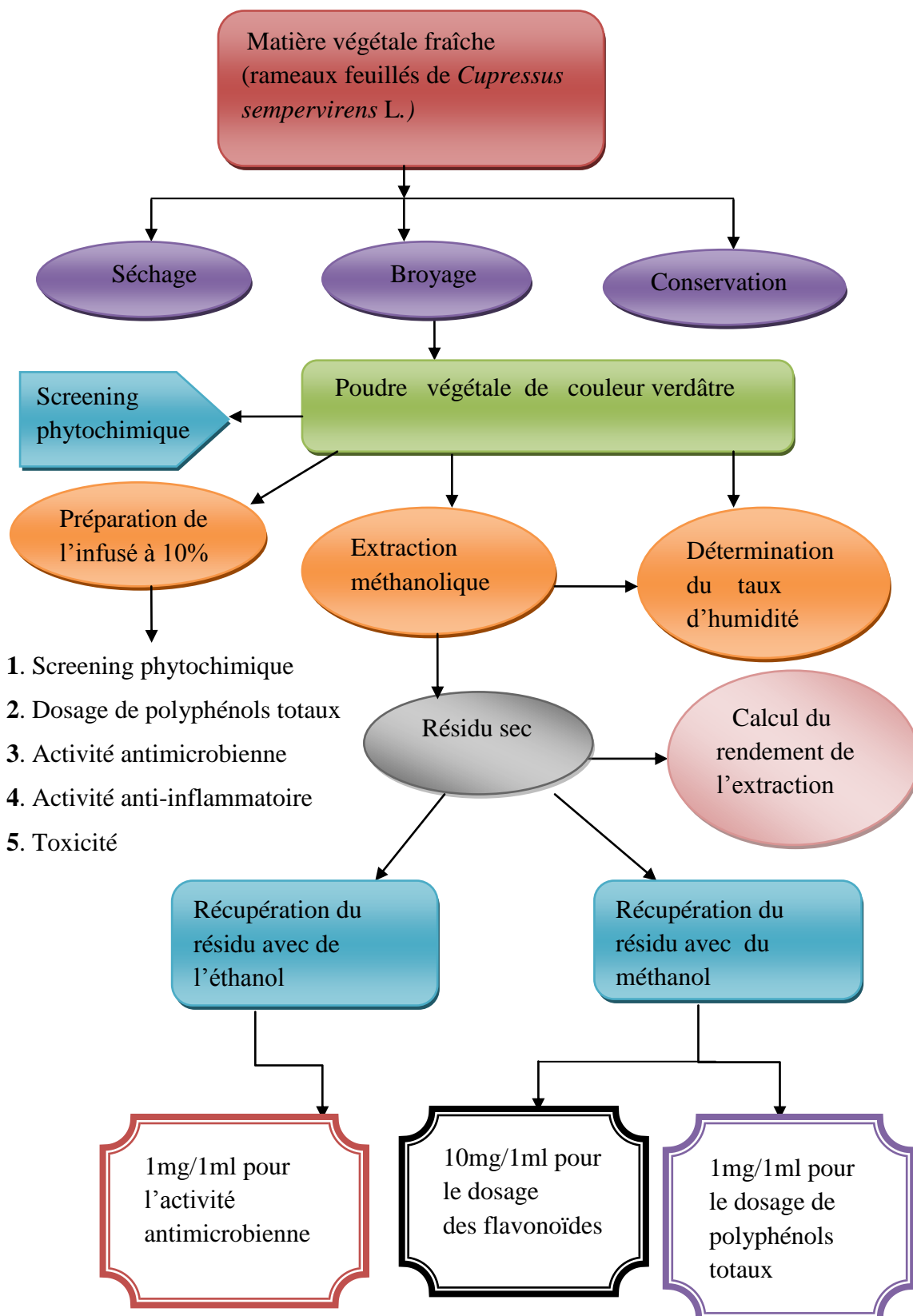


Figure 08 : Schéma général de la procédure expérimentale, effectuée sur les rameaux feuillés du cyprès vert « *Cupressus sempervirens L.* » (Original, 2014).

II. Matériel et méthodes

Le matériel végétal récolté, est constitué des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. Il est séché à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité, pour éviter le développement des moisissures et à une température ambiante, afin d'éviter la photo-oxydation des substances. Il est ensuite, broyé (à l'aide d'un moulin à café) finement en poudre de couleur verdâtre et enfin conservé dans des flacons en verre, dans un endroit sec à l'abri de la lumière.

II.2.1. Taux d'humidité « H »

❖ Mode opératoire

En suivant la méthode d'ISO 662 (1998), nous avons séché les béchers dans l'étuve et les laisser refroidir. Puis, nous avons pesé leur poids. Après avoir taré, nous avons pesé 5 g de poudre végétale dans des béchers avec une balance de précision. Ensuite, nous avons placé les béchers dans l'étuve à 105 °C pendant 24 heures. Après étuvage, nous avons pesé chaque 3h jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H = \frac{(P_i - P)}{P_i} \times 100$$

H : Taux d'humidité en pourcent.

P_i : Masse de l'échantillon avant séchage à l'étuve (g).

P : Masse de l'échantillon après séchage à l'étuve (g).

❖ Préparation de l'infusé (à 10%)

A 10 g de poudre végétale, sont ajoutés 100 ml d'eau distillée bouillante, laissés infuser pendant 10 min. Puis filtrer. Le filtrat est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée (Bouyer, 1996).

II.2.2. Tests du Screening phytochimique

Le but de ces tests, est de connaître la composition en métabolites secondaires. Ils sont effectués, soit sur la poudre du broyat, soit sur l'infusé. Le screening phytochimique, est soit des réactions de colorations ou de précipitations (Paris et Moyse, 1976).

Les réactions du screening phytochimique que nous avons effectué ont été décrites par (Bouyer, 1996).

II. Matériel et méthodes

A. Flavonoïdes

A 5ml de l'infusé, sont additionnés 5 ml d'HCL, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool isoamylique. La réaction des flavanols, flavanones et flavones par le magnésium métallique donne une couleur rouge orangée, ce qui indique la présence des flavonoïdes.

B. Les tannins

➤ Tannins catéchiques

A 5 ml de l'infusé, sont ajoutées quelques gouttes de la solution FeCl_3 à 5%. L'apparition d'une couleur bleu noire indique la présence des tannins catéchiques.

➤ Tannins galliques

A 5 ml de l'infusé, sont ajoutés 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 . L'apparition d'une couleur bleu noire indique la présence des tannins galliques.

C. Saponosides

A 2 ml de l'infusé, sont additionnées quelques gouttes d'acétate de plomb. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

D. Anthocyanes

Quelques gouttes d'HCL concentré, sont ajoutées à 5 ml de l'infusé. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence des anthocyanes.

E. Leuco-anthocyanes

2 g de poudre végétale, sont additionnés à 20 ml d'un mélange de propanol /acide chlorhydrique (v/v). Après, le mélange est porté à l'ébullition dans un bain-marie pendant quelques minutes. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence des leuco-anthocyanes.

F. Alcaloïdes

5 g de poudre végétale, sont humectés avec 20 ml d'ammoniaque ½, puis laisser macérés pendant 24 heures dans 50 ml d'un mélange éther chloroforme (3v /v). Ensuite, le filtrat est épuisé par HCL à 2N. Après, quelques gouttes du réactif de drangendroff sont ajoutées à la solution chlorhydrique. L'apparition d'un précipité rouge indique la présence des alcaloïdes.

II. Matériel et méthodes

G. Glycosides

A 2 g de poudre végétale, sont ajoutées quelques gouttes d'acide sulfurique. Une coloration rouge brique apparait. Après agitation, une coloration violette se forme en présence de glucosides.

H. Coumarines

2 g de poudre végétale, sont mis à l'ébullition dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min dans un bain-marie puis filtrer. Ensuite, 3 à 5 ml de filtrat, sont ajoutés à 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% jusqu'à l'obtention d'un milieu faiblement acide avec formation de troubles.

I. Mucilages

Dans un tube à essai, 1ml d'infusé est ajouté à 5 ml d'alcool absolu. La formulation d'un précipité floconneux blanc montre la présence des mucilages

II.2.3. L'extraction méthanolique

➤ Mode opératoire

Le protocole que nous avons suivi pour la réalisation de l'extraction méthanolique a été décrit par (**Upson et al., 1999**).

10g de poudre végétale des rameaux feuillés sèches sont mis en ébullition dans un bain marie à 70°C, pendant 5 min avec 200 ml du méthanol aqueux 70%. Puis, le mélange a subit une macération pendant 24h sous agitation magnétique. Après macération, une filtration a été effectuée sur papier filtre. Le filtrat est ensuite évaporé à 40°C à sec dans un rotavapor.

Le résidu sec obtenu est soit :

- Repris dans un volume de méthanol, dans le but d'obtenir un extrait, avec une concentration de 1mg /1ml pour le dosage des polyphénols totaux et de 10mg/1ml pour le dosage des flavonoïdes.
- Repris dans un volume d'éthanol, dans le but d'obtenir un extrait, avec une concentration de 1mg/1ml pour le test antimicrobien.

Les différentes étapes de l'extraction méthanolique sont représentées dans la **Figure 09**

II. Matériel et méthodes

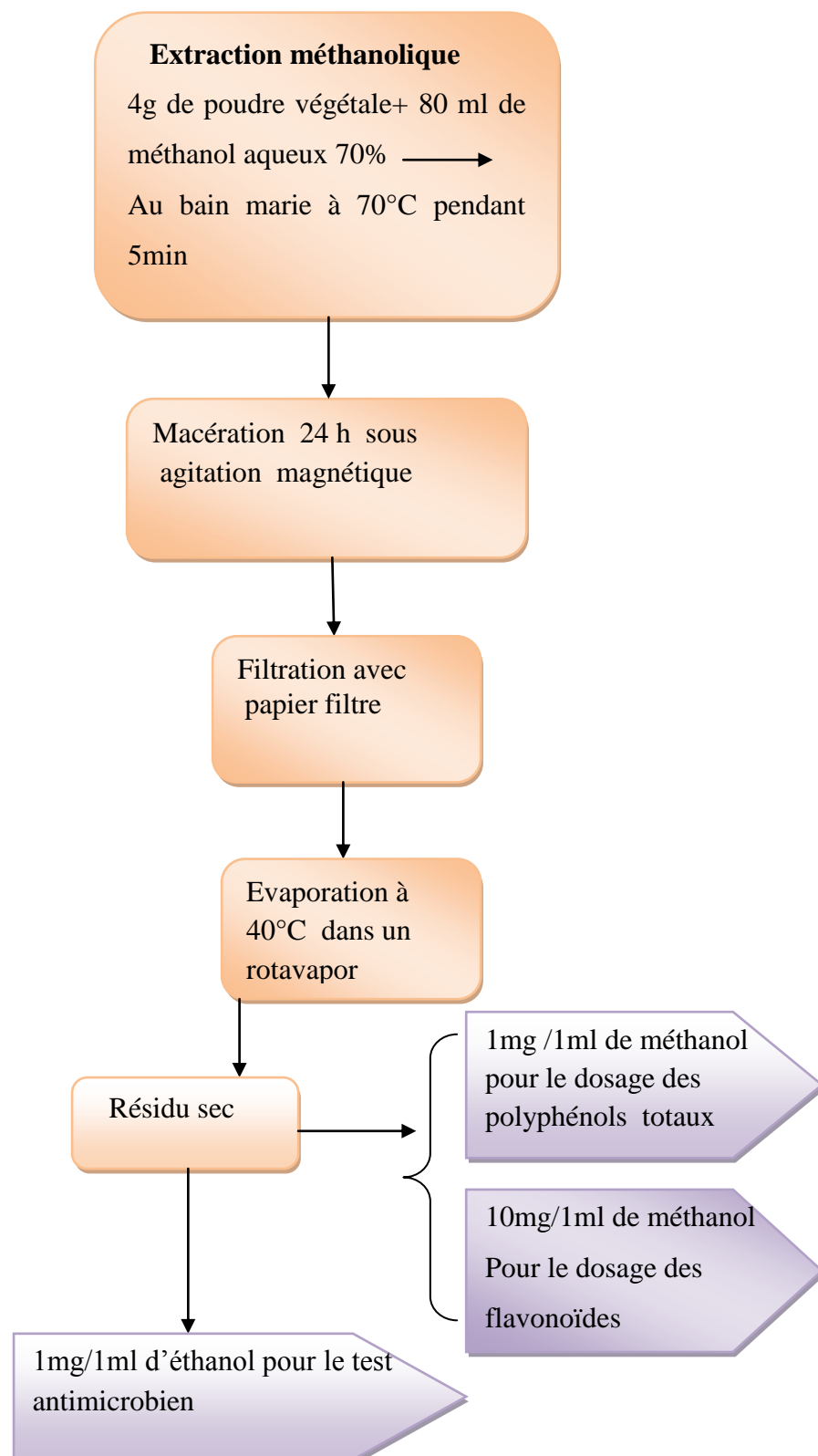


Figure 09: Protocole expérimental de l'extraction méthanolique des rameaux feuillés du cyprès vert « *Cupressus sempervirens L.* » (Original, 2014).

