



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



**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 DE BIOTECHNOLOGIE**

Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention
Du diplôme de Master II en Sciences de la Nature et de Vie

Spécialité : biotechnologie végétale

THÈME

**Corrélation entre le contenu polyphénolique et l'activité
antimicrobienne in vitro des feuilles de *Cupressus
sempervirens L.***

Présenté par :
Bouzari Rokia
Belkram romaissa

Devant le jury composé de :

Mme. MOUMENE S.	M.C.B	U. Blida 1	Présidente
Mme. BENRIMA A.	Pr	U. Blida 1	Promotrice
Mme. AIT IALEFF K.	Doctorante	U. Blida 1	Co-promotrice
Mme. CHEBATA N	M.A.A	U. Blida 1	Examinatrice

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2018/2019

~ بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ ~

الْحَمْدُ لِلّٰهِ الَّذِي عَلَّمَنَا بَعْلَمِهِ وَهَدَانَا بِهَدْيِهِ، وَوَفَّقَنَا بِتَوْفِيقِ مَنْهُ ..

Je dédie ce modeste travail

À ceux qui ont légué un sens à mon existence, en me donnant une éducation irréprochable, ceux qui m'ont appuyé nuit et jour durant mon parcours ; à vous mes très chères parents, Tahar, et Fatima zahra la lumière de ma vie, qui se sacrifient pour moi et pour lesquels je dois le mériter, pour ce qui je suis devenu aujourd'hui.

A ma Nour EL Houda ma chérie ma sœur , à qui je ne pourrai jamais la rembourser pour son soutien et son amour infini

A ma petite sœur Zineb

A mes deux frères, Ahmed et Yasser

Ainsi à toutes ma famille et toutes les personnes que j'aime et je respecte

À tout (es) mes enseignants (es) du mon parcours...

Rukaya

**** Dédicaces ****

Je dédie ce modeste travail à :

Ma précieuse offre du Dieu, mon père Bachir qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences, Je ne pourrai jamais au plus grand jamais oublier tout ce que tu as fait pour moi, papa. Tu as été toujours à mes cotés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma gratitude, mon affection et tout mon Amour.

Ma mère Djouda Ma réussite a été, et est toujours ton souci permanent. Tu m'as tant donné, parfois un mot suffisait pour me donner du courage, de suivre ma voie, merci pour ta présence. Tu es toujours préoccupée de mon avenir, tant de sacrifices, tant d'affections, un engagement sans retenu, un amour sans pareil. Je ne pourrai jamais te remercier assez, que ce modeste travail soit un prélude de l'immense bonheur que je compte te procurer.

Que Dieu le TOUT-PUISSANT vous accordez une longue vie afin que les efforts que vous avez consentis pour ma réussite vous soient récompensés.

Mon cher frère Sohaib pour son soutien moral et ses conseils précieux.

Mes sœurs Chourouk, Amel, Imen, Ines, Maha, Hadjer, Hiba et la fleur de la maison Haya, qui n'ont pas cassées de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protégées et leurs offre la chance et le bonheur.

Mon cher oncle Fouzi, ma tante Samra et mon cousin Alla, qui m'avez toujours soutenu durant ces années d'études.

Ma chère binôme Rokaya pour sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.

Romaïssa

Remerciements

Nous remercions Dieu, le tout puissant de nous avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.

Ce travail est le fruit de la participation et le soutien de nombreuses personnes.

En premier lieu, Nous exprimons notre gratitude et remerciement à notre promotrice Mme Atika BEN RIMA la doyenne de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université de Saad Dahlab Blida 1, d'avoir accepté de nous encadrer, nous tenons à la remercier pour ses aides fructueuses, ses conseils pertinents, sa gentillesse et ses qualités humaines.

Nous adressons nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à notre Co-promotrice Mme AIT IALEFF Khouloud doctorante en phytopharmacie, qui a su partager et nous communiquer sa passion pour la recherche ainsi que nous guider avec beaucoup de pédagogie par ses précieux conseils, ses orientations et son aide à la réalisation de ce travail.

*Nous remercions chaleureusement Mme MOUMENE.S,
docteur à l'université Saad Dahleb Blida 1, pour avoir
accepté à la fois d'examiner notre travail et de présider le
jury de thèse.*

*Nos sincères remerciements s'adressent également à Mme
CHEBATA. N, enseignante à l'université de Saad Dahlab
Blida 1, pour avoir accepté, d'examiner notre travail.*

*Nous tenons à témoigner toute notre gratitude à Mme
DBBIB .A , pour leur générosité et la grande patience dont
elle a su faire preuve malgré leur charge académique et
professionnelle.*

*Nous tenons à remercier Mr JAZOULI pour nous avoir
accueilli au sein de son laboratoire, d'avoir mis à notre
disposition tout le matériel disponible pour réaliser notre
partie expérimentale.*

*Je souhaite remercier également Pr Bradea M.Stella pour
toutes les précieuses informations qu'elle nous a fournies.*

Romaïssa & Rukaya

Cupressus sempervirens L. ou le cyprès vert est un conifère de la famille des Cupressacées, il est utilisé dans la médecine traditionnelle pour le soulagement des douleurs à l'estomac, les inflammations, les maux aux dents ainsi que pour traiter le diabète.

Le présent travail porte sur la recherche de l'effet antibactérien des extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens* et de déterminer leurs contenue en polyphénol totaux. L'extraction solide-liquide a été effectuée à une température ambiante en utilisant quatre solvants (éthanol, méthanol, acétone et l'eau distillée). Un dosage par chlorométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, a été effectué pour quantifier globalement les composés phénoliques présents dans les extraits obtenus. L'activité antibactérienne des extraits préparés à partir des feuilles de Cyprès vert a été évalué par la méthode de diffusion sur disques (antibiogramme) vis-à-vis trois souche bactérienne (*Staphylocoque aureus*, *Klebsiella oxytoca* et *Escherichia coli*).

Les résultats des différents dosages montrent que la teneur en composés phénoliques la plus élevée a été trouvée dans l'extrait aqueux avec une valeur de 27,68 mg Eq AG/g d'extrait, suivi par l'extrait éthanolique avec une valeur de 10,25 ± 0,6 mg Eq AG/g d'extrait.

Les résultats de test antibactérien ont montré que l'extrait éthanolique donne une activité inhibitrice la plus élevée contre les trois souches testées, dont *Staphylococcus aureus* était la plus sensibles par sa zone d'inhibition de 12,53 mm qu'*Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca*.

Mots-clés : Cyprès verts, composés phénoliques, activité antibactérienne, antibiogramme, solvant.

- **Abstract:**

Cupressus sempervirens L. or evergreen cypress is a conifer of the *Cupressaceae* family. it is used in traditional medicine for the relief of stomach pain, inflammations, toothaches and for diabetes treatment as well.

The present work focuses on the research of the antibacterial effect of the extracts of *Cupressus sempervirens's* leaves and determine their total polyphenols content. The solid-liquid extraction was performed at an ambient temperature, using four solvents (ethanol, methanol, acetone and distilled water).

The quantitative analysis of the total polyphenols of the extracts, was performed by colorimetry using the Folin-ciocalteu reactive. The antibacterial activity of *Cupressus sempervirens* L. leaves extracts, has been evaluated following the disk diffusion method (antibiogram) against three bacterial strains (*Staphylocoque aureus*, *Klebsiella oxytoca* and *Escherichia coli*).

The results of the total polyphenols quantification, showed that the extract obtained by distilled water contains the largest amount of total phenols with a value of 27,68 mg Eq AG/g of extract, followed by the ethanolic extract that reached 10,25 ± 0,6 mg Eq AG/g of extract.

The antibacterial test results exhibited that the ethanolic extract gave the highest inhibitory activity against the three strains tested, whose *Staphylocoque aureus* was the most sensitive to all the extracts with an inhibition zone of 12,53 mm, than *Klebsiella oxytoca* and *Escherichia coli*.

Keywords: evergreen cypress, Phenolic compounds, antibacterial activity, Antibiogram, solvents.

• ملخص :

Cupressacées sempervirens L أو السرو الأخضر شجرة صنوبرية من عائلة Cupressus Cupressacées ، تستخدم في الطب التقليدي للتخفيف من آلام المعدة، الالتهاب، وجع الأسنان و كذلك لعلاج مرض السكري.

يركز هذا العمل على دراسة التأثير المضاد للبكتيرية وتحديد محتوى البوليفينول الكلي. تم إجراء عملية الاستخراج عند درجة حرارة الغرفة باستخدام أربعة مذيبات (الايثانول، الأسيتون، الميثانول و المياه القطرة) ، ثم اتباع طريقة " استخراج الجزء الغير متطاير بواسطة محلول كيميائي " extraction solide-liquide

قبل الشروع في التجربة، تمّ تجميع المواد النباتية ثم تجفيفها وسحقها حيث تم اجراء اختبار كلوروميثري " باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu " لتحديد المركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا الخاص بمستخلصات أعدت من أوراق السرو الأخضر باتباع طريقة " antibiogramme " ضدّ سلالة (*Staphylocoque aureus*) و اثنين من السلالات البكتيرية (*Klebsiella oxytoca et Escherichia coli*)

أظهرت نتائج الفحوصات انه تم العثور على أعلى محتوى لمركب الفينول في مستخلص المياه القطرة، في حين اقل محتوى يوجد في مستخلص الأسيتون.

نتائج اختبار مضاد البكتيريا أظهرت أن مستخلص الايثانول أعطى أعلى نشاط مشبط ضد السلالات الثلاث التي تم اختبارها، حيث أنّ *Staphylocoque aureus* هي الأكثر حساسية لهذه المستخلصات

- الكلمات المفتاحية : السرو الأخضر ، المركبات الفينولية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، مضاد حيوي منطّة التثبيط .