II. Matériel et méthodes

➤ Rendement de l'extraction

Le calcul de rendement de l'extraction, est exprimé en pourcentage de masse d'extrait méthanolique : « C'est le rapport entre l'extrait sec méthanolique et la poudre végétale ».

Dans notre étude, nous avons exprimé le rendement pour 4g de matière végétale.

Le rendement d'extraction a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Rendement \%} = (\text{MS} / \text{MV}) \times 100$$

MV : Masse de la poudre végétale utilisée pour l'extraction (g)

MS : Masse de l'extrait sec obtenue après évaporation (g)

Sachant que :

$$\text{MS} = (\text{poids du ballon avec l'extrait après évaporation}) - (\text{poids du ballon vide})$$

II. Matériel et méthodes

II.2.4. Analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible

❖ Définition

La spectrophotométrie, est une méthode couramment employée, pour la détermination de la concentration d'un composé qui soit natif ou résultant d'une extraction méthanolique. Elle permet d'utiliser toute la gamme du visible et éventuellement de l'UltraViolet, si le spectrophotomètre est équipé d'une source UV (**Kamoun, 1997**).

❖ Principe

La colorométrie, se base sur la propriété de certains composés, qui absorbent d'avantage la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques dans le spectrophotomètre UV-visible. Le dosage des composés phénoliques, utilise très fréquemment, leurs spectres d'absorptions, dans l'UV pour la plupart des autres composés, en choisissant pour chacun d'eux la longueur d'onde d'absorption maximale. Les lectures sont faites par rapport à un témoin (**Plummer, 1989**).

II.2.4.1. Dosage des polyphénols totaux

❖ Principe

La teneur en phénol totaux, a été déterminée en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu. Ce dernier, forme un complexe rédox avec l'acide phosphotungstique et l'acide phosphomolybdique lors de l'oxydation des phénols (**Singleton et al., 1998**).

❖ Mode opératoire

Le mode opératoire que nous avons suivi a été établie par (**Singleton et Rossi, 1965 ; Singleton et al., 1998**).

La préparation de la solution témoin, la solution de l'extrait méthanolique (1mg/1ml) et de l'infusé à 10% des rameaux feuillés du cyprès vert est illustrée dans le **Tableau III**

II. Matériel et méthodes

Tableau III : Dosage différentiel spectrophotométrique, des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et l'infusé

Témoin	250µl du folin ciocalteau (1ml+9ml de méthanol) + 50µl de méthanol Incubation (5 min) → 750µl de carbonate de sodium à 7% +5ml d'eau distillée → Incubation à température ambiante pendant 120 min
Essai ₁ (extrait) (5répétitions)	250µl du folin ciocalteau (1ml+9ml de méthanol) + 50µl d'extrait méthanolique → Incubation (5 min) → 750µl de carbonate de sodium à 7% +5ml d'eau distillée → Incubation à température ambiante pendant 120 min
Essai ₂ (infusé à 10%) (5répétitions)	250µl du folin ciocalteau (1ml+9ml de méthanol) + 50 µl de l'infusé à 10% → Incubation (5min) → 750µl de carbonat de sodium à 7% +5ml d'eau distillée → Incubation à température ambiante pendant 120 min

Les solutions (témoin, essai₁ et essai₂), sont passées dans le spectrophotomètre pour la lecture à 760 nm.

La quantification des polyphénols, a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) réalisée par un extrait d'étalon « acide gallique » à différentes concentrations dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

Les résultats sont exprimés en µg équivalent acide gallique par 1mg du poids sec de la plante en poudre.

II.2.4.2. Dosage des flavonoïdes

A) Principe

La formation par chélation, de complexe entre les composés phénoliques et les métaux est largement utilisée, pour la réalisation des spectres d'absorption. En effet, le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) fait intervenir les propriétés chélatantes des ions d'aluminium (Al^{3+}) à l'égard des flavonoïdes. Il se forme soit des complexes labiles avec deux hydroxyles libres en position ortho, soit des complexes stables avec le carbonyle en position 4 et l'hydroxyle en position 5 et /ou en 3 (**Lauranson, 1989**).

II. Matériel et méthodes

C) Mode opératoire

Le protocole que nous avons suivi pour la mesure de l'absorbance a été décrit par (**Abdel-Hameed, 2009**). Il a été nécessaire de préparer pour l'extrait méthanolique (10 mg /1ml) à analyser deux solutions (**Tableau IV**).

Tableau IV : Dosage différentiel spectrophotométrique, des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique

Témoin	100 µl d'extrait méthanolique+ une goutte d'acide acétique + 5 ml de méthanol → Incubation à température ambiante pendant 40 min.
Essai (5 répétition)	100 µl d'extrait méthanolique + 100 µl de chlorure d'aluminium à 20% + une goutte d'acide acétique → le mélange est dilué dans 5ml de méthanol → Incubation à température ambiante pendant 40 min.

Les deux solutions : témoin et essai sont passées dans le spectrophotomètre pour la lecture à 415nm.

Nous avons utilisé, la Rutine à 0,5 mg/ml comme Standard. La lecture de l'absorbance est effectuée dans les mêmes conditions expérimentales, que notre extrait méthanolique.

La teneur des flavonoïdes, est exprimée en mg/g équivalent de la Rutine et elle est calculée par la formule suivante :

$$RE_X = A m / A_0 m_0$$

A : Absorbance de l'échantillon et **m** : Masse de l'échantillon

A₀ : Absorbance de la Rutine (Standard) et **m₀** : Masse de la rutine

RE : Equivalence de la Rutine.

X : Teneur en flavonoïdes (mg/g).

II. Matériel et méthodes

II.2.5. Activités biologiques

II.2.5.1. Activité antimicrobienne

❖ Principe

Ce principe, est celui de la **Pharmacopée européenne (2002)**. La technique, consiste à utiliser des disques en papier absorbants de 9 mm de diamètre, imprégnés d'une quantité d'extrait et déposés à la surface d'une gélose inoculée et uniformément ensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'extrait dans la gélose, permet d'avoir comme résultat positif une zone d'inhibition après incubation. La lecture des résultats, se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibitions, obtenues pour chacune des souches.

❖ Mode opératoire

Selon la **fiche technique de Sidal (2002)**, l'activité antimicrobienne est réalisée comme suit :

❖ Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

La gélose **Nutritive « GN »** pour l'isolement et la conservation des souches bactériennes.

La gélose **Muller Hinton « MH »** pour l'étude la sensibilité des bactéries aux deux échantillons : extrait phénolique et l'infusé.

La gélose **Sabouraud « SAB »** pour l'isolement, la conservation et le repiquage des levures. Ainsi que, l'étude de leur sensibilité aux mêmes échantillons.

La gélose **Trypce Soja Agar « TSA »** pour le repiquage des bactéries.

❖ Conservation et repiquage des souches

Les souches, sont conservées à 4°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné. A partir de ces tubes à essai, un repiquage a été réalisé. Les milieux sont incubés respectivement à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

❖ Préparation des milieux de culture

Les milieux Muller-Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures), sont liquéfiés dans un bain marie à 95°C. Sous une hotte à flux laminaire, les milieux de cultures gélosés, sont coulés en surfusion dans des boîtes de Pétri stériles à raison de 15 ml

II. Matériel et méthodes

par boîte. Chaque boîte de Pétri doit être étiquetée et porte les indications suivantes : nom du milieu et date de préparation et/ou date de péremption. Après refroidissement et solidification des milieux gélosés, les boîtes de Pétri préparées, seront utilisées immédiatement ou conservées dans des conditions, évitant toute modification de leur composition.

❖ Préparation des suspensions bactériennes et fongiques (inoculum)

A partir d'une culture jeune, de 18 à 24 h pour les bactéries et 48 h pour les levures, des suspensions bactériennes, sont réalisées en prélevant quelques colonies isolées, qui seront ensuite, mises dans 5 ml d'eau physiologique. Ces suspensions, sont agitées au vortex. Une première lecture de la suspension, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre de type GENOVA à la longueur d'onde de 620 nm. L'absorbance doit être comprise entre 0,22 et 0,32 pour les bactéries et entre 2 et 3 pour les levures. Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus, correspondant à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germes/ml. Si une des valeurs trouvées à la première lecture, n'est pas comprise dans l'intervalle, un ajustement est réalisé en ajoutant de l'eau physiologique, si elle est inférieure à la valeur minimale ou en ajoutant des colonies, si elle est supérieure à la valeur maximale. Une nouvelle lecture, est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. Six tubes correspondant aux six souches utilisées, sont ainsi obtenus. Ils seront incubés, pendant quelques temps (20 à 30 min) dans une étuve à 37°C pour les suspensions bactériennes et à 25°C pour les levures.

❖ Ensemencements par inondation

De chaque tube, contenant les suspensions bactériennes ou fongiques, une quantité de 1 ml est extraite, puis déposée et étalée sur le milieu MH ou SAB respectivement. Les boîtes de Pétri doivent être séchées, pendant 15 min à 35°C dans une étuve.

❖ Dépôt des disques et incubation

A l'aide d'une pince stérile, un disque absorbant de 9 mm stérile est prélevé. Il sera imbibé d'extrait phénolique avec concentration de 1mg de résidu sec /1ml d'éthanol, par simple contact du bout du disque et l'extrait. Celui-ci, est absorbé progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque. Un autre disque, sera imbibé de l'infusé à 10% des rameaux feuillés de cyprès vert et de la même façon que, l'extrait mais les deux disques sont diffusés dans deux boîtes différentes, avec trois répétitions. Donc, il a été nécessaire de préparer pour chaque souche microbienne deux boîtes de Pétri. Les disques, sont

II. Matériel et méthodes

disposés de telle manière que, les zones d'inhibition ne se chevauchent pas. Après diffusion, dans le milieu pendant 1 h30 à une température de 30°C, les boîtes sont incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les levures. La lecture est effectuée après 24 h d'incubation pour les bactéries et 48 h pour les levures.

Remarque : Nous avons imprégné les disques absorbants de 9mm dans le méthanol, en suivant la même procédure expérimentale, que l'extrait et l'infusé.

❖ Lecture des résultats

L'extrait et l'infusé à 10%, possèdent une activité antimicrobienne, si le diamètre de la zone d'inhibition obtenu après incubation, dépasse le diamètre du disque absorbant.

Les diamètres des zones d'inhibition, sont mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse. Ils sont classés en 4 classes (**Tableau V**) (**Moreira et al., 2005**).

Tableau V : Degré de sensibilité des souches microbiennes selon le diamètre de la zone d'inhibition

Degré de sensibilité des souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Souche résistante	$D = 9$
Souche sensible	$10 \leq D \leq 14$
Très sensible	$15 \leq D \leq 19$
Extrêmement sensible	$D > 20$

Les différentes étapes de l'activité antimicrobienne sont illustrées dans la **Figure 10**

II. Matériel et méthodes

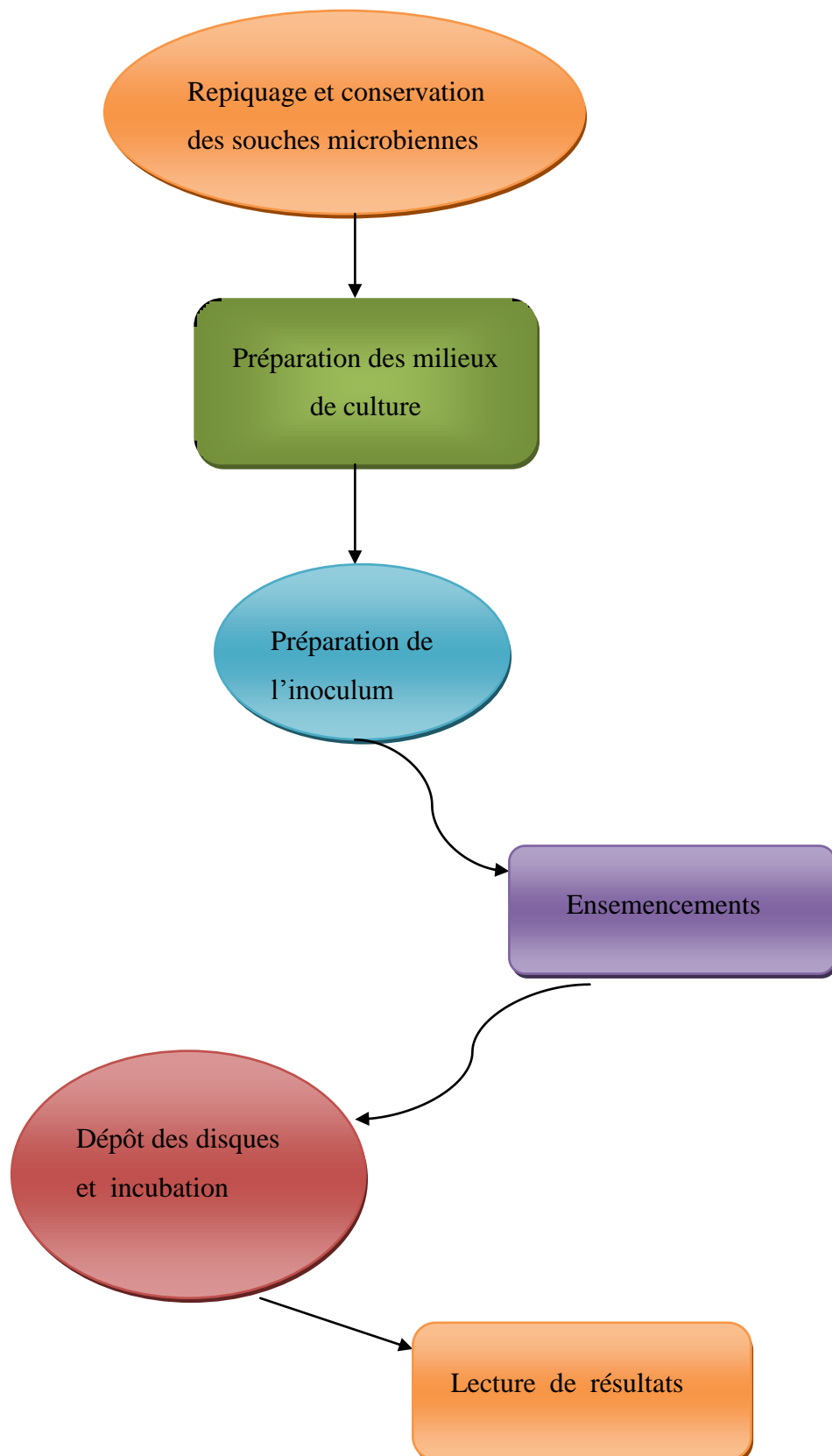


Figure 10 : Différentes étapes de l'activité antimicrobienne (Original, 2014).

II. Matériel et méthodes

II.2.5.2. Activité anti-inflammatoire

A) principe et but

L'injection de la carragénine, sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris, provoque une réaction inflammatoire, qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire. Cette étude permet, de comparer la réduction de l'œdème plantaire, après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondant (Colot, 1972).

B) Mode opératoire

La procédure expérimentale suivie, pour la réalisation de l'activité anti-inflammatoire a été mise au point par (Colot, 1972).

Les souris utilisées pour cette expérience, ont été pesées et réparties dans trois lots de 6 souris chacun (Figure 12), auxquelles nous avons administré, par voie intra gastrique (gavage) les différentes suspensions.

Au temps T0

Lot témoin : chaque souris reçoit 0,5 ml d'eau distillée ;

Lot essai 1 : chaque souris reçoit 0,5 ml de l'infusé des rameaux feuillés de cyprès vert ;

Lot essai 2 : chaque souris reçoit 0,5 ml de diclofénac.

Au temps T0 + 30 min

Injecter la solution de carragénine, sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche sous un volume de 0,25 ml, à tous les animaux mis en expérience.

La patte postérieure droite, pour chaque souris est considérée comme témoin.

Aux temps T0+ 4 heures

Les souris sont sacrifiées, par asphyxie à l'éther, ensuite les pattes postérieures gauches et droites, sont coupées à hauteur de l'articulation et pesées sur une balance analytique.

Les moyennes arithmétiques massiques des pattes droites (M_D) et pattes gauches (M_G) en grammes sont calculées pour chaque lot.

Le pourcentage d'augmentation de poids des pattes (% d'œdème) pour chaque lot est calculé selon la formule suivante:

$$\%d'oed\grave{e}me = \frac{M_G - M_D}{M_D} \times 100$$

II. Matériel et méthodes

Le pourcentage de réduction d'œdème chez les souris traitées par rapport au témoin est calculé comme suit :

$$\% \text{ réduction d'œdème} = \frac{\% \text{ d'œdèmeT} - \% \text{ d'œdèmeE}}{\% \text{ d'œdèmeT}} \times 100$$

T : témoin

E : essai

La procédure expérimentale de l'activité anti-inflammatoire est illustrée dans la **Figure 11**

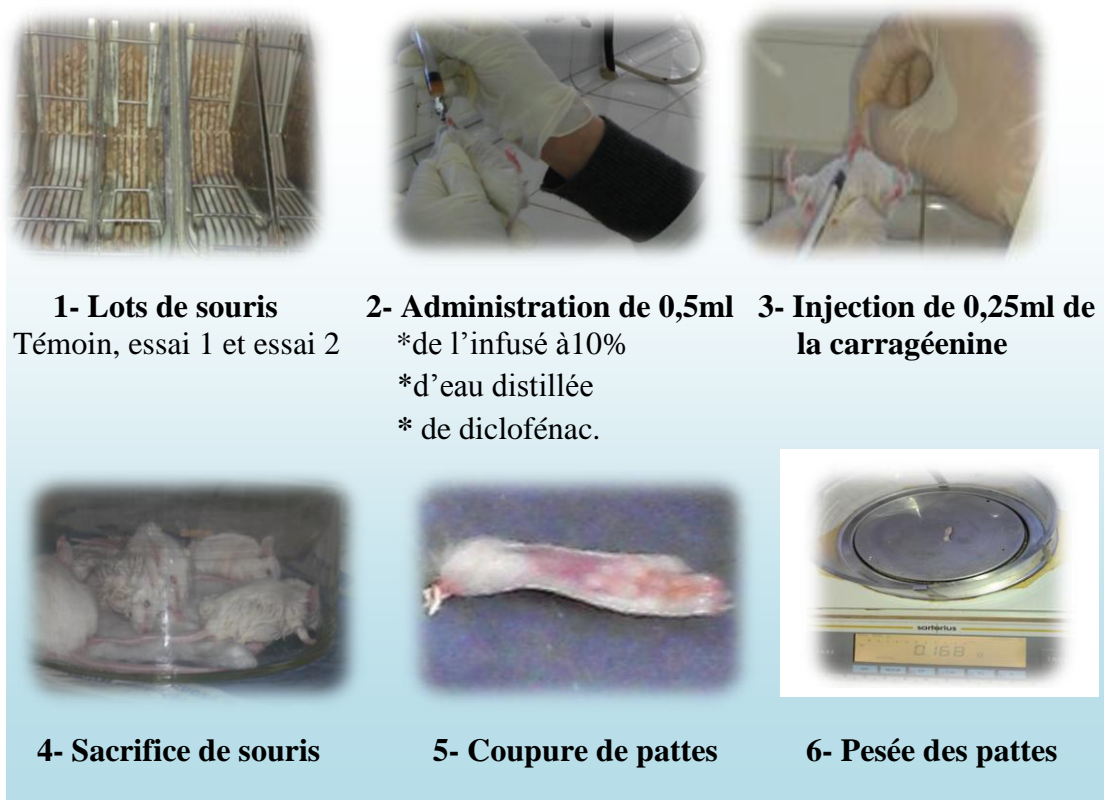


Figure 11 : Différentes étapes de l'activité anti-inflammatoire (Original, 2014).

II. Matériel et méthodes

II.2.6. Etude du test limite de toxicité

A) Principe

L'essai limite, est utilisé principalement, lorsque des informations indiquant que, la substance d'essai n'est probablement pas toxique, sont disponibles. C'est à dire que, la toxicité se situe au dessus de la dose limite réglementaire. Des informations, concernant la toxicité de la substance d'essai, peuvent être recueillies à partir de connaissances de substances, produits ou mélanges similaires déjà soumis à essai. En prenant en compte l'identité et le pourcentage des composants, connus pour avoir une importance du point de vue toxicologique (**Roll et al., 1986**).

Un essai limite à un niveau de dose de 2000 mg/kg, peut être exécuté avec six animaux et si aucune mortalité ne se produit, la DL50 sera >2g/kg. Exceptionnellement, un essai limite à un niveau de dose de 5000 mg/kg, peut être conduit avec trois animaux et si la mortalité se produit, il peut être nécessaire, de tester avec des doses immédiatement inférieures (**Diener et al., 1989**).

B) Mode opératoire

Le protocole suivi pour la réalisation du test limite de toxicité (**Figure10**) a été établi par (**Roll, 1989 ; Diener, 1995**).

Au départ, nous avons choisis un lot de 6 souris pour la dose de 2g/kg du poids corporel pour l'infusé des rameaux feuillés de cyprès vert. Puis, Par voie intra gastrique (voie orale) et à l'aide d'une sonde de gavage, nous avons administré aux souris une dose de 0,5 ml de l'infusé à 10 % des rameaux feuillés de cyprès vert. Enfin, les souris ont été privées de nourriture 3 h après l'administration de l'infusé. Des observations ont été effectuées comme suit :

- Les animaux doivent être observés, individuellement, au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement, pendant les premières 24 heures, après le traitement.
- Prendre le poids corporelle, de chaque souris peu de temps avant l'administration de l'infusé et ensuite, au moins une fois par semaine.
- Enregistrer le taux de mortalité quotidiennement, pendant les 14 jours de l'étude, afin de signaler les symptômes de toxicité. L'attention portera en particulier sur

II. Matériel et méthodes

l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, sommeil et coma.

- Les animaux qui sont morts, doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Car cet examen peut fournir des renseignements utiles sur la cause de la mort.