Introduction :

Tout au long de l'histoire humaine, des milliers de plantes biologiquement actives ont été identifiées et utilisées en médecine, il existe actuellement des centaines de médicaments modernes à base de composés actifs isolés de plantes **(Zakaryan et al., 2017)**.

Cupressus sempervirens L. est une espèce de conifère dite méditerranéenne ou commune, qui appartient à la famille des Cupressacées **(Amara et al., 2017)**.

Il est considéré comme un arbre médicinal, largement utilisée en médecine traditionnelle, ou ses feuilles séchées sont utilisées pour le soulagement des douleurs à l'estomac ainsi que pour traiter le diabète et ses fruits séchés sont utilisés pour traiter les inflammations, le mal aux dents...etc **(Selim et al., 2014)**.

Les plantes médicinales sont capables de produire une grande diversité de produits qui ne participent pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire, qui constituent une source importante de molécules bioactives, impliqués dans l'adaptation des plantes à leur environnement **(Makkar et al., 2007)**, dont on distingue : les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, les polyphénols et les huiles essentielles etc. Parmi ces composés, les polyphénols abondamment présents dans notre alimentation, représentent l'un des groupes les plus importants **(Prasana et al., 2016)**. Du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires **(Rodrigues et al., 2018)**.

Du point de vue physiologique humain, les composés phénoliques sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques, présentant des activités anti-inflammatoires, anti-âge, antimicrobiennes, antioxydantes **(Macheix, 1996)**. De nombreuses études suggèrent que le régime alimentaire riche en composés phénoliques réduira l'incidence de certaines maladies chroniques, telles que le diabète, les cancers et les maladies cardiovasculaires **(Lin et al., 2016)**.

L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème majeur de la santé publique, qui a orienté la recherche pour l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre les bactéries résistantes (**Bouyahya et al., 2017**).

L'évaluation des propriétés antibactériennes des polyphénols synthétisés par divers groupes de plantes médicinales est certaine et démontré par plusieurs recherches expérimentales (**Tungmunnithum et al., 2018**). L'activité antibactérienne des polyphénols est une activité inhibitrice contre la croissance bactérienne (**FATTOUCH et al., 2007**). Ces composés pourraient interférer avec la physiologie des microorganismes par différents mécanismes d'action (**Coppo et al., 2014**).

L'étude de l'activité antibactérienne demeure une tâche très intéressante et utile dans le domaine pharmacologique et industriels, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou peu connue. A cet effet il est intéressant de valoriser les sources végétales riches en polyphénols et d'autre métabolite secondaire

Au cours de ce travail, nous présentons une mise au point bibliographique décrivant les notions essentielles sur la plante étudiés (*Cupressus sempervirens* L.), sa composition phytochimique et intérêt thérapeutique, une recherche sur les composés phénoliques : structure, dérivé et propriétés, et leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes, ainsi que leurs modes d'action.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activités antibactérienne des extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens* L. vis-à-vis des souches bactériennes pathogène de Gram-positive et Gram-négative, et de déterminer la teneur en polyphénols totaux

Liste des tableaux

Table 1 : Les souches bactérienne utilisées	34
Tableau 2 : Degré de sensibilité des souches microbiennes selon le diamètre de la zone d'inhibition (Moreira et al., 2005).....	38

Liste des abréviations

A : Extrait acétonique

ADN : Acide désoxyribonucléique

CMM : chromatographie sur couche mince

DI : Diamètre d'inhibition

E : Extrait éthanolique

E COLI : *Escherichia coli*

ED : extrait aqueux (eau distillée)

HE : huile essentielle

HPLC : chromatographie en phase liquide à haut performance

HRE : extraction par reflux thermique

K O : *Klebsiella oxytoca*

M : Extrait méthanolique

MAE : Extraction assistée par micro-ondes

RL : Radicaux Libres

SA : *staphylococcus aureus*

SCE : extraction sous-critique

SFE : fluide supercritique extraction

SLE : Extraction solide-liquide

UMAE : extraction par ultrasons / assistée par micro-ondes

RL : Radicaux Libres

UMAE : extraction par ultrasons / assistée par micro-ondes

Liste des figures

Figure 1 : Aspect général de deux variétés de <i>Cupressus sempervirens</i> L. (Della Rocca, 2017).....	3
Figure 2 : feuilles de <i>cupressus sempervirens</i> L. (originale).....	4
Figure 3 : Les organes reproducteurs mâles et femelles de <i>cupressus sempervirens</i> L (originale).....	5
Figure 4 : Répartition géographique actuelle des aires d'espèces <i>cupressus sempervirens</i> L. (Rojas-San doval, 2016)	7
Figure 5 : structure de base d'un phénol (Mello, 2015)	13
Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes (Stalikas, 2007).....	19
Figure 7 : séchage du matériel végétal.....	38
Figure 8 : Etapes de réalisation du test d'activité antibactérienne.....	42
Figure 9 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique	41
Figure 10 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits des feuilles de <i>Cupressus sempervirens</i> L.	42
Figure 11 : effet antibactérien des 4 extraits préparés sur <i>E. coli</i>	44
Figure 12 : effet antibactérien des 4 extraits préparés sur <i>Klebsiella oxytoca</i>	45
Figure 13 : effet antibactérien des 4 extraits préparés sur <i>staphylococcus aureus</i>	46
Figure 14 : l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de <i>Cupressus sempervirens</i> L. sur toutes les souches testées.....	47
Figure 15 : Analyse en composantes principales (A.C.P) de l'activité antibactérienne des different extraits contre une souche à Gram-positive (<i>S.aureus</i>) et deux souche à Gram-négative (<i>E.coli</i> et <i>K. oxytoca</i>).....	48
Figure 16 : effet comparé par le test d'ANOVA pour l'ensemble des bactéries.....	50

TABLE DES MATIERES

•	REMERCIEMENT	
•	DEDICACE	
•	LIST DES ABREVIATION	
•	LIST DES FIGURES	
•	LIST DES TABLEAUX	
•	RESUME	
•	INTRODUCTION	1

CHAPITRE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.	Présentation de Cupressus sempervirens L.....	3
1.1.	Description botanique	3
1.2.	Origine et répartition.....	6
1.3.	Taxonomie.....	7
1.4.	Données écologiques.....	9
1.5.	Compositions phytochimiques.....	9
1.6.	Utilisation et intérêt thérapeutique.....	10
2.	Métabolites secondaires des plantes	11
3.	Généralité sur les composés phénoliques	12
3.1.	Structures des composés phénoliques	13
3.2.	Rôle pour la plante	13
4.	Biosynthèse des composés phénoliques	14
5.	Classification des composés phénoliques	17
5.1.	Les phénols simples	17
5.2.	Les acides phénoliques	17
5.3.	Acides hydroxybenzoïque	18
5.4.	Acides hydroxycinnamiques	18
6.	Les polyphénols	18
6.1.	Les flavonoïdes : une classe majeure des polyphénols.....	19
6.1.1.	Rôles des flavonoïdes	19
6.1.2.	Classification des flavonoïdes	20
6.2.	Les tanins	20
6.2.1.	Les tanins hydrolysables	21
6.2.2.	Les tanins condensés.....	21
6.3.	Les tanins condensés	21
7.	Propriétés physico-chimique et caractérisation.....	22
8.	Méthodes d'extraction des polyphénols	22
9.	Méthodes d'identification des polyphénols	23
10.	L'activité antioxydante des polyphénols.....	23
10.1.	Le stress oxydatif	23

10.2. Effet de stress oxydatif	24
10.3. Les antioxydants	24
11. Mécanismes d'action des polyphénols contre le stress oxydatif	25
12. Intérêt thérapeutique et emploi	26
13. L'activité antimicrobienne	27
14. La résistance des bactéries aux antibiotiques (produit chimique)	28
14.1. Origines de la résistance	29
14.2. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques.....	29
15. Bactérie à Gram-négative et à Gram-positives	30
15.1. Escherichia coli	30
15.2. Klebsiella oxytoca	31
15.3. Staphylococcus aureus	31

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1. Matériel.....	33
1. 1. Matériel végétale	33
1. 2. Les souches bactérienne	33
2. Méthode	34
2. 1. Extraction des polyphénols.....	34
2. 1.1. Séchage	34
2.1. 2. Broyage.....	35
2. 1.3. Préparation des extraits bruts	35
2.1. 4. Extraction par l'eau distillée	36
2.2. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie	36
2. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	37

CHAPITRE 3 : RESULTATS

1. Teneurs en polyphénols totaux des extraits des feuilles de Cupressus sempervirens L.	41
2. Activité antibactérienne	43
2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur Escherichia coli.....	44
2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur Klebsiella oxytoca.....	45
2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur Staphylococcus aureus	46
2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur toutes les souches bactériennes	47
2.5. l'activité antibactérienne des extraits sur les trois souches bactériennes (analyse en composant principale).....	48
2.6. Etude comparée de l'effet antibactérien des différents extraits sur les trois souches bactériennes.....	49

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

1.	Dosage des polyphénols totaux	51
2.	Activité antibactérienne	51
•	CONCLUSION & PERSPECTIVE	54
•	REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUE	56

1. Présentation de *Cupressus sempervirens* L. :

1.1 Description botanique :

Cupressus sempervirens L. ou le cyprès vert est un conifère de la famille des Cupressacées, arbre de taille moyenne, toujours vert (**Soltani, 2015**). Sa hauteur peut atteindre 30m (**Khan et al., 2017**). Avec une croissance rapide quand il est jeune sur la plupart des types des sols (**Al-Snafi, 2016**).

Le Cyprès vert, se distingue par une diversité morphologique importante, illustrée par la coexistence de deux formes d'aspect très différent (**Arnef, 1985**).

➤ La forme *horizontalis*, à branches étalées et d'aspect conique (**Froux, 2002**), à peu près aussi large que haut, se compose d'une couronne large et lâche, de branches plus au moins horizontales (**Bartels, 1998**).