Les étapes suivies pour la réalisation du test limite de toxicité sont représentées dans la **Figure12**.

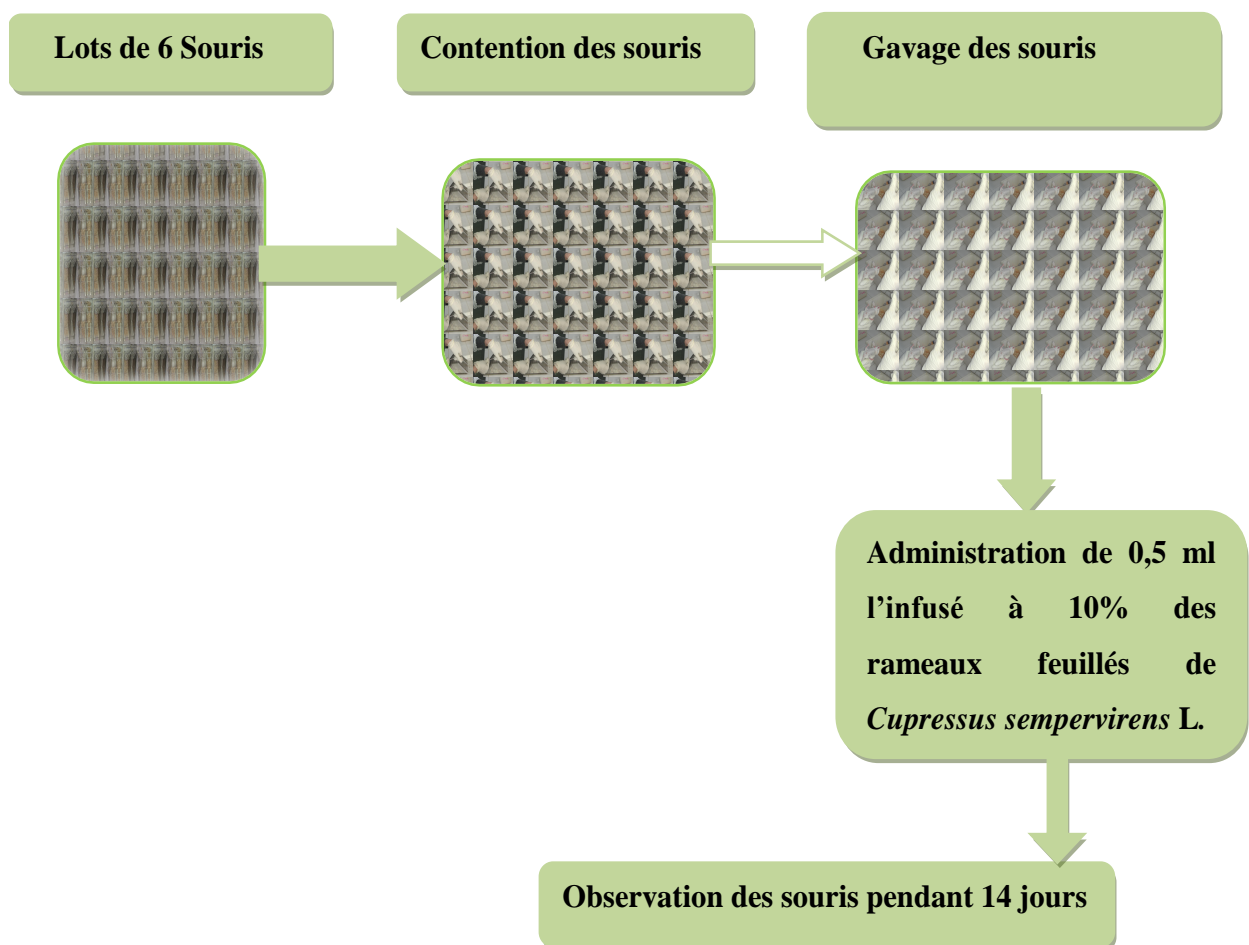


Figure 12 : Etapes du test limite de toxicité (Original, 2014).

III. Résultats et discussion

III.1. Résultat de l'étude phytochimique

III.1.1. Détermination du taux d'humidité

Le résultat du taux d'humidité de la matière végétale, (la poudre végétale des rameaux feuillés du cyprès vert) est représenté dans le (**Tableau VI**).

Tableau VI : Taux d'humidité de la poudre des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens L.*

Poids de la matière végétale avant séchage P_i (g).	5,0001
Poids de la matière végétale après séchage P (g).	4,5981
Le taux d'humidité de la matière végétale $H(\%)$.	8 ,04

Le taux d'humidité, de la poudre des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens L.*, a été de 8,04%. Cette valeur, apparait nettement inférieure à 12 %. Ce résultat répond aux normes d'(ISO 662, 1998). Il se concorde avec le résultat, trouvé par **Audigie et Zonsgain, (1991)** sur la plante étudiée qui a été de 9%.

Ce résultat démontre que, notre matériel végétal a été séché et conservé dans de bonnes conditions, ce qui rend, par conséquent les résultats de nos analyses phytochimiques fiables.

III.1.2. Screening phytochimique

Le screening phytochimique, effectué soit sur la poudre, soit sur l'infusé à 10% des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens L.*, nous a permis d'obtenir les résultats suivants (**TableauVII**) :

III. Résultats et discussion

Tableau VII : Résultats des différentes réactions du screening phytochimique

Métabolites secondaires	Rameaux feuillés
Flavonoïdes	Présence
Tannins catéchiques	Présence
Tannins galliques	Présence
Saponosides	Présence
Leuco-anthocyanes	Présence
Glycosides	Présence
Coumarines	Présence
Mucilages	Présence
Anthocyanes	Absence
Alcaloïdes	Absence

Les résultats expérimentaux, du screening phytochimique, ont montré la présence des flavonoïdes, des tannins catéchiques, des tannins galliques, des saponosides, des leuco-anthocyanes, des glycosides, des coumarines et des mucilages et absence des anthocyanes et des alcaloïdes dans les rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens L.*

Les familles chimiques, détectées dans cette étude phytochimique, viennent confirmer les travaux antérieurs de (Emami et al., 2004) sur *Cupressus sempervirens L.* qui, ont identifié la présence des tannins, des flavonoïdes et des saponosides.

Par ailleurs, les résultats obtenus, concernant l'absence des alcaloïdes se concordent avec ceux obtenus par Chamount et Millet-clerc, (2011) chez la même plante.

D'après Bakker et al., (2004), l'absence des anthocyanes, peut être générée, suite à des réactions de condensation avec d'autres molécules inférieures, comme l'acide puracique. Ainsi que, par la combinaison avec les tannins, pour donner les polymères ayant des

III. Résultats et discussion

propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes, empêchant ainsi, leur révélation qualitative par le screening phytochimique.

Une détermination plus précise, de la composition chimique de chaque famille de métabolites secondaires, aurait été souhaitée pour connaître et attribuer les effets thérapeutiques constatés ; par manque de matériel de séparation et d'analyse ainsi que, les étalons ceci n'a pas été achevé.

III.2. Résultat du rendement de l'extraction méthanolique

Le résultat du rendement de l'extraction méthanolique de la poudre des rameaux feuillés du cyprès vert est mentionné dans le (Tableau VIII).

Tableau VIII : Rendement de l'extraction méthanolique de la poudre des rameaux feuillés de *Cupressus Sempervirens L.*

MS : Masse de l'extraction obtenue après évaporation (g).	1.76
MV : Masse de la poudre végétale utilisée pour l'extraction (g)	4,00
Rendement de l'extraction (%).	44

Dans notre étude, le rendement de l'extraction méthanolique, faite sur la poudre des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens L.* a été de 44%. A partir de ce résultat, nous pouvons constater que, l'extraction méthanolique a donné un bon rendement.

Ceci est probablement du, à la méthode d'extraction utilisée : macération dans le méthanol. En effet, **Falleh et al., (2008)**, ont montré que, le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les polyphénols. Cependant, **Vuorela (2005)** a précisé que, le méthanol aqueux à 70% est deux fois plus efficace que, le méthanol pur.

III. Résultats et discussion

En outre, **Majhenic et al., (2007)**, ont démontré, que l'extraction par les solvants à une température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extrait secs que lorsqu'ils sont obtenus à une température ambiante. Ce qui, justifie le rendement élevé en extrait sec de *Cupressus sempervirens L.*

En revanche, le rendement que nous avons obtenu, est inférieur à celui trouvé par **Gardeli et al., (2008)** chez *Myrtus Communis L.* poussant spontanément en Grèce qui, a été de 59.5 %.

En effet, **Hayder et al., (2008)**, ont signalé que, l'espèce étudiée, la localisation géographique, le climat et la période de récolte semblent avoir un impact direct sur le rendement en extrait méthanolique sec.

III.3. Résultats de l'analyse quantitative par spectrophotomètre UV- visible

III.3.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux

Une étude comparative en polyphénols totaux a été réalisée par la construction d'une courbe d'étalonnage (**Figure 13**) de l'extrait d'acide gallique à différentes concentrations.

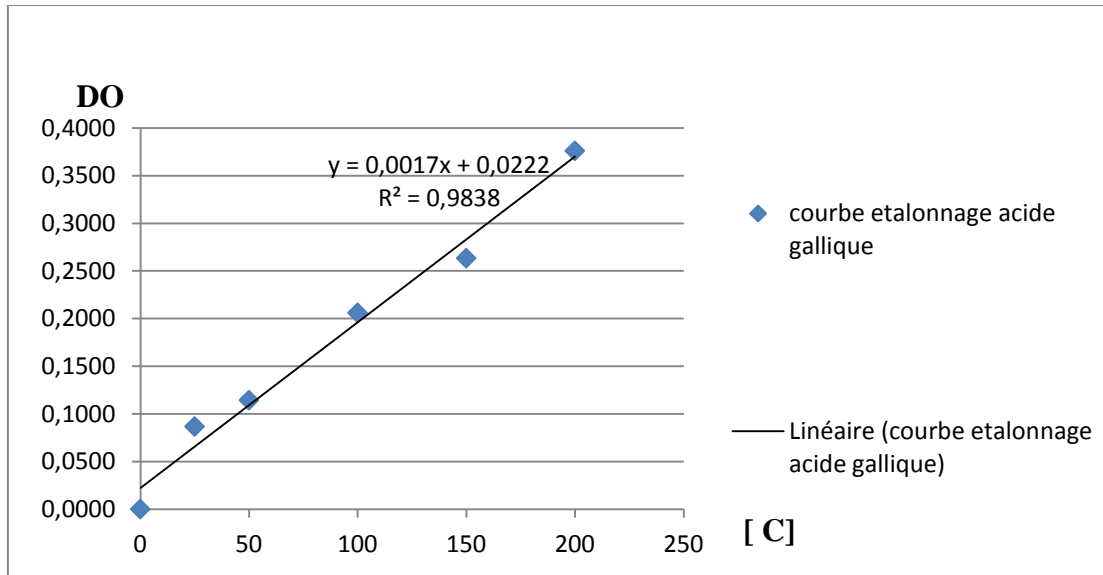


Figure 13 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique (**Original, 2014**).

[C] : Différentes concentrations d'acide gallique (µg/ml)

Do : Densité optique

III. Résultats et discussion

Les résultats du dosage des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et l'infusé sont établis dans le (Tableau IX).

Tableau IX : Résultats du dosage des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et l'infusé de *Cupressus sempervirens* L.

Echantillon	Moyenne de Densité optique des 5 essais \pm écart type	teneurs en $\mu\text{g}/\text{mg}$ éq acide gallique	longueur d'onde (nm)
Extrait méthanolique 1mg /1ml	0,8230 \pm 0,081	471,05	760
Infusé à 10%	0,7736 \pm 0,121	442,00	760

Malgré la simplicité de la méthode du folin, elle n'est pas spécifique aux polyphénols. En effet, le réactif peut agir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés (Singleton et al., 1998).

Les teneurs en polyphénols totaux varient de 471,05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ éq acide gallique, à 442.00 $\mu\text{g}/\text{mg}$ éq acide gallique pour l'extrait méthanolique et l'infusé respectivement.

D'après ces résultats, il est bien évident que, quantitativement l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols que l'infusé.

D'une part, ces résultats corroborent avec les travaux antérieurs de Saadaoui et al., (2007) qui ont montré que, la teneur de polyphénols de l'extrait méthanolique de quelque plante *Punicagramatum*, *Rétama.raetum*, *Thymus capitatus*, *Rosmarinus officinalis*, *Ruta chalepensis*, *Ajuva iva*, *Lawsonia inermis* et *Agave americana* varie entre 100.68 et 500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche exprimée en équivalent d'acide gallique.

D'une autre part, ces résultats se concordent avec ceux de Gardeli et al ; (2008), qui ont trouvé une teneur en extrait méthanolique des polyphénols chez *Myrtus communis* L. qui varie entre 352 $\mu\text{g}/\text{mg}$ éq acide gallique et 373 $\mu\text{g}/\text{mg}$ éq acide gallique, et elle atteint son maximum en période de floraison.

III. Résultats et discussion

De ce fait, le contenu polyphénolique, varie quantitativement d'une plante à une autre, ceci peut être attribué à plusieurs facteurs :

- ❖ Facteurs climatiques et environnementaux, la zone géographique, la sécheresse, le sol et les maladies (**Ebrahimi et al., 2008**).
- ❖ Le patrimoine génétique, la période de récolte et le stade de développement de la plante (**Mliauskas et al., 2008**).

III.3.2. Résultats du dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage spectrophotométrique, des flavonoïdes de l'extrait méthanolique 10mg/ml de *Cupressus sempervirens L.* par rapport à la Rutine sont établis dans le (**Tableau X**).

Tableau X : Résultats du dosage spectrophotométrique, des flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *Cupressus sempervirens L.*

Echantillon	Moyenne des absorbances d'essais \pm écart type	Teneurs	longueur d'onde (nm)
Extrait méthanolique 10mg/ml	1,159 \pm 0,019	6,69 mg/g éq Rutine	415
Rutine	3.463 \pm 0.000	0.5 mg/ml	415

Le dosage spectrophotométrique, des flavonoïdes de l'extrait méthanolique 10mg/ml du *Cupressus sempervirens L.*, à une longueur d'onde de 415 nm, nous a permis d'obtenir une teneur de 6,69 mg/g éq Rutine.

En effet, ces résultats quantitatifs, viennent confirmer les résultats qualitatifs, trouvés lors du screening phytochimique, concernant la présence des flavonoïdes.

Par ailleurs, les concentrations de flavonoïdes, dépendent du stade de maturation, le sol et les conditions climatiques (**Baustista et al ., 2007**).

III. Résultats et discussion

III.4. Résultats de l'étude des activités biologiques

III.4.1. Résultats de l'activité antimicrobienne

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antimicrobien de l'extrait phénolique des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens L.* (1mg du résidu sec / 1ml d'éthanol) et l'infusé à 10%. Les résultats sont regroupés dans le (TableauXI).

TableauXI : Diamètres des zones d'inhibitions des souches microbiennes étudiées

Souches bactériennes	Gram	Moyennes de Zones d'inhibition ±écart type	
		Extrait	Infusé
<i>Escherichia coli</i>	-	13,000±0,000	9,000±0,000
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	20,666±2,309	13,000±0,000
<i>Bacillus subtilus</i>	+	21,000±1,000	13,000±0,000
<i>Staphylococcus épidermidis</i>	+	14,000±1,000	25,000±1,000
<i>Candida albicans</i> (souche fongique)		14,333±0.577	9,000±0,000
<i>Beauveria bassiana</i> (Souche fongique)		21,000±1,000	9,000±0,000

D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, nous pouvons constater globalement que, les bactéries à Gram +, ont été plus sensibles à l'extrait et l'infusé des rameaux feuillés du cyprès vert que, la souche à Gram – *Escherichia coli*. (Figure 14, 15 et 16).

III. Résultats et discussion

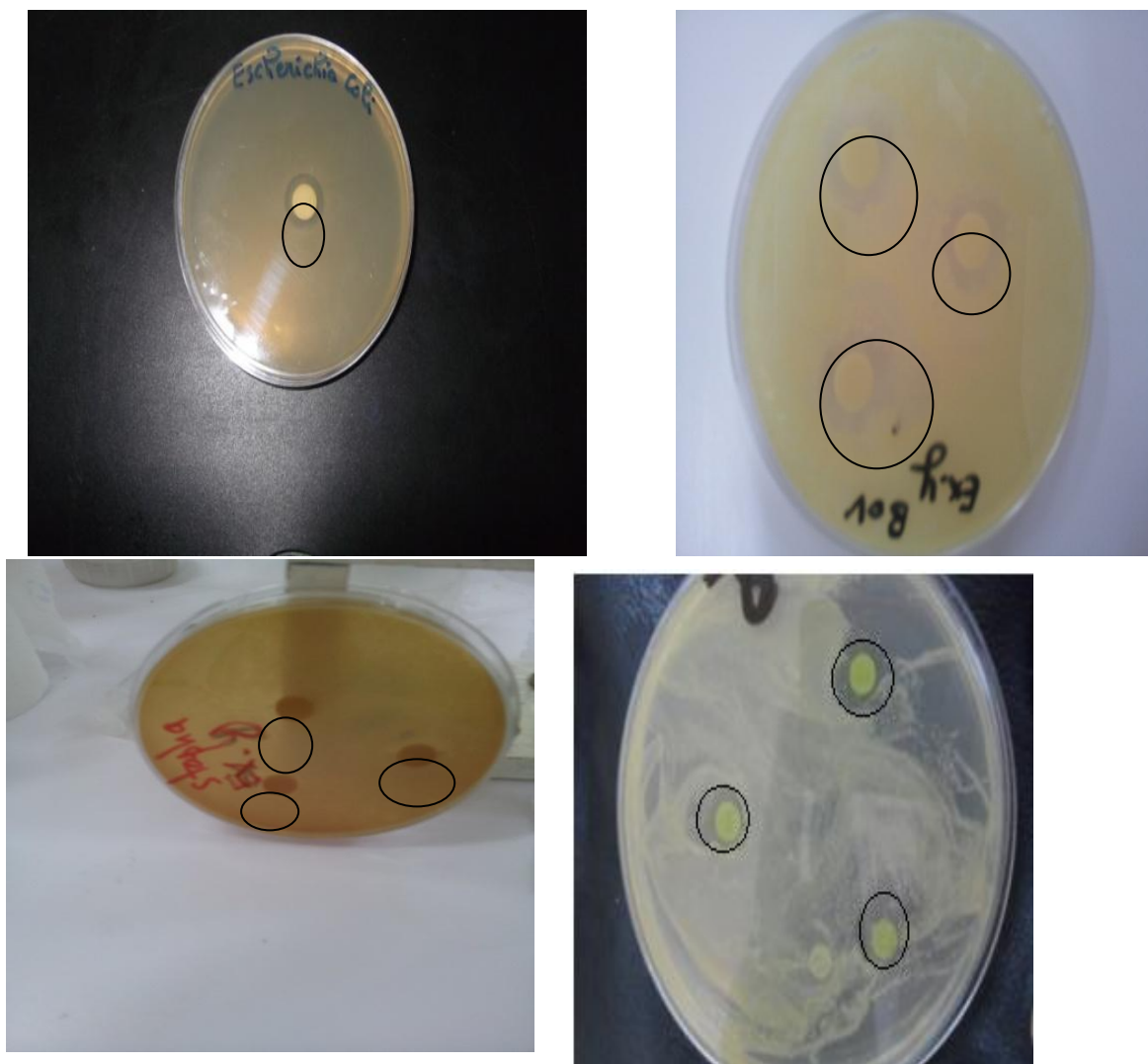


Figure 14 : Zones d'inhibition des souches microbiennes : *Escherichia coli*, *Beauveria bassiana*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* vis-à-vis l'extrait (**Original, 2014**).

III. Résultats et discussion

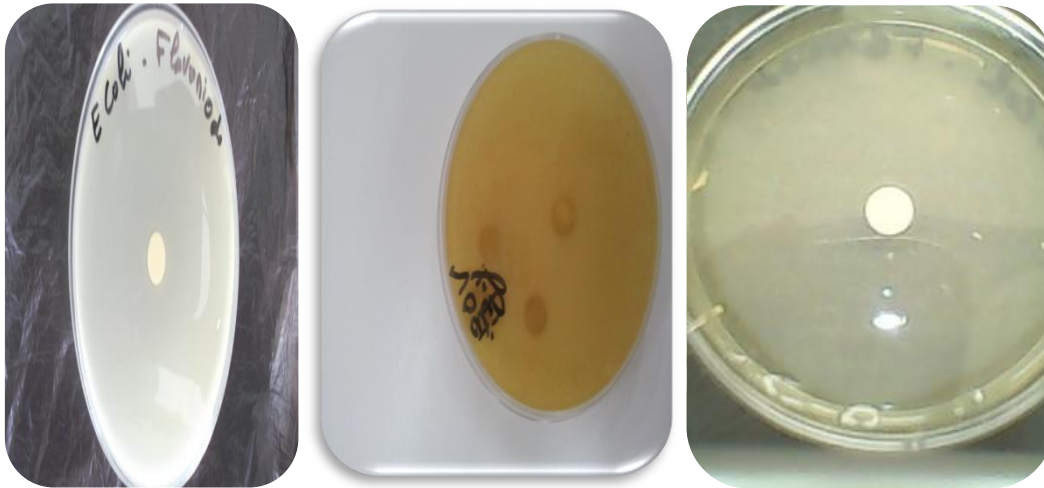


Figure 15 : Absence des zones d'inhibition (9mm) pour *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Beauveria bassiana* vis-à-vis l'infusé (Original, 2014).



Figure16 : Zones d'inhibition des souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus épidermidis* et *Bacillus subtilis* vis l'infusé (Original, 2014).

III. Résultats et discussion

Selon **Farag et al., (1989)**, les bactéries à Gram + sont généralement plus sensibles aux extraits de plantes que , les bactéries à Gram–.

D'après **Nikaido (2003)**, ceci est peut être du, à la composition de la membrane des bactéries Gram négatif. En effet, ces dernières, possèdent une membrane, qui présente une perméabilité sélective ; la surface des lipopolysaccharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui, bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaires. Cependant, *Escherichia coli* contient dans sa membrane des porines de faible perméabilité.

Ces résultats, se concordent avec ceux obtenus par (**Bouzouita et al., 2008 ; Mazari et al., 2010**) sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* de la famille des *Cupressaceae* sur les bactéries à Gram positif par rapport aux Gram négatif.

D'une part, les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilus*, se sont montrées sensibles vis-à-vis l'infusé à 10% des rameaux feuillés du *Cupressus sempervirens* L. avec le même diamètre d'inhibition de 13mm. Tandis que, ces mêmes souches bactériennes, se sont montrées extrêmement sensibles à l'extrait phénolique (1mg/1ml d'éthanol), avec des zones d'inhibition de 20,66 mm et 21mm respectivement. Ce qui nous laisse conclure que, pour les deux souches : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilus* l'extrait a donné un pouvoir antimicrobien supérieur à ce lui de l'infusé.