➤ La forme *fastigiata*, à branches dressées ou très courtes et d'aspect en pinceau (**Froux, 2002**), est considéré comme la forme la plus plantée dans le bassin méditerranéen (**Bartels, 1998**).



Figure 1 : Aspect général de deux formes de *Cupressus sempervirens* L. (**Della Rocca, 2017**).

L'espèce *Cupressus sempervirens* L. est un arbre très ramifié, avec des rameaux généralement courts, quadrangulaires, de couleur vert grisâtre, qui tombent après quelques années (**Boualouana, 2013**). Un tronc droit de 1m de diamètre, rarement plus de 2m, L'écorce de couleur grise brunâtre, est fibreuse, fine et striée verticalement (**Gaudulla et De rigo, 2016**).

Les feuilles persistantes sont des écailles opposées, "squamifères" vertes foncées, et aplaties (**Froux, 2002**), 2-5 mm de long sur les pousses principales (**Bartel, 1998**), elles dégagent une odeur très faible même froissées, peuvent persister jusqu'à 4 ans (**Boualouana, 2013**).



Figure 2 : feuilles de *Cupressus sempervirens* L. (originale)

L'appareil racinaire est pivotant, très développé avec des racines secondaires horizontales et superficielles qui ancrent l'arbre dans le sol (**Froux, 2002**), et leur confère une bonne résistance au vent, surtout pour les formes fastigiées (**Arnef, 1985**).

La floraison a lieu au tout début de l'année, entre le mois de janvier et le mois de mars, mais elle peut varier selon les régions (**Riom, 2010**).

Les fleurs unisexuées se situent à l'extrémité des rameaux et elles caractérisent les conifères par la forme épée ou chatons (**Navarro, 2016**).

Selon **Bartels (1998)**, Les fleurs mâles de 3-8 mm de long de couleur vert jaunâtre, les femelles insignifiantes verts de 3-5 cm de large, les chatons mâles sont de forme ovoïde et les femelles globuleuses.

Cupressus sempervirens L. est une espèce monoïque, c'est-à-dire que la fleur mâle et femelle sont portés par le même pied, Les organes reproducteurs mâles sont groupés en chatons, oblongs, de couleur jaune brun et les cônes femelles sont globuleux, de couleur verte (**Saïchi et al., 2009**).

Les cônes femelles sont de forme ovale ou sphérique, 2-4 cm de long, 2-2,5 cm de large et d'environ 4 cm de diamètre, avec 6 à 12 écailles d'abord verts, très fermés, puis sec à maturités, en mars mai de la 2ème année les graines sont libérés (**Bartels, 1998**).



Figure 3 : Les organes reproducteurs mâles et femelles de *Cupressus sempervirens L* (originale)

Les graines sont fixées aux écailles (**Bouharmont et Evard, 2002**), à 2-3 courtes ailes latérale (**Saïchi et al., 2009**), gris jaunâtres à la maturité, de forme subglobuleux, ou ellipsoïde, de mesure (2,5-4 x 2-3 cm) (**Rojas-Sandova, 2016**).

Pollinisation et fécondation :

La pollinisation est anémophile, s'opère par le vent, la graine de pollen est dépourvue de ballonnets, sans cellules prothalliennes. L'ovule produisent des gouttelettes de pollinisation, liquide visqueux qui capte les gaines de pollen transportés par le vent (**Bouharmont et Evard, 2002**).

1.2 Origine et répartition :

Le cyprès méditerranéen, ou cyprès vert est originaire de la région méditerranéenne orientale, du nord-est de l'Afrique, du Moyen-Orient et a une population isolée en Iran (**Soltani et al., 2015**). On le trouve aussi en Syrie, la Turquie, Chypre et plusieurs îles grecques (**Tuğrul, 2017**). Il aurait été introduit à Chypre et en Crète par les Phéniciens puis dans l'Ouest de la Méditerranée (France, Espagne, Italie) (**Froux, 2002**), où il peut maintenant être considéré comme naturalisé (**Karimi et al., 2013**).

Le genre *Cupressus* L. qui appartient à la famille des *Cupressaceae* dont on trouve 33 espèces (**Avramidou et al., 2016**), est largement répandu dans l'hémisphère nord de la Chine à la région Méditerranée et on le trouve aussi en Amérique du Nord et centrale (**Karimi et al., 2013**), et dans d'autres régions au climat d'été plus frais et plus humides notamment, la Californie, l'Afrique du sud et le sud de l'Australie (**Rojas-Sandoval, 2016**).

L'un des plus anciens cyprès vivants est situé en Italie est daté comme plus de 800ans (**Gaudulla et de Rigo, 2016**).



Figure 4 : Répartition géographique actuelle des aires d'espèces *Cupressus sempervirens* L. (Rojas-San doval, 2016).

1.3. Taxonomie :

La classification botanique repose sur un système développé au dix-huitième siècle, attribuant aux taxons un rang particulier (ce sont les rangs linnéens)

Les « conifères » constituent le groupe le plus important des gymnospermes du grec (gymnos = nu et sperma = graine) dont les membres de ce groupe produisent des organes reproducteurs spécialisés appelés cônes, ces derniers protègent les ovules et les graines (Bouharmont et Evrard, 2002).

On les désigne souvent sous le nom sempervirent en raison de leurs feuillages persistants ou de résineux (soft Wood en anglais) (Bouharmont et Evrard, 2002). Ils forment l'ordre des coniférales ou pinnales, divisées classiquement en six familles : les Araucariaceae (Araucarias, Agathis), les Cephalataxaceae (cephalotaxus), les Cupresaceae (Cyprés, Thuyas, Genévrier), les pinaceae (Mélèzes, Sapin, Pin, Cédres, épiceas), les Podocarpaceae (Podcarpus) et les Taxodiaceae (Séquoias) (Boualouana, 2013).

La découverte des peuplements spontanées du cyprès a été au début de siècle il y a eu deux espèces du *Cupressus dupreziana* au tassili et le *Cupressus atlatica* qui ont été confondu avec le *Cupressus sempervirens* L. ce n'est qu'après des études botanique approfondies qu'il y a eu différenciation entre les 3 espèces **(Bouharmont et Evrard, 2002)**.

- **Systematique :**

Selon la classification de Linnaeus, *Cupressus sempervirens* L. appartient au : **(Al-Snafi, 2016)**.

Domaine : Eukaryota

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Pinophytina

Division : Coniferophyta

Classe : Pinopsida / Coniferopsida

Ordre : Pinales

Famille : Cupressaceae

Sub-famille : Cupressoideae

Genres : *Cupressus*

Espèce : *Cupressus sempervirens* L.

1.4. Données écologiques :

Ces espèces montrent globalement une grande plasticité vis à vis des conditions édaphiques, c'est-à-dire est un arbre qui s'adapte à des conditions physiques très sévère (**Nichane, 2015**). Il tolère des sols calcaires, argileux, superficiels (moins de 50cm) secs et pauvres (**Aristotelis, 1994**), Même s'il préfère, les sols riches, profonds, humides et bien aéré à ph neutre (**Gaudulla et de Rigo, 2016**).

Le cyprès vert est bien adapté à la région méditerranéenne par sa grande tolérance à la sécheresse et il peut se développer dans des climats humides (**Froux, 2002**). Se rencontrent aussi dans des habitats subhumides, semi-arides et arides dans les régions montagneuses (**Sienkiewics et al., 2018**). Les jeunes plantes ne tolèrent pas les faibles températures tandis que les adultes peuvent survivre à des températures allant jusqu'à -20 c (**Gaudulla et al., 2016**).

Le cyprès vert peut rapidement reprendre après la pluie grâce à son système racinaire pivotant (**Arnef, 1985**). Il n'a pas d'exigence pluviométrique, avec un taux de pluie de 200mm par an, ce sont des arbres qui ont une longue vie et une croissance en longueur rapide dans de bonne condition, plantez au cours de l'automne ou au printemps, une fois bien enraciné les arrosages sont inutiles (**Froux, 2002**).

1.5. Compositions phytochimiques :

L'analyse phytochimique préliminaire a montré que le cyprès vert contient : des alcaloïdes, des tanins, des saponines et des phénols (**Al-Snafi, 2016**), aussi des flavonoïdes : cupressuflavone, amentoflavone, rutine, la quercitrine, la quercétine et la myricitrine, anthocyanidine, catéchines flavones, flavonols et isoflavones, et catéchol (**Ben nouri,2015**).

Il a été démontré que les huiles essentielles, volatiles de cyprès vert (*Cupressus sempervirens L.*) sont différées selon l'emplacement et la variété de la plante (**Al-Snafi, 2016**).

La Chromatographie Gazeuse – Spectrométrie de Masse a révélé la présence de 20 composés de l'huile de cyprès de Méditerranée :

Les composés majoritaires sont l'alpha-pinène, le Delta-3-caréne, le Terpinolène et le Cedrol (**Amara et al., 2017**), inclus : Ricycltène, α -Thujène, Camphène, Sabinène, β -Pinène, Mycènes, limonène, γ -Terpinène, Camphre, Acétate de Bronyle, Carvacrol, β -Caryophyllène, α -Humulène, Germacrene-D, δ -Cadinène et α -Cédrol (**Al-Snafi, 2016**).

1.6. Utilisation et intérêt thérapeutique :

Les arbres de cyprès vert est utilisé comme haie coup vent, en ornement et pour la production de bois en raison de toutes ces propriétés (durable et résistant à la pourriture et bien d'autre usage) (**Karimi et al., 2013**). Il est aussi utilisé pour le reboisement des terrains secs car il est très résistant à la sécheresse et peu sensible aux incendies (**Froux, 2002**).