D'autre part, la souche *Escherichia coli* s'est révélée sensible vis-à-vis de l'extrait avec un diamètre de 13mm et résistante à l'infusé avec 9mm de diamètre d'inhibition. Cependant, la souche *Staphylococcus épidermidis* a été extrêmement sensible à l'infusé en marquant une zone d'inhibition de 25 mm. Mais, elle a été sensible à l'extrait avec une zone d'inhibition de 14mm. Par conséquent, nous pouvons constater que, pour cette souche, l'infusé des rameaux feuillés du cyprès vert a donné un pouvoir antimicrobien supérieur à celui de l'extrait.

En ce qui concerne les souches fongiques, les résultats ont montré que, *Candida albicans* et *Beauveria bassiana* ont été résistante vis-à-vis l'infusé avec le même diamètre d'inhibition de 9mm. De ce fait, il est évident que, l'infusé des rameaux feuillés du cyprès vert, n'a aucun effet antifongique sur les deux levures : *Candida albicans* et *Beauveria bassiana*.

III. Résultats et discussion

En revanche, pour l'extrait phénolique (1mg/ 1ml d'éthanol), *Candida albicans* s'est révélée sensible avec une zone d'inhibition de 14,33 mm. Tandis que, *Beauveria bassiana* s'est montrée extrêmement sensible vis à vis du même extrait avec une zone d'inhibition de 21mm. En somme, nous pouvons dire que, l'extrait possède un pouvoir antifongique nettement supérieur à celui de l'infusé.

Cette observation, peut être expliquée, par le fait que, les composés phénoliques des extraits des végétaux, agiraient sur les hyphes des mycéliums provoquant la sortie du contenu cytoplasmique, la perte de la rigidité et l'arrêt de croissance mycélienne (**Tripathi et Scharma, 2006**).

Ces résultats, corroborent avec les travaux antérieurs de **Glisic et al., (2007)**, qui ont démontré la forte activité antifongique de l'huile essentielle de *Juniperus communis* de la famille des *Cupressaceae*.

Plusieurs observations de **Allemand et al., (2005)**, ont montré que, les rameaux feuillés du *Cupressus sempervirens* L. possèdent une propriété antiseptique par leurs tannins.

De plus, **Mori et al., (1987)**, ont mentionné que, les flavonoïdes, possèdent une activité antimicrobienne.

Cependant, **Chabot et al., (1992)**, ont rapporté que, les composés les moins polaires, comme les flavonoïdes, manquant le groupement hydroxyle « OH » sur leur cycle β sont plus actif vis-à-vis les microorganismes que , ceux portant le groupement «OH».

III. Résultats et discussion

III.4.2. Résultats de l'activité anti-inflammatoire

Le pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème des lots expérimentés est illustré dans la (Figure 17).

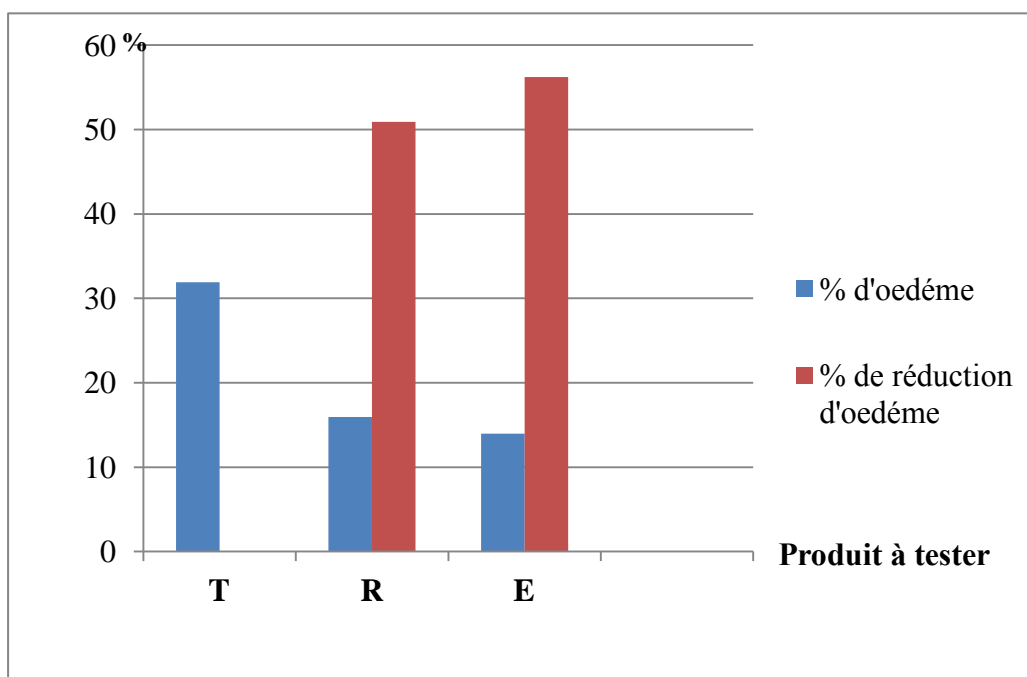


Figure 17 : Pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les lots T, R et E (Original, 2014).

T : Témoin « eau distillée » **R :** Référence « diclofénac » **E :** L'infusé à 10% des rameaux feuillés du cyprès vert

Dans les 4 heures, qui ont suivi le traitement et d'après les résultats illustrés dans la (Figure17). Nous avons constaté que, le produit 0,5 ml d'eau distillée pour le témoin a induit un taux de réduction d'œdème avec 31,90%. Ce taux, est nettement inférieur à celui obtenu par le traitement à base de diclofénac, qui a été égale à 50,89 % et à celui obtenu après le traitement par l'infusé à 10% des rameaux feuillés du cyprès vert, qui a été de 56.20% .

En effet, le pourcentage de réduction d'œdème pour l'infusé à 10% des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. est supérieur à celui de la référence. Ce qui, prouve que, la plante étudiée inhibe mieux l'inflammation que, la référence.

III. Résultats et discussion

Cette observation, justifie les utilisations traditionnelles de *Cupressus sempervirens L.* citées par **Hensel (2008)**, dans le traitement de rhume, de bronchite et des inflammations veineuses : telles que, les varices et les hémorroïdes,

Selon **Maryuama et al., (2005)**, l'injection par voie intra-péritonéale de 0,5 ml de l'infusé de la plante étudiée a provoqué une réduction d'œdème des pattes postérieures des souris.

En effet, il est possible que, l'inhibition de l'inflammation par l'infusé de cyprès vert, soit attribuée aux différents polyphénols et surtout les acides phénoliques (mise en évidence dans notre étude par les tests phytochimiques) qui, selon **Iserin (2007)**, sont fortement anti- inflammatoires.

Le screening phytochimique effectué dans notre étude, a révélé la présence des saponines, les coumarines et les tannins qui, selon **Sanez et al., (1997) ; Berge et al., (2005) et Stefanova et al., (2007)** sont dotés d'activité anti-inflammatoire et anti- œdémateuse.

Ce même screening, a montré aussi la présence de flavonoïdes qui, sont selon **Di Carlo et al., (1999) ; Hennebelle (2006)**, capables d'exercer des propriétés anti- inflammatoires

Dans cette même optique, **Lahlah (2008)**, a signalé que, la quercetine calme la douleur musculaire en accélérant la répartition des tissus au niveau moléculaire ; de manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est un déclencheur chimique de l'inflammation.

De plus, les études de **Landolf et al., (1984)** ont montré que, certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique, ce qui conduit à la formation des prostaglandines et des leucotriènes médiateurs de l'inflammation.

III. Résultats et discussion

III.5. Résultats du test limite de toxicité

Les résultats du test limite sont illustrés dans le **tableau XII**

Tableau XII : Résultats du test limite de toxicité sur l'infusé à 10% des rameaux feuillés du cyprès vert

Produit administré	Nombre d'animaux dans le lot	Nombre des animaux morts (14 j)
0,5 ml de l'infusé des rameaux feuillés du cyprès vert	6	0

Au cours de notre étude, sur la toxicité de l'infusé à 10% des rameaux feuillés de cyprès vert et selon les conditions expérimentales, dont les quelles nous avons effectué ce test, aucune mortalité n'est enregistrée pour la dose de 2g/kg de l'infusé de la plante étudiée et aucun signe de toxicité (tremblement, salivation et diarrhée) n'a été enregistré chez tous les animaux expérimentés, pendant les 14 jours de l'expérimentation

L'absence de mortalité, à une dose de 2g/kg, nous a permis de confirmer que, que l'infusé de la plante étudiée, n'est pas doté d'une toxicité à cette dose avec une DL50 supérieure à 2g/Kg.

Le screening phytochimique, effectué sur l'infusé à 10% des rameaux feuillés du *Cupressus sempervirens L.* a révélé que, ce dernier est dépourvu d'alcaloïdes qui, Selon **Lemoine (2004)**, sont les substances, les plus toxiques chez les plantes.

D'après les études menées par **Auburn et Magnan (2008)**, l'absence de mortalité est peut être due à l'absence des alcaloïdes, qui agissent sur le système nerveux, les reins, le cœur et le système digestif.

Conclusion et perspectives

Le présent travail, a porté sur l'étude de l'extrait méthanolique et l'infusé à 10% des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. Ainsi, nous avons contribué, à la valorisation de cette plante, en établissant une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques.

Le taux d'humidité, de la poudre végétale des rameaux feuillés du cyprès vert déterminé par le procédé de séchage à l'étuve, est conforme aux normes d'ISO (1996), avec 8.04%.

Le screening phytochimique, a permis de révéler la présence des flavonoïdes, des tannins catéchiques, des tannins galliques, des saponosides, des leuco-anthocyanes, des glycosides, des coumarines et des mucilages et l'absence des anthocyanes et des alcaloïdes dans les rameaux feuillés du cyprès vert.

L'extraction méthanolique, de la poudre végétale des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. nous a permis d'avoir un bon rendement de 44%.

Le dosage spectrophotométrique, nous a permis de quantifier les teneurs en polyphénols totaux, qui sont de 471, 05 µg/mg éq acide gallique et 442,00 µg/mg éq acide gallique respectivement pour l'extrait méthanolique et l'infusé. Ce dosage, nous a permis aussi de quantifier la teneur en flavonoïdes, qui est de 6,69 mg/ g éq Rutine.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien, a montré que toutes les souches bactériennes testées, se sont révélées sensibles vis-à-vis les deux échantillons l'extrait phénolique (1mg résidu sec/1ml d'éthanol) et l'infusé à 10% des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. sauf *Escherichia coli* qui s'est montrée résistante à l'infusé. Tandis que, les souches fongiques étudiées, se sont révélées sensibles qu'à l'extrait.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire, a révélé que, l'infusé à 10% des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. possède une activité anti-inflammatoire avec un taux de réduction d'œdème de 56.20%.

Conclusion et perspectives

La réalisation du test limite, exécuté avec une dose de 2g/kg nous a permis d'assurer que, l'infusé à 10% des rameaux feuillés de *Cupressus sempervirens* L. ne cause aucun signe de toxicité avec une DL50>2g/kg.

Les résultats, aux quels nous avons abouti, sont très encourageants et promoteurs. Ils auraient été meilleurs, si tous les moyens nécessaires étaient disponibles.

Comme dans tout travail de recherche, ces résultats sont préliminaires ; il serait donc intéressant, de poursuivre des investigations sur les rameaux feuillés et les cônes du cyprès vert en se focalisant sur les différents extraits alcooliques et l'huile essentielle, en réalisant des analyses par diverses techniques chromatographiques quantitatives et qualitatives et en augmentant, l'effectif des souches bactériennes et fongiques, pour mieux évaluer l'activité antimicrobienne. Il serait souhaitable, de faire des études de l'activité anti-oxydante, antitussive et anti-spasmodique.

Références bibliographiques

- **Abdel Hammeed, ES., 2009** : « Total phenolic contents and radical scavenging activity of certain Egyptian “Ficus species leaf samples”, Food chemistry, N°4, Vol (114), pp; 1271-1277.
- **Aït Youssef M., 2006** : « Plantes médicinales de Kabylie ». Ed : Ibis presse. Paris, 349p.
- **Ali-Dellile L., 2010** : « les plantes médicinales d’Algérie ». Ed : Berti, 237p.
- **Allemand C.J., Fleuriet A., Macheix J.J., 2005** : « les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d’importance économique ». Ed : Presses polytechniques, 560p.
- **Amar Z., 1995** : « Ibn al-Baytar and the study of the plants of AL-sham journal, Qatedrah le –toldot Eresyisra el-we yissubah, N° 76, pp; 49-76.
- **Aubaile F., Nave S., 2002**. Histoire naturelle et culture des plantes à parfum. Ed : Ibis Press. Paris, 157 p.
- **Auburn R., Magnan D., 2008** : « Cultivez les plantes sauvages et comestibles », pp ; 74- 94.
- **Audigie C et Zonsgain F., 1991** « Biochimie structural », Ed : Doin, 226p.
- **Bakker J., Bridle P., Honda T., Kuwano H., Saito N., Terahara N., Timberlake, C.F., 2005** : « Identification of anthocyanin occurring in some red wines” Phytochemistry, N° (4), pp; 145-148.
- **Bartels 1997** « Guide des plantes du bassin méditerranéen », Ed : Eugen Ulmer, 400p.
- **Bartels. A., 1998** : « Guide des plantes du bassin méditerranéen », Ed : Eugen Ulmer, 400p.
- **Bautista, O., Fernandez, F., Lopez, R., Gomez, P. 2007**. The effects of oenological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*, N° 20, pp; 546–552.
- **Benjamaa M. L., 2005**. « Dépérissement de la plante de Cyprès dans la pépinière forestière de Sidi Thabet ». Rapport de tournée, pp ; 2.
- **Berge G., Diallo D., Hveen B., 2005** : « les plantes sauvages du Sahel malien », Ed : Karthala, 299 p.
- **Bernard L. et Larbier M., 1992** : « Nutrition et alimentation des volailles », 296p.

Références bibliographiques

- **Beloued A., 2001.** « Plantes médicinales d'Algérie ». Office des publications universitaires (OPU), Ben-Aknoun, Alger, 277 p.
- **Beloued A., 2005.** « Plantes médicinales d'Algérie », office des publications universitaires(OPU), ben- aknoun Alger, 284 p.
- **Bianchini F., Corbetta F., 1975.** « Atlas des plantes médicinales », 243 p.
- **Boujemaa A., Cherni H., 2005.** « Bilan phytosanitaire du cyprès : comportement inter et intra spécifique ». ISP Tabarka, 152 p.
- **Bouzouita N., Kachourif., Ben HalimaM., Chaabouni MM., (2008).** Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'HE de *Juniperus phoenicea*. Journal de la Société chimique de Tunisie, N° 10, pp ; 119-125.
- **Bouyer J., 1996 :** « Méthodes statistiques, médecine biologique », pp : 139.
- **Bremness L., 2005 :** Plantes aromatiques et médicinales. 2^{ème} Ed : Larousse, 306p.
- **Bruneton J., 1993 :** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales.1^{ère} Ed : Lavoisier. Paris, 1120p.
- **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie – phytochimie : plantes médicinales. 2^{ème} Ed : Lavoisier, Paris. 1120 p.
- **Bruneton J., 2001.** Plantes toxiques, végétaux pour l'homme et les animaux, Ed : Tec & Doc ; 532p.
- **Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R., Piché Y., 1992.** « Hyphal growth promotion in vitro of the VA *mycorrhizal fungus, Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions». New Phytol., N°122, pp ; 461-467.
- **Chaouche-Mazouni S., 2008 :** « Glossaire de biologie ».Ed :office des publications universitaires(OPU), Ben- aknoun Alger.OPU, 127p.
- **Chaumont J.P., Millet-clerc J., 2011 :** « Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie », 266 p.
- **Colot M., 1972 :** « Notions techniques de pharmacologie générale ». Ed: Masson. Paris, 656p.

Références bibliographiques

- **Corbaz R., 1990** : « Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes ».Ed : Masson. Paris, 283p.
- **Dean, F. M., 1963**: “Naturall occuring Oxygen Ring Compounds”. Ed: Buttrworths, Londres, 508p.
- **Deuroy F, Eynard M.R., Yazt W., 1978** : « physiologie végétale ». Ed : Masson, 220p.
- **Ducrey M., Brofas G., Andreoli C., Raddi P., 1999**. Le genre *Cupressus*. In: Ed. Teissier du Cros, *Cypress Handbook*. Florence (Italie): Studio Leonardo, pp;. 9-26.
- **Di-Carlo G., Macojo N., Izzoa A.A., Capasso F., 1999** : « Flavonoids : oleic and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, life sci, 353p.
- **Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., 1995**: « The biometric evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method» 680p.
- **Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., 1994** : « The biometric evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral), Arch, Toxicol, N°68, pp;559-610.
- **Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., 1995** : « The biometric evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral), Arch, Toxicol, N° 69, 729-734.
- **Dodelin B., Eynard-Machet R., Athanaze P et André J., 2007** : « les remanents en forestrerie et agriculture ».Ed : Lavoisier, pp : 381.
- **Dupérat M., Polese J-M., 2008** : « Encyclopédie visuelle : les arbres et les arbustes », 239 p.
- **Ebrahimi N.S., Hdians J., Mirjalili M.H., Somboli A., Zodi Y.M., 2008** : « Essential oil composition and bacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages, journal of food chemistry », pp : 110, 927-931
- **Emami S.A., HassanzagehM K., Rahmizadeh M., Fazli BS., Assili J., 2004**. Chemical constituents of *Cupressus sempervirens* L. CV. *Cereiformis* Rehd. *Essential Oil*. Iranian journal of pharmaceutical science.Vol (1),pp; 39-42.

Références bibliographiques

- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdely C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.*, pp; 331-372-379.
- **Farag R.S., Daw Z.W., Hewedi F.M., Elbabaroty G.S. A., 1989:** “Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils”. *Food protects.*N°52, pp; 675-679.
- **Farjon A., 2005.** Monograph of Cupressaceae and Sciadopitys. Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 643 p.
- **Fintelman V., Weiss R.F, 2004 :** « Manuel pratique de phytothérapie ». Ed, Vigot, Paris ; p : 438.
- **Fournier P-V., 2010.** Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France. 1047 p.
- **Gamet-Payraastre L., Manenti S., Gratacap M.P., Tulliez J., H. Payraastre B., 1999 :** « Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-Kinase, General pharmacology », pp : 32-279-286.
- **Gardeli C., Vassiliki P., Anthanasios M., Kibouris T., et Komaltis, M., 2008** «Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. et *Myrsine communis* L. : Evaluation of antioxidant of methanolic extracts ». *Food chemistry.* N°(107), pp; 1120-1130.
- **Gazengel J. et Orecchioni A., 2001 :** « le préparateur en pharmacie ». Ed ; Technique et documentation, Paris, pp : 271.
- **Glisic S., Milojevic S.Z., Dimitrijevic S.I., Orlovic A.M., and Skala D.U., (2007):** “Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics”, *Journal Serb. Chem. Soc.*, N°72, 311-320.
- **Goetz P., Michel P., 2008 :** « Les plantes médicinales ».Ed : Springer. Paris 253 p.
- **Guet G., 2003 :** « Mémento d’agriculture biologique ». 2^{ème} Ed, pp : 150.
- **Guignard J.L., 1996 :** « biochimie végétale » 1 ère édition : Masson, Paris, p ; 222.
- **Guignard.J-L., 2000 :** « biochimie végétale ». 2^{ème} Ed : Punod, Paris, p : 274, pp : 155.

Références bibliographiques

- **Gucrin R., Thieulle J., 2005** : « Le dictionnaire des acides soignants et des auxiliaires puériculture » . 3^{ème} Ed, Belgique, pp : 18, 187p.
- **Hadji-Minaglon F., et Kaloustian J., 2012** : « la connaissance des huiles essentielles ; qualilogie et aromathérapie », pp : 14, 206p.
- **Haslam, E., 1998**: “Preactical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action”, Cambridge University press, Melbourne, New York, pp; 14-15.
- **Hayder N., 2008**: “Antimutagenic activity of *Myrtus communis*L. Using the salmonella microsome assay”.South African journal of botany.N°74, pp; 121-125.
- **Hennebelle T. ; 2006**. « Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées) ».Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire.Université des Sciences et Technologique de Lille, 1. Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement. France.
- **Hensel W., 2008**: « 350 plantes médicinales ». Ed: Delachaux et Niestlé SA, Paris, 131p.
- **Iserin P ; Masson M ; Restellini J.P ; Ybert E ; de la roque R et Vican P, 2007** : « Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins ».2^{ème} Edit : Larousse, Paris, 335p.
- **Iserin P ; 2001** : « Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins ». 1^{ère} Edit : Larousse, Paris, 335p.
- **ISO 662., 1998. Fr.** (International Organisation of Standardisation). Corps gras d'origine animal et végétale : Détermination du taux d'humidité.www.iso.org/cafta/d274693.html, consulté le 20.03.2014 à 13h
- **Joslyn, M-A., 1964** “Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content”, Adv. Food Res. N°13, pp. 179-217.
- **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P., 2002**. Botanique systématique, une perspective phylogénétique. Ed : De Boeck Université, Paris : 459 p.

Références bibliographiques

- **Kamoun P., 1997** : « Application et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, médecine-science », Ed, Flammarion, Paris, p : 96-417.
- **Keinz L., Klars M., Albrecht Z., 2001**: “Atlas de pharmacologie, 2^{ème} Ed : Flammarion, Médecines sciences, Paris, 376P.
- **Koubaissi H., 1971**. « Dictionnaire des plantes médicinales ». Ed : Bairut, Liban, 566P.
- **Kernbaum S., 2008** : Dictionnaire de médecine. 2^{ème}Ed, Flammarion Medecine- Sciences, Paris, 1133p.
- **Lahlah F.Z., 2008** : « Extraction des flavonoïdes par le butanol, chloroforme à partir de *Silybum marianum*, et l'étude de leurs activités » antibactériennes : thèse de magistère de l'université de Constantine ».
- **Landolf R.L., Steiner M., 1984**: «Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids structure activity relation, biochem pharmacol, pp; 269, 2971-2979.
- **Larousse, 2004**: «dictionnaire le petit Larousse illustré », 350p.
- **Lauranson J., 1989**: “Exploitation de la diversité biochimique chez les conifères » : Contribution à l'étude de l'hybridation *Pinus uncinata Ram. Pinus sylvestris L.* et à la croissance du complexe spécifique *Pinus nigra Am.* Thèse de doctorat d'état, université Claude Bernard- Lyon, pp : 207.
- **Laurier D. et Lepage F., 1992** : « Essais sur le langage et l'intentionnalité », Ed, Massons, Paris, 369p.
- **Lemoine C., 2004** : « les plantes toxiques », 320p.
- **Mahjenic L., kerget M.S., Knez Z., 2007** : “Antioxidant and antimicrobial activity of *guarana* seed extracts”. Food Chemistry, N°104, 1258-1268.
- **Maryuama N., Sekimoto O., Ishibashi H., Inoye S., Oshima H.A., 2005** : « Suppression of neutrophil S1 accumulation in mice by cuteness, application of géranium essential oil, Journal of inflammation, pp : 1-2.
- **Mliauskas C., Venskutonis P.R., Van Beek T.A., 2008** : « Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract food chemistry, pp :231-237.
- **Moatti R., Fauron K., Donadieu Y., 1983** : « La phytothérapie-therapeutique differente », Paris, pp : 13, 245p.