Toutes les parties de cette plante sont utilisées pour des intérêts industriels ou comme matière primaire pour différents produits, mais le domaine thérapeutique est le plus important. Les parties aériennes de la plante sont largement utilisées en médecine traditionnelle depuis de nombreuses années (**Ibrahim et al., 2017**). On utilise principalement les cônes, les feuilles, les jeunes rameaux, et l'huile essentielle (**Morigane, 2007**), les feuilles de cette plante sont utilisées comme emménagogue et pour soulager les maux d'estomac, La graine séchée de cet arbre a été utilisée pour les ulcères, ecchymoses, plaies, boutons, pustules, éruptions cutanées et érysipèle (**Ben Nouri.,2015**).

Son fruit où Les noix de cyprès renferment des principes actifs aux propriétés antivirales, faisant de cette plante, la plante majeure dans toutes les affections virales aiguës ou récidivantes. Ces molécules ont une action directe sur le virus et permettent ainsi de supprimer l'infection (**Anonyme, 2016**).

Les vapeurs de la plante sont utilisées dans le traitement de la coqueluche et les extraits aqueux sont utilisés comme antiseptiques et comme pansements pour le traitement de maladies circulatoires telles que les hémorroïdes. (**Ibrahim et al.,**

2017). Dans un usage interne, le Cyprès est utilisé contre l'hémoptysie, les hémorroïdes, les varices, les troubles Ovariens. Il est aussi utilisé dans le traitement, de la grippe, de l'énurésie, des rhumatismes et de l'irritabilité **(Morigane, 2007).**

L'huile essentielle de ce dernier est utilisée à usage externe pour les céphalées, les rhumes, la toux et la bronchite. En plus, il a été démontré que les principes actifs de l'huile essentielle (HE) de cette espèce présentent des activités antiseptiques, astringentes, anti-inflammatoires, balsamiques et Aromathérapeutiques **(Amara et al., 2017).**

Le cyprès est également utilisé traditionnellement pour diminuer les symptômes de l'insuffisance veineuse **(Anonyme, 2016).**

2. Métabolites secondaires des plantes :

Les métabolismes secondaires représentent toute substance présentes chez un organisme, et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante par opposition aux métabolites primaires **(Tânia da et al., 2012).**

Les métabolites secondaires font référence à des composés présents dans des cellules spécialisées, sont structurellement et chimiquement beaucoup plus diversifiés, et qui n'ont pas une fonction active dans la photosynthèse et la respiration mais ils sont nécessaires à la survie des plantes dans l'environnement **(Lattanzio., 2013).**

La capacité à synthétiser des métabolites secondaires a été sélectionnée au cours de l'évolution dans différents lignée végétale lorsque ces composés s'adressent à ses besoins par exemple : Les substances volatiles et les pigments floraux ont évolué pour attirer les insectes pollinisateurs et ainsi améliorer la fertilisation, la synthèse des produits chimiques (produits secondaires) capables de réagir efficacement aux situations de stress imposées par des facteurs biotiques et abiotiques. **(Kleibenstein, 2004).**

Ces voies, souvent recrutées parmi les voies essentielles du métabolisme primaire lors de la duplication génétique initiale, conduisant à des gènes dupliqués

présentant de nouvelles fonctions et des rôles optimisés et diversifiés dans de nouvelles voies, font partie intégrante du programme de développement des plantes. **(Lattanzio, 2013)**.

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux **(Anulika et al., 2016)**.

- Les composés phénoliques
- Les composés terpéniques
- Les alcaloïdes

3. Généralité sur les composés phénoliques :

Les composés phénoliques forment un groupe important de substances qu'il est difficile de définir simplement. Ils se trouvent dans le monde naturel des végétaux où ils constituent les métabolites secondaires les plus abondants chez les plantes, avec plus de 8000 structures qui ont été identifiées et isolées **(Bravo, 1998)**. Plusieurs milliers d'entre eux ont été décrits et caractérisés chez les végétaux grâce aux progrès des techniques d'analyse (chromatographie, spectrométrie de masse ou Raman, électrophorèse capillaire **(Macheix, 1996)**).

Ils sont contenus dans les organes végétaux les plus divers : feuilles, tiges, écorces, bois, racines, fleurs, fruits, embryons **(Bravo, 1998)**. Les principales sources alimentaires de ces composés sont les fruits et les légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé apportant le reste **(Belyagoubi, 2011)**.

3.1. Structures des composés phénoliques :

Ils sont constitués d'au moins un cycle aromatique (C6) portant un ou plusieurs groupes hydroxyle (**Mello, 2015**), libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton,1999**).

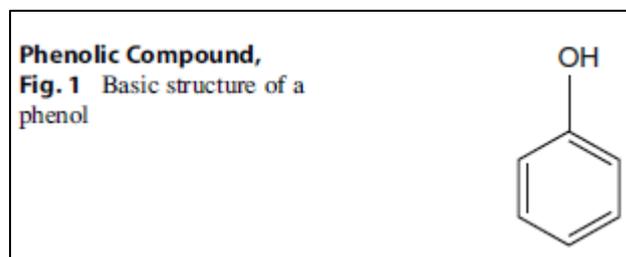


Figure 5 : structure de base d'un phénol (**Mello, 2015**).

Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques, et sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative très inégale selon les espèces considérées, les organes, les tissus et les stades physiologiques (**Brzowska et al., 1976**). Donc Les différentes structures phénoliques sont souvent spécifiques de l'espèce, de la famille botanique ou encore des conditions environnementales (**Hamadache, 2011**).

Selon leur caractéristique structurale, ils se répartissent en une dizaine de classe chimique, L'acide phénolique (C₆H₅OH) est le composé le plus simple de la classe des composés phénoliques (**Mello, 2015**), allant jusqu'à des substances hautement polymérisées comme les tanins. (**Macheix et al., 2005**).

3.2. Rôle pour la plante :

Les composés phénoliques se trouvent généralement sous forme d'esters ou de glycosides et non sous forme de composés libres (**Mello, 2015**). Ils sont responsables de plusieurs activités fonctionnelles dans le cycle de vie des plantes, comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (**Boizot et al., 2006**), notamment la défense, les attractifs pour les pollinisateurs et la protection contre les rayons ultraviolets (**Mello, 2015**). Aussi ils interviennent aux interactions de la plante avec son environnement en jouant le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (allélopathie) et entre les

plantes et les symbioses. Donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu nature (**Talbi, 2015**).

Ces caractéristiques expliquent leur large utilisation commerciale en tant qu'aromatisants, médicaments naturels, antioxydants, etc., agissant en tant qu'additifs naturels (**Mello, 2015**).

4. Biosynthèse des composés phénoliques :

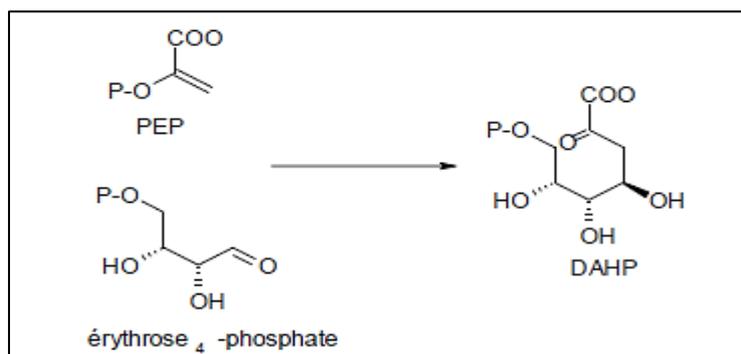
La voie métabolique de biosynthèse des composés phénoliques est très complexe, comprend de nombreuses enzymes qui sont soit constitutives soit inductibles (**Lacampagne, 2010**). Deux voies largement décrites dans la littérature conduisant aux composés aromatiques la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate (**Bruneton, 1999**).

➤ La voie de l'acide shikimique :

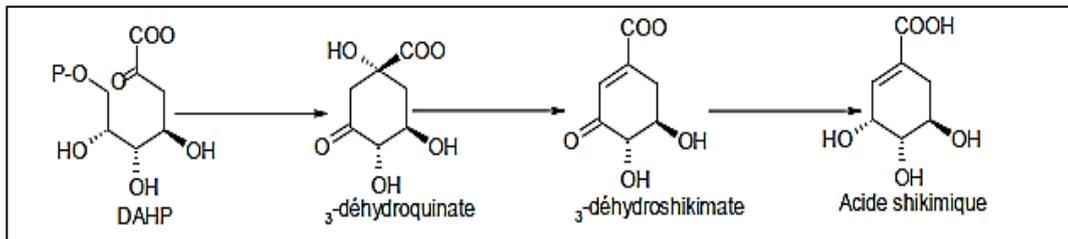
Cette voie est liée au métabolisme des glucides et des acides aminés aromatiques. Il s'agit d'une série de réaction « cyclisation et une réduction » Les substances initiales ici sont, le phosphoénolpyruvate (PEP) qui est le produit de la glycolyse (voie EMP) et l'érythrose-phosphate issue de la voie du pentose phosphate du cyclecalvin. Leur condensation et cyclisation conduisent à la formation d'un intermédiaire important, l'acide shikimique. (**Brzososlea et al., 1976**).

Selon **Bruneton (1999)**, l'origine biogénétique de l'acide shikimique :

1^{ère} étape : condensation aldolique stéréospécifique entre l'acide phosphoénolpyruvique PEP et l'érythrose -4 phosphate

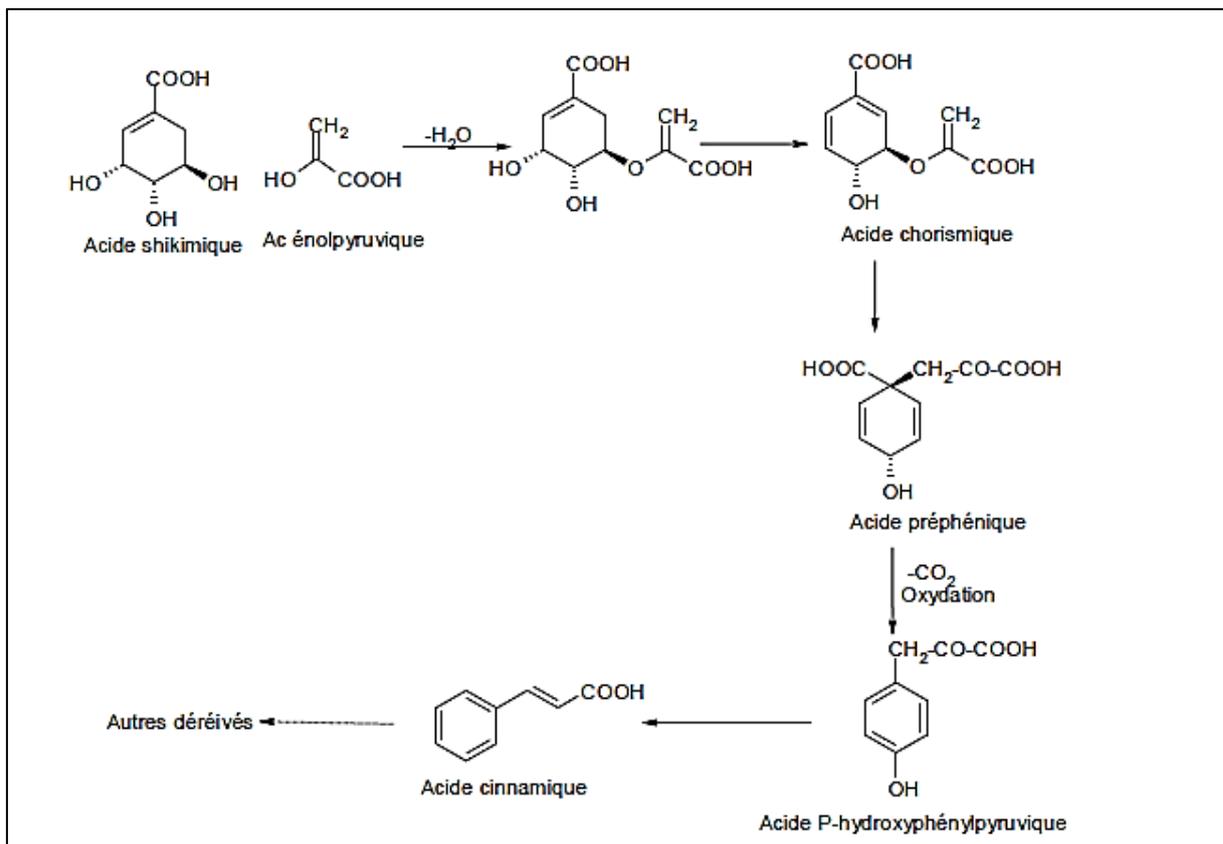


2ème étape : l'acide 3-désoxy-D-arabino- heptulosonate-7-phosphate (DAHP) résultant est cyclisé en acide 3 déhydroquinate. Ce dernier est déshydraté et conduit à l'acide shikimique



Ce dernier peut, soit se transformer en acide oxybenzoïques (par exemple acide gallique), soit, après l'acquisition d'une molécule supplémentaire de phosphoénolpyruvate et une série de stades intermédiaires suivie d'une amination, donner naissance aux acides aminés aromatiques - la phénylalanine et la tyrosine.

Leur désamination conduit à la formation des acides cinnamiques et leurs aldéhydes et de coumarines. (Brzowolsae et al., 1976).

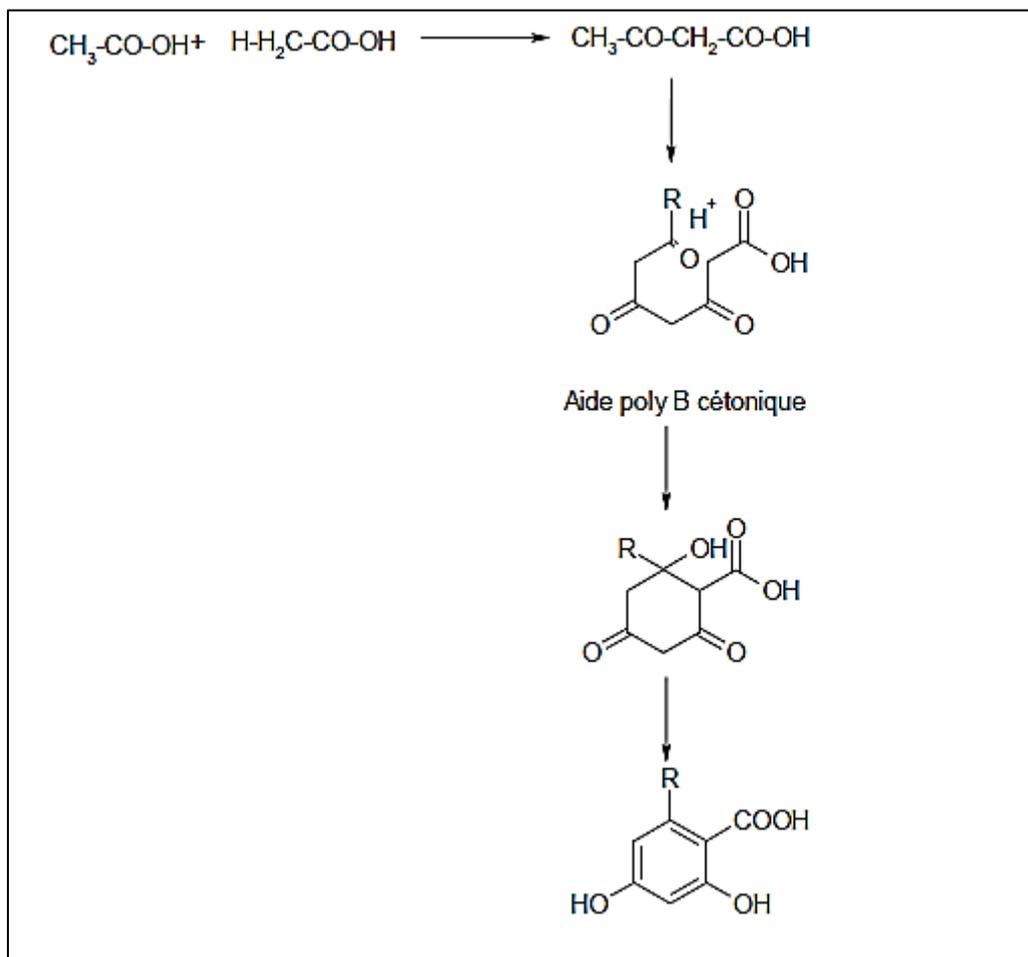


L'acide shikimique conduit à l'acide chorisimique pour former la phénylalanine et la tyrosine, la désamination de ces acides aminés résultent les acides hydroxycinnamiques (**Brzozowski et al., 1976**).

De cette voie résulte la formation de plusieurs composés comme Les phénols les acides phénols, Coumarines, Lignanes, Flavonoïdes, Anthocyanosides, et les tannins (**Bruneton, 1999**).

➤ Voie de l'acétate :

Est liée au métabolisme des acides gras, la formation des noyaux aromatiques dépend de 3 unités acétate ou malonate activées par le coenzyme A (L'acétyl-CoA) il est transformé en malonyl-CoA, exemple cas du thymol (**Lacampagne, 2010**).



Plusieurs unités acétates se condensent pour conduire à des dérivés β cétonique qui se cyclisent ensuite.

De cette voie résulte, Les quinones (dérivés 1-8, dihydroxyanthracéniques), Naphtodianthrones, Orcinols, Phloroglucinol (**Bruneton, 1999**).

5. Classification des composés phénoliques :

La classification des composés phénoliques peut se faire selon plusieurs critères, La complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisés) (**Mello, 2015**). Le degré de modification de ce squelette (degrés d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation.), Les liaisons possibles avec d'autre molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (**Machiex et al., 2005**).

- Selon la voie de leur biosynthèse :

On distingue une classe de composés regroupant des formes simples (phénols simples, acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques, coumarines, naphtoquinones, stilbènes, flavonoïdes, lignanes...) et des phénols condensés issus de la polymérisation des lignanes (lignines) ou de certains flavonoïdes (tanins). (**Verdu, 2013**).

5.1. Les phénols simples :

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant d'un simple phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C15 (**Bruneton, 1999**).

5.2. Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques désignent en général les phénols qui possèdent une fonctionnalité d'acide carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils contiennent deux structures de carbone distinctes : les structures hydroxycinnamique et hydroxybenzoïque (**Saxena et al., 2012**).

5.3. Acides hydroxybenzoïque :

Les acides hydroxybenzoïque (p- hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique, gentisique...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure de base de type C6-C1. Ils sont particulièrement bien représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes. Les acides hydroxybenzoïque existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides. **(Machiex et al., 2005).**

5.4. Acides hydroxycinnamiques :

Les acides hydroxy-cinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique issus des voies de biosynthèse de MavolanateShikimate **(Machiex et al., 2005).**

Chez les plantes. Plusieurs composés phénoliques simples tels que l'acide cinnamique, le p-coumarique, l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide rosmarinique appartiennent à cette classe **(Alam et al., 2016)**. L'ensemble est souvent rapporté sous le vocable commun de *phénylpropanoïdes* **(Machiex et al., 2005)**, qui peuvent représenter environ un tiers des composés phénoliques de notre alimentation **(Teixeira et al., 2013)**.

6. Les polyphénols :

Au fil du temps, l'intérêt croissant pour les composés phénoliques des plantes a donné naissance à une définition évolutive de ce qu'est un polyphénol. Qui désignent d'après plusieurs auteurs des tannins de structures plus ou moins complexes, de hauts poids moléculaires et capables de faire précipiter des protéines en solution **(Jyoti Bhuyan et al., 2017)**.

Selon **Tien tran (2005)**, le terme polyphénol définit des métabolites secondaires de plantes qui dérivent exclusivement de la biosynthèse des phénylpropénoïdes dérivés de l'acide shikimique et/ou de celle des polycétides, et dont la structure dépourvue de groupes fonctionnels azotés, comporte plus d'un cycle phénolique, cette définition nous permet d'aborder les polyphénol sous tous

leurs aspects, quel que soit leurs masse moléculaire et les classer systématiquement en fonction de la structure chimique et de l'origine biosynthétique.

De cette définition, les polyphénols peuvent se regrouper en 5 grandes classes : les flavonoïdes, les tannins condensés, les tannins hydrolysables, les phlorotannins, les hydroxystilbénoloïdes possédant un squelette de motif C6-C2-C6 et une sixième classe regroupant divers polyphénols dérivés d'acides phénoliques variés, comme par exemple l'acide caféique (Tien tran, 2005).

6.1. Les flavonoïdes : une classe majeure des polyphénols :

L'ensemble des flavonoïdes représentent la troisième famille la plus abondante de métabolites secondaires de faible poids moléculaire (Weston et Mathesius, 2013), chez les végétaux après les alcaloïdes et les terpenoïdes. (Tien tran, 2005).

Ils désignent une classe structurellement très diversifiée avec plus de 4000 composés différents (Bruneton, 1999). Les flavonoïdes sont présents dans de nombreux fruits, légumes, graines, fleurs, rhizômes, et donc dans diverses nourritures et boissons (comme le vin, le thé ou le chocolat) mais également dans de nombreuses herbes médicinales (bravo, 1998).

Les flavonoïdes possèdent en général un squelette de base commun de type 2- phénylchromane ou noyau flavane (Tien tran, 2005), cette squelette carboné comprend 15 atomes de carbones répartis selon la séquence C6-C3-C6 commune à tous les flavonoïdes (Angiologica, 1972).

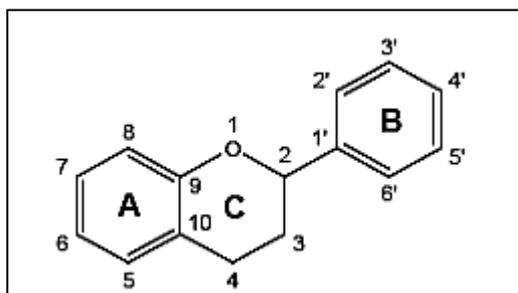


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes (Stalikas, 2007).

6.1.1. Rôles des flavonoïdes :

Chez les plantes, les flavonoïdes sont des pigments hydrosolubles, ils ont des fonctions essentielles dans la pigmentation des fleurs et des graines, (**Rispail et al., 2005**). Et dans divers processus vitaux des plantes : réactions de défense pour se protéger contre les stress abiotiques tels que les rayons ultraviolets, et les dommages photo-oxydants (**Winkel-Shirley, 2002**), ou les stress biotiques tels que la prédation et les attaques d'agents pathogènes (**Rispail et al., 2005**).

6.1.2. Classification des flavonoïdes :

En fonction de la position de la liaison du cycle aromatique avec le radical benzopyranique (chromano), ce groupe de produits naturels peut être divisé en trois classes: (**Grotewold, 2006**).

- Les flavonoïdes (2 phénylbenzopyrans),
- Les isoflavonoïdes (3-benzopyrans)
- Les néoflavonoïdes (4- benzopyranes)

Ces structures chimiques peuvent différer par la saturation de l'anneau hétéroatomique C et par la structure globale de l'hydroxylation. Tous ces groupes partagent généralement un précurseur de chalcone commun et sont donc biogénétiquement et structurellement liés (**Lattanzio, 2013**).

6.2. Les tanins :

Les tanins constituent le troisième groupe important de polyphénols, de poids moléculaire relativement élevés (de 500 à plus de 3000 Da), (**JyotiBhuyan et Baso, 2017**). Ils sont des oligomères généralement solubles dans l'eau (20-35 ° C) (**Hassanpour et al., 2011**). Ils ont des propriétés spéciales, capables de se complexer fortement avec les glucides et les protéines, l'amidon, la cellulose et les minéraux. (**Lattanzio, 2013**).

Les tanins sont constitués de deux groupes principaux, chez les plantes supérieures : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Plus récemment, une troisième classe de tanins, les phlorotannins, a été isolée dans plusieurs genres d'algues. (**Lattanzio, 2013**).

6.2.1. Les tanins hydrolysables :

Ce sont les esters d'acide phénol et d'ose, ils sont facilement hydrolysables (**Bruneton, 1999**). Selon les acides issus de l'hydrolyse, les tanins hydrolysables sont classiquement divisés en gallotannins ou ellagitannins (**Bernays et al., 1989**). Que l'on trouve dans les baies et les noix (**JyotiBhuyan et Baso, 2017**).

6.2.2 Les tanins condensés :

Les tanins condensés sont également connus sous le nom de proanthocyanidines et de polyflavonoïdes, constitués de chaînes de motifs flavan-3-ol. Ils s'accumulent généralement dans les couches extérieures des plantes (**JyotiBhuyan et Baso, 2017**). Ce sont des dérivés non hétérosidiques, résultant de la polymérisation d'un nombre variable d'unités flavane (**Bruneton, 1999**).

6.3 Les stilbènes :

L'apparition de stilbènes dans le régime alimentaire humain est tout à fait faible, Un des meilleurs polyphénols stilbènes naturel étudié est le resvératrol (3,4', 5-trihydroxystilbène), ou trans-resvératrol trouvé en grande partie dans les raisins, soja, arachides et produits à base d'arachides (**Pandey et al., 2009**).

Chez les plantes La plupart des stilbènes agissent comme phytoalexines antifongiques, composés qui ne sont synthétisés qu'en réponse à une infection ou une blessure (**Pandey et al., 2009**).

7. Propriétés physico-chimique et caractérisation :

En raison de la diversité structurelle des produits polyphénoliques, ces composés varient considérablement dans leurs propriétés physicochimiques, même s'ils partagent la caractéristique phénolique commune (**Tso, 2010**).

En principe les composés phénoliques sont solubles dans les solvants organiques polaires, et dans les solutions d'hydroxyde de sodium et de carbonate de sodium, les acides phénols sont solubilisés par les hydrogénocarbonates, ils sont extractibles par les solvant organiques, en milieu légèrement acide, car elles sont

généralement plus stables à pH bas, et les conditions acides aident les polyphénols à rester neutres, ce qui permet de les extraire facilement dans des solvants organiques, Les formes hétérosidiques de ces composés phénoliques sont classiquement soluble dans l'eau (**Bruneton, 1999**). Et (**Tso, 2010**).

Les phénols sont facilement oxydables surtout en milieu alcalin, les dérivés cinamiques tendent à s'isomériser en solution aqueuse sous l'influence du rayonnement ultraviolet, les ester cinamiques d'hydroxy-acides (ex ; l'acide cagéyl-quinique) s'isomérisent facilement, en milieu acide ou alcalin, pour donner des mélanges d'isomères de position (acide chlorogénique) (**Bruneton, 1999**).

Une des propriétés chimiques importantes des composés phénoliques, est liées à celles des noyaux phénoliques comportant au moins un groupement hydroxyle (OH) (**Nkhili, 2009**). Ce qu'explique leur capacité de libérer un atome d'hydrogène (l'énergie de dissociation d'une liaison O-H est d'environ 87-90 kcal.mol⁻¹) qui peut ensuite piéger des radicaux libres générés par oxydation, ce processus fondamental confère aux polyphénols d'origine végétale leur propriété antioxydante (**Tien tran, 2015**).

En outre, Les structures phénoliques peuvent généralement interagir fortement avec les protéines, en raison de leurs cycles benzéniques hydrophobes et du potentiel de liaison hydrogène des groupes hydroxyle phénoliques. Cela donne aux polyphénols la capacité d'agir également en tant qu'antioxydants en raison de leur capacité à inhiber certaines enzymes impliquées dans la génération de radicaux, telles que diverses isoformes du cytochrome P450, des lipoxygénases, la cyclooxygénase et la xanthine oxydase (**Pereira et al., 2009**).

8. Méthodes d'extraction des polyphénols :

La diversité des composés polyphénolique et leur vaste distribution dans le monde végétal à rendre leur extraction, séparation, identification et leur analyse très difficiles bien qu'il soit presque impossible d'établir un protocole universel pour tous ces composés bioactifs (**Sahin et al., 2013**). Il existe quelques approches

générales de ces aspects importants de la recherche sur les polyphénols **(Tso, 2010)**.

Les composés phénoliques peuvent être extraits de plantes fraîches, congelées ou des échantillons séchés **(Dai et al., 2010)**. Il est généralement connu que le rendement de l'extraction chimique dépend du type de solvant et sa polarité, du temps d'extraction, la température, rapport échantillon / solvant, **(Khoddami et al., 2013)**, et la nature de l'échantillon qui peut contenir des composés phénoliques variant, simples (acides phénoliques, anthocyanes, par exemple) ou des substances hautement polymérisées **(Dai et Mumper, 2010)**.

Il est recommandé de travailler sous atmosphère inerte, d'éviter les pH excessifs et de concentrer les solutions extractives à basse température (30°C) une réextraction de la solution aqueuse par des solvants non miscibles de polarité croissante permet de séparer les formes libres, les esters puis les hétérosides **(Bruneton, 1999)**.

Les techniques les plus courantes pour extraire les composés phénoliques utilisent des solvants, organiques ou inorganiques **(Khoddami et al., 2013)**, tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et leurs combinaisons ont été utilisés, pour l'extraction de composés phénoliques à partir de matières végétales, souvent avec différentes proportions d'eau. Sont les plus couramment utilisées. En raison de leur facilité d'utilisation efficacité et large applicabilité en laboratoire **(Dai et al., 2010)**.

De plusieurs procédés classiques et nouveaux tels que l'extraction solide-liquide (SLE), extraction assistée par micro-ondes (MAE), extraction par ultrasons / assistée par micro-ondes (UMAE), fluide supercritique extraction (SFE), extraction sous-critique (SCE) **(Sahin et Samli, 2013)**, extraction par soxhlet et extraction par reflux thermique (HRE) **(Dahmoune et al., 2015)**.

9. Méthodes d'identification des polyphénols :

Les techniques d'identification et de quantification des polyphénols, telles que HPLC-DAD (la chromatographie liquide à haute performance) en fournissant à la fois un temps de rétention et un spectre UV, est suffisant pour une identification positive, et permet généralement de distinguer les différentes classes (**Pereira et al., 2009**).

HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes (DAD) et / ou un détecteur à spectrométrie de masse (LC-MS) est l'outil analytique le plus utilisé pour la quantification des polyphénols, bien que des polyphénols tels que les isoflavones soient parfois dérivés en esters méthyliques et analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou sur colonne en phase normale pour la séparation des procyanidines(**Tso, 2010**).

10. L'activité antioxydante des polyphénols :

10.1 Le stress oxydatif :

Le stress oxydatif peut être défini comme une oxydation intracellulaire excessive due à un déséquilibre de la balance entre les oxydants et antioxydants (**Sies, 1997**). Se présenter quand il y a trop de production des radicaux libres et / ou faible défense anti-oxydation, ces radicaux libres sont des espèces chimiques hautement réactives et instables du fait de la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés (**Azur, 2017**). À cause de leur haute réactivité, Ces espèces cherchent à se stabiliser en prenant un ou plusieurs électrons à une substance voisine, ainsi la molécule attaquée perd son électron et devient un radical libre lui-même, commençant une cascade de réactions en chaîne qui endommage finalement la cellule vivante (**Phaniendra et al., 2015**).

10.2 Effet de stress oxydatif :

Le stress oxydatif peut endommager les lipides, les protéines, les glucides des cellules et des tissus, entraînant un dommage à la membrane, alterne la structure d'ADN et même conduire à la mort cellulaire (**Vladimir-Knežević et al., 2012**). Ce dommage joue un rôle pathologique important dans les maladies

humaines telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires ou les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer (**Kumarappan et al., 2010**).

10.3 Les antioxydants :

Les antioxydants sont des substances chimiques plus ou moins complexes, naturellement présentes dans l'organisme, qui constituent un système de défense *in vivo* (**Basharat, 2015**). Sont des régulateurs de la production des ROS et préviennent les effets délétères, les antioxydants sont un groupe hétérogène composé de systèmes antioxydants endogènes, enzymatiques ou non, de vitamines, d'oligo-éléments ou encore des dérivés du métabolisme secondaire des plantes comme les polyphénols (**Desmier, 2016**). Diverses stratégies antioxydantes ont impliqué : soit l'augmentation de la résistance endogène, Les défenses enzymatiques antioxydantes (par exemple, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, le glutathion réductase et catalase) ou l'amélioration des défenses non enzymatiques (par exemple, le glutathion, vitamines) (**Vladimir-Knežević et al., 2012**).

11. Mécanismes d'action des polyphénols contre le stress oxydatif :

Le nombre de recherches sur l'isolement et les tests d'antioxydants naturels, principalement d'origine végétale, a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. (**Djeridane, 2006**).

Leurs propriétés antioxydantes proviennent de leur potentiel redox qui peut agir en tant que piègeurs de radicaux libres (casser la réaction en chaîne des radicaux libres) chélateurs de métaux et agents d'extinction de l'oxygène singulet (**Mello, 2015**). La structure des composés phénoliques est un déterminant clé de leur balayage radicalaire et l'activité de chélation des métaux, et cela est appelé relations structure-activité (SAR). (**Vladimir-Knežević et al., 2012**).

Les polyphénols peuvent agir en tant qu'antioxydants de plusieurs façons. Les groupes hydroxyles phénoliques sont de bons donneurs d'hydrogène : les antioxydants donneurs d'hydrogène peuvent réagir avec les espèces réactives d'oxygène et d'azote, dans lesquels le radical est stabilisé (**Pereira et al., 2009**).

12. Intérêt thérapeutique et emploi :

Des milliers de plantes biologiquement actives ont été identifiées et utilisées en médecine. Il existe actuellement des centaines de médicaments modernes à base de composés actifs isolés à partir des plantes médicinales **(Zakaryan et al., 2017)**.

Le rôle des polyphénols alimentaires sur la santé humaine a été étudié de manière intensive au cours des 15 dernières années, ces composants bioactifs, consommés d'une alimentation équilibrée contribuent à réduire le risque de maladies chroniques **(Toms-barberan et Andres-lacueva, 2012)**.

Les propriétés biologiques des polyphénols comprennent des effets antioxydants et anti-inflammatoires, aussi possèdent des propriétés antimicrobiennes et anti-cariogènes **(Abdel-Shafy et Mansour, 2017)**. Ils ont été rapportés pour leur efficacité en tant qu'anticancéreux, antibactériens, agents cardioprotecteurs, anti-âge, et dans la protection de la peau **(Tungmunithum et al., 2018)**.

Les polyphénols réduisent l'incidence de certaines maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, les infections, asthme, grâce à la gestion du stress oxydatif **(Lin et al., 2016)**. et suggère un rôle dans la prévention des maladies neurodégénératives et du diabète, ils peuvent empêcher la neurodégénérescence en emprisonnant les radicaux, agissant ainsi comme une action préventive **(Mello, 2015)**. ils agissent en tant qu'anti-oxidants des triglycérides des agents anticholestérolémiques et antiviraux, entre autres, Les composés phénoliques peuvent affecter la croissance microbienne **(Alberto et al., 2006)**.

Par rapport à santé cardiovasculaire, les flavonoïdes peuvent altérer le métabolisme des lipides, inhiber les lipoprotéines de basse densité (LDL) d'oxydation, réduction de la formation de lésions athéroscléreuses, inhibition de l'agrégation plaquettaire, améliorer la fonction endothéliale et réduire la pression du sang **(Vauzour et al., 2010)**.

En particulier, il a également été signalé que les flavonoïdes sont fortement liés à des effets bénéfiques dans de nombreuses études sur l'homme, les animaux et in vitro

Ils agissaient comme des agents anticancéreux via la régulation des voies de transduction du signal de la croissance et de la prolifération cellulaire, la suppression des oncogènes et la formation de tumeurs, en outre une capacité à induire l'apoptose, la modulation de l'activité enzymatique liée à la détoxification, la stimulation du système immunitaire et de la réparation de l'ADN et de la régulation du métabolisme hormonal (**Pereira et al., 2009**).

13. L'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne des polyphénols a fait l'objet de nombreuses études, des centaines de publications pour l'évaluation des propriétés antibactériennes, et antifongiques des polyphénols ont récemment été publiées (**Almajano et al., 2007**).

Une corrélation positive est observée entre leur activité antibactérienne et la teneur en polyphénols totaux des extraits de plusieurs plantes, tels que les olives, les champignons et les extraits de propolis, et du thé vert (**Stuart et Robb, 2013**), contenant une concentration élevée de polyphénols, ont montré une bonne activité antibactérienne contre plusieurs agents pathogènes humains (**Coppo et al., 2014**).

La toxicité phénolique pour les micro-organismes est une activité inhibitrice contre la croissance bactérienne (**Fattouch et al., 2007**). Des modifications de diverses fonctions intracellulaires induites par la liaison hydrogène des composés phénoliques aux enzymes via leurs groupes OH, et une modification de la morphologie fongique (rigidité de la paroi cellulaire et pertes d'intégrité) induite par différentes interactions avec les membranes cellulaires (**Bouarab Chibane et al., 2019**).

Ces composés pourraient interférer avec la physiologie des bactéries par plusieurs modes d'actions tels que : l'inhibition des enzymes microbiens (**Karou et al., 2005**), action sur la membrane cellulaire, modification de la perméabilité des membranes cellulaires ou bien la rupture de la membrane cytoplasmique (**Bouarab Chibane et al., 2019**). Habituellement, ils interfèrent avec les fonctions membranaires ou suppriment certains facteurs de virulence, notamment les enzymes, les toxines, les récepteurs du signal et la formation de biofilm bactérien.

Certains polyphénols ont également un effet synergique avec les antibiotiques, c'est-à-dire les catéchines, qui modulent la résistance aux β -lactames dans des souches multirésistantes telles que *Staphylocoque aureus* et *Escherichia coli* (**Coppo et al., 2014**).

Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et de l'arrangement de la membrane externe (**Daglia, 2012**), par exemple, les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux polyphénols que les bactéries à Gram-positif, en raison des différences trouvées dans la composition de leurs murs (**Cardona et al., 2013**). Les bactéries à Gram négatif possèdent une paroi cellulaire liée à une membrane complexe externe, à savoir l'enveloppe du lipopolysaccharide, qui ralentit le passage des composés phytochimiques (**BouarabChibane et al., 2019**).

14. La résistance des bactéries aux antibiotiques (produit chimique) :

La lutte contre les souches microbiennes est liée à leur pathogénicité et se fait principalement par l'usage d'antibiotiques.

Un antibiotique est une molécule naturelle, synthétique ou semi-synthétique dont le rôle est de détruire des micro-organismes et bactéries (effet bactéricide) ou d'en bloquer la croissance (effet bactériostatique) L'emploi de ces antibiotiques couvre principalement le domaine de la santé humaine et animale, et aussi le domaine agroalimentaire ou environnemental (**Aouni et al., 2013**).

L'utilisation, souvent abusive, des antibiotiques favorise l'évolution des bactéries vers la résistance (**Chebaibi et al., 2011**), qui se traduit par la capacité d'un microorganisme à résister aux effets des antibiotiques entraînant fréquemment des échecs thérapeutiques (**Courvalin, 2007**). grâce à leur flexibilité et plasticité génétique, certaines souches pathogène arrivent à rétablir une multirésistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques à la fois donnant lieu à ce qu'on appelle les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (multidrug resistantes ou MDR)(**Bouyahya et al., 2017**).on mentionne principalement, des espèces appartenant aux familles des Entérobactéries (résistante aux β -lactamines)(**Tani et**

Arlet, 2014).des Pseudomonadacés et des Acinetobacter qui sont devenues de vrais problèmes pour la santé humaine (**Bouyahya et al., 2017**).

14.1. Origines de la résistance :

Il existe deux origines essentielles de la résistance bactérienne :

➤ Naturel, qui représente la résistance intrinsèque, est spécifique d'espèce ou de genre (**Courvalin, 2007**). Due essentiellement à la présence de gènes spécifiques. Chez les bactéries à Gram-, se caractérise par des modifications structurales de la membrane externe (**Bouyahya et al., 2017**).

➤ La résistance acquise est présente seulement dans certaines souches de l'espèce ou du genre. Elle est le résultat des mutations chromosomiques ou bien l'acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme souvent par conjugaison ou transformation (**Courvalin, 2007**). Les résistances bactériennes acquises par mutation chromosomique concernent 10 à 20% des souches isolées en clinique (**Aboya Moroh, 2013**).

14.2. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques :

Selon **benveniste et Davies (1973)**, les mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent être divisés en deux grandes classes :

- 1- Ceux qui modifient un composant cellulaire de telle sorte que l'antibiotique n'atteint pas ou n'interagit pas normalement avec son site cible à l'intérieur de la cellule
- 2- Ceux qui entraînent une modification chimique et inactivation ultérieure de l'antibiotique (synthèse des enzymes qui inhibent l'action des antibiotiques)

Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents, certaines souches bactériennes empêchent les antibiotiques de rentrer dans la cellule bactérienne, et cela grâce à un mécanisme de transport particulier dit pompe à efflux qui leur permet d'exporter les antibiotiques à l'extérieur (**Bouyahya et al., 2017**).

15. Les bactéries étudiées :

15.1 *Escherichia coli* :

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, appartenant à la classe des protéobactéries, il existe au sein du genre *Escherichia*, en plus de l'espèce *E.coli*, cinq autres espèces :

E. albertii, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce présente des caractéristiques biochimiques spécifiques qui permettent de les différencier (**Balière, 2016**). Ce sont des bactéries en forme de bâtonnet. La mieux connue et la plus étudiée est *Escherichia coli* (**Yahiaoui, 2015**).

E.coli est un bacille Gram-négatif, aérobie-anaérobie facultatif (AAF) (**Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012**). Possédant une nitrate réductase et une catalase et qui ne possèdent pas d'oxydase (**Savoie, 2011**). C'est une bactérie immobile ou mobile (**Lee et al., 2009**), avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires (bactérie non exigeante) tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja) sa température optimale de croissance est de 37°C. capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes (**Balière, 2016**).

E.coli est un commensal de la microflore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). (**Mariani-Kurkdjian et al., 2012**) La plupart des souches sont inoffensives, mais certaines acquièrent des entérotoxines ou des facteurs d'adhésion codant pour un ADN plasmidique ou un bactériophage et deviennent pathogènes (**Makvana et al., 2016**). Pouvant être à l'origine de nombreuses infections telles que infections urinaires, septicémies, méningites, péritonites (**Licois, 1992**).

Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées). *Escherichia coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *Escherichia coli* entérotoxinogène (tourista), *Escherichia coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *Escherichia coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *Escherichia coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur). (**Lee et al., 2009**).

15.2 *Klebsiella oxytoca* :

Klebsiella oxytoca (*K. oxytoca*) est une *Enterobacteriaceae* à Gram négatif, aérobies ou anaérobies facultatifs (**Atindehou, 2012**), en forme de bâtonnet cylindrique, de nature non mobile, possédant une capsule de polysaccharide bien visible, qui offre une résistance aux mécanismes de défense de l'hôte (**Kumar Trivedi et al., 2015**).

K. oxytoca est une bactérie opportuniste dans la flore normale de l'intestin d'homme et d'animaux, de l'oropharynx, de la membrane muqueuse et aussi la peau (**Ghasemian et al., 2018**). Elle peut être détecté d'environ 2 à 10% des sujets sains (**Herzog et al., 2014**). Elle est considérée comme un agent pathogène opportuniste, car la plupart des cas infectés par *K. oxytoca* sont asymptomatiques. Cependant, elle est maintenant reconnue comme un agent pathogène clinique important chez les patients hospitalisés, provoquant des maladies nosocomiales néonatales (**Kumar Trivedi et al., 2015**).

Elle est naturellement résistante aux pénicillines du fait de la production d'une bêta-lactamase de classe A, mais elle est en général sensible aux céphalosporines (**Herzog et al., 2014**). Généralement Les espèces de *Klebsiella* sont associées aux infections acquises dans la communauté et à l'hôpital, en particulier chez les patients atteints de maladies immunodéficientes et les patients traités avec des antibiotiques sont plus sujets à l'infection à *K. oxytoca* (**Kumar Trivedi et al., 2015**). Elle affecte plusieurs organes, entraînant une pneumonie et des infections des voies urinaires et de la peau, avec un taux de mortalité élevé si laissé non traité (**Bleich et al., 2008**).

K. oxytoca est la seule espèce parmi *Klebsiella spp* qui sécrète une toxine peptidique de type pentacyclique à faible poids moléculaire appelée tillivaline, associée au développement de symptômes de colite hémorragique (**MohabatiMobarez, 2018**).

15.3 *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus est une bactérie de la division des *firmicutes*, famille des staphylococcaceae, bactérie à Gram positif, aérobie-anaérobie facultatif, immobile, elle a un diamètre moyen de 0,8 à 1 μm (**Bouchard, 2013**). A l'examen microscopique, les cellules apparaissent sous forme de petites baies dont les colonies prennent une couleur dorée, d'où son nom (*Staphylo* : grappe de raisin, *kokkus*: baie, *aureus* : doré) (**Harris et al., 2002**).

Se retrouve chez l'homme principalement dans les muqueuses des voies respiratoires ainsi que sur la peau (**Pexara et al., 2015**). Cette bactérie est commensale chez certains humains, environ 20% des gens sont des porteurs permanents de *S. aureus*, et jusqu'à 60% des gens en sont des porteurs intermittents. *S. aureus* est également présent chez l'animal et possède une excellente capacité à survivre sur des surfaces inertes (**Chagnon, 2014**).

S. aureus n'est pas seulement une bactérie commensale, c'est aussi un pathogène opportuniste, le plus souvent rencontré dans les pathologies infectieuses (furoncle, panaris, abcès angines.) il est l'un des principaux responsables des infections nosocomiales, peut aussi être responsable des intoxications alimentaires (**Harris et al., 2002**). Résultantes d'un équipement riche, et très variable en termes de facteurs de virulence (**Bouchard, 2013**), parmi ces toxines les super antigènes qui causent des maladies uniques telles que syndrome de choc toxique et scarlatines taphylococcique (**Vaudaux et al., 1995**). Dans les cas où *S. aureus* gagne accès au système sanguin, il peut se disséminer très rapidement dans le corps humain et engendrer des complications graves, comme un choc septique, les cas non traités sont souvent mortels. Il est également responsable de nombreuses complications dans les cas de fibrose kystique (**Chagnon, 2014**).

S. aureus a acquis une résistance à plusieurs antibiotiques, et il est également efficacement adapté aux introductions de nouvelles molécules en pratique médicale courante, une autre préoccupation de santé publique est la présence des souches résistantes à la méthicilline (**Pexara et al., 2015**), et de nombreux mécanismes de résistance sous-tendent cette adaptation, telles que des mutations ponctuelles ou l'acquisition de séquences exogènes d'ADN, intégrées ou non au chromosome, de type transposon, intégrons et gènes cassette (**Madec et Haenni, 2010**).

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antimicrobienne, vis-à-vis des souches bactériennes (Gram positives et Gram négatives) des extraits phénoliques des feuilles de *Cupressus sempervirens L.*

Avant de procéder à l'évaluation de leurs activités antibactérienne, un dosage pour quantifier globalement les composés polyphénoliques présentes dans les extraits, a été effectué en suivant la méthode de Folin-Ciocalteu. La méthode de diffusion sur disque (antibiogramme) a été utilisé pour évaluer la sensibilité des bactéries aux extraits préparés à partir des feuilles de *Cupressus sempervirens L.*

1. Matériels :

1. 1 Matériel végétal :

Les feuilles du *Cupressus sempervirens L.* utilisés dans cette étude ont été récoltés durant le mois de décembre 2018, au niveau de département de biotechnologie, université de Blida 1. Pour ne pas endommager l'arbre, nous avons choisi des feuilles de couleur bien verte qui se présente à l'extrémité des rameaux.

Selon l'authentification réalisés par madame Bradea Maria Stella, Professeur au niveau de département des biotechnologies - université blida 1. Il s'agit de l'espèce *Cupressus sempervirens L.* largement répandus dans le nord de l'Algérie.

Cette étude a été réalisé pendant un duré de trois mois au niveau de laboratoire de recherche scientifique de phytopharmacie / département biotechnologie - université de blida 1-

Tous produits, matériels de laboratoire et appareils utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont présentés dans le tableau (annexe 1).

1. 2. Les souches bactériennes :

Les souches