Références bibliographiques

- **Moreira M.R., Ponce A.G., Delvalle C.E., Roura S.I., 2005** : « Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen », pp : 565-570.
- **Mazari K., Bendinerad N., Benkhechi CH., Fernandez X., 2010.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algeria *Juniperus phoenicea* L and *Cupressus sempervirens*. Medicinal plants. Research.N° 4, pp ; 959-964.
- **Mazliak, P., 1981** « Physiologie végétale nutrition et métabolisme ».Ed : Harmen, Paris, 349p.
- **Mori A., Nishino C., Enoki N.,Tawata S ; 1987.**Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*.Phytochemistry, N°26, pp; 2231-2234.
- **Nedelec P-Y., Fressinet J-P., Soise M., Grimbert G., 1993.** Larousse du jardin, Paris, 609 p.
- **Nikaido L., 2003.** Antimicrobial activity of the essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Protect*, N°64 , pp ; 1119-1125.
- **Oda K., MastudaH., Murakani T., Katayama S.,Ohgitani T,Yoshikawa M.,2000:** “Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medical and food plants.Biology chemistry”, pp:219-243.
- **Ouafi S., 1987** : « Etude chimio-taxonomie des flavonoïdes des cultivars du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. », Thèse de magistère, U.S.T.H.B., pp : 120.
- **Ouafi S., 2007** : « contribution à l'étude biochimique du palmier dattier : Analyse de polyphénols des folioles de palme de cultivar dans un but chimio taxonomique », Thèse de doctorat en science de la nature, physiologie végétale, U.S.T.H.B., pp : 140.
- **Paris F.et schawenberg P., 1977** : « Guide des plantes médicinales ».Paris, Ed, délachaux et niestlé. 3^{ème} édition, 396p
- **Paris, R.R., Moyses, H., 1976** « Précis de matière médicale », Tome1.Ed : MASSON, Paris (France), 339p..
- **Pharmacopée européenne., 2002.** 3^{ème} édition. Conseil de l'Europe, Strasbourg : pp ; 681-683.

Références bibliographiques

- **Pillet J., 2011** : « Thèse de doctorat : Impact du microclimat sur le métabolisme de la bière de raisin. l'université bordelaise .France, 200p.
- **Plummer D.T., 1989** : « Introduction aux techniques de biochimie », Ed, McGraw-Hill, Paris, p : 331.
- **Tripathi A., et Sharma N., 2006** : « fungitoxicity of the essential oil of Citrus sinensis on postharvest pathogens ».Word journal of microbiology and biotechnology.Vol (587), N°3, pp; 226-59.
- **Rech J., 2011** : « Microscopie des plantes consommées par les animaux », pp : 205, 271p.
- **Ribereau-Gayon P., 1986** : « les composés phénoliques des végétaux, Ed, Dumond, Paris, pp : 245.
- **Roll R., Hofer-boss Th. And kayser D., (1986)** : « New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals, Toxicol, Lett., Suppl », N°31, pp;86.
- **Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D., 1989** : « Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von chemikalien Bundesgesundheitsblatt, N° 32, pp; 336-341.
- **Rombi M., et Robert D., 2007** : « 120 plantes médicinales, composition, mode d'action et intérêt thérapeutique ». Ed : Alpen, Paris, 520p.
- **SaadaouiSaadaoui B., Bekir J., Akrouf J., Ammar S., Mahjoub A., Mars M. ; 2007.**Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. Revue des régions arides,N° 1, pp ; 87-92.
- **Saenz M.T., Ahumada M.C., Garcia M.D, 1997:** « Extracts from viscum and cisteagalus cytotoxic larynx cancer cells, Znaturforsch », pp: 42-4.
- **Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006** : « les polyphénols en agroalimentaire, Ed, Tec & Doc., Paris, pp : 1-11.
- **Singleton V.L., et Rossi J. A., 1965:** « colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents », American Journal of endogy and viticulture, Vol 320, pp; 144-158.
- **Singleton V.L., Other R., et LamuelaR.M., Raventos R., 1998 :** « Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of folin ciocalteu reagent », Méthodes in Enzymologie.Vol(229), pp;152-178.

Références bibliographiques

- **Sparg S G., Light M E., Van staden J., 2004:** “Biological activities and distribution of plant saponins J. Ethnopharmacol”, pp: 219-243.
- **Stefanova T., Nikolova N., Michailova A., Mitov I., Lancovi I., Neychev, 2007 :** « enhanced resistance to salmonella enteric sero var typhimurium infection inmice after coumarin treatment, microbes and infection », pp : 7-14.
- **Stora D., 2010 :** « Pharmacologie P », pp : 138-318p.
- **Teucher E ; Anton R ; Lobstein A, 2005 :** Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edit : TEC & DOC, 522 p.
- **Upson T.M., Grayer R.J., Greenhan J.R., Williams C.A., AL-Ghamdi E., et Chen F.H. (2000) :** «leaf flavonoids as systematic characters in the general *Lavandula* and *Sabaudia*, Biochemical systematic and Ecology, N°28. Vol(1007), pp: 991.
- **VercauteVercautern J., Chezec C. et Triaud J., 1998 :** « les polyphénols96 ».Ed : I.N.R.A., Paris, 289 p.
- **Vuorela S., 2005:**”Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics”, Helsinki. Vol(53), N°3, pp; 40-45.
- **Winckle R., 2006 :** « Se soigner par les plantes selon son signe astral », Ed, Alpen, 620p.
- **Weinges k., Marx H D., Kaltengauser W., Nader F., Nader E., Perner J., Seiler D., 1968** « Procyanidine au fruchten », Ed : Liebigs Annals, pp : 184-204.
- **Zsolt D., et Istvan R., 2012.** Kathy Musial, Ed. Conifers Around the world (1st Ed.). Dendro Press, 1089 p.

ANNEXES

ANNEXE 1

Matériel non biologique

Appareillages	Verreries et autres	Réactifs et solutions
<ul style="list-style-type: none">- Balance analytique- Support- Balance de précision- Hotte- Bain marie- Bec bunzen- Etuve d'incubation-Plaque chauffante-Spectrophotomètre UV- visible-Rotavapor de type (BUCHI rotavapor R-200)	<ul style="list-style-type: none">- Entonnoir- Béchers- Ampoule à décantation de 500 ml- Pipettes- Poire- Flacon ombré- Fioles jaugées- Eprouvette- Tubes à essai stériles- Pipettes graduées- Boîtes de Pétri- Disques absorbants- Pince de laboratoire-Seringue- Moulin- Sonde de gavage	<ul style="list-style-type: none">- Eau distillée- Ethanol-Méthanol-Carragénine-Eau de javel-Eau physiologique-Réactif de Drangendroff-Propanol-Acétat de plomb- Ammoniaque 1/2-FeCl₃, I₂, H₂SO₄, AlCl₃, NaCl à 9% et Na₂CO₃-Folin ciocalteau-Méthanol aqueux 70%-Hcl concentré-Hcl à 2 N-chloroforme-Acétat de sodium-KOH à10%-Coupeau de magnésium-Alcool isoamylique-Acide sulfurique-Ether de pétrol-Acide acétique-Vortex

ANNEXES

ANNEXE2



Figure18 : Balance analytique
(Original, 2014)



Figure 19 : Plaque chauffante
(Original, 2014)

Préparation du milieu de culture utilisé : Sabouraud

❖ Composition

- Peptone : 10g.
- Dextrose : 40g.
- Gélose : 15g.
- pH final : $6,5 \pm 0,2$.

❖ Préparation

Mettre 65 g de poudre en suspension dans un litre d'eau distillée et mélanger bien, puis chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète. Procéder ensuite, à la stérilisation en utilisant l'autoclave à 121°C pendant 15 à 20 min.

Préparation du réactif de Drangendroff : (iodobismuthate de potassium) dissolvez 8 g d'iodure de potassium R dans 20 ml d'eau, et ajouter cette solution à 0.85g d'oxynitrate de bismth R dissous dans 40 ml d'eau et 10 ml d'acide acétique glacial R.

Méthanol aqueux à 70% : 52ml de méthanol pur+ 48 ml d'eau distillée.

ANNEXES

ANNEXE3

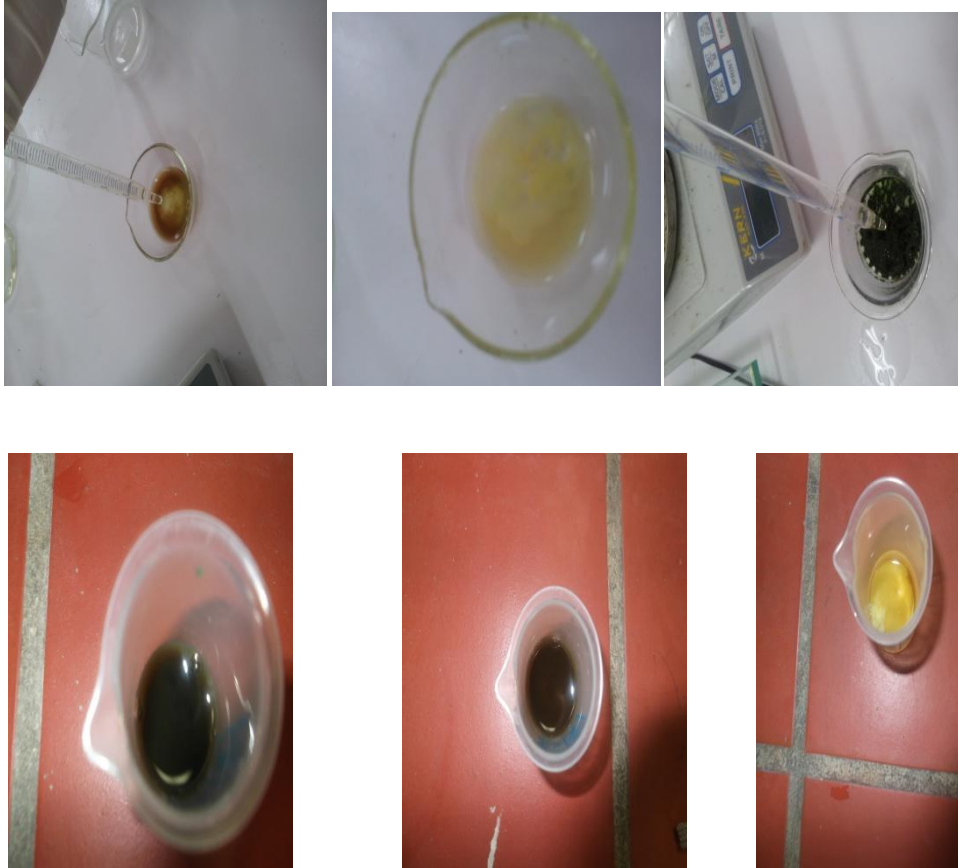


Figure 20 : Tests du screening phytochimique (Original, 2014).

ANNEXES

ANNEXE 4

Tableau XIII : Poids des pattes gauches et droites des souris expérimentées

S	Lot T		Lot E	
	Pp _g	Pp _d	Pp _g	Pp _d
S ₁	0,140	0,104	0,1364	0,1211
S ₂	0,120	0,171	0,1284	0,1312
S ₃	0,158	0,108	0,1499	0,1199
S ₄	0,165	0,126	0,1268	0,1286
S ₅	0,150	0,109	0,1599	0,1423
S ₆	0,138	0,108	0,1601	0,1126
Moyenne	0,145	0,110	0,1435	0,1259

Pp_g : poids des pattes gauches en (g).

Pp_d : Poids des pattes droites en (g).

Tableau XIV : Résultats de l'activité anti-inflammatoire

Lots	MG	MD	% d'œdème	% de réduction d'œdème
Lot T	0,145	0,110	31,90	-
Lot R	0,16	0,138	15,94	50,89
Lot E	0,1259	0,1435	13,97	56,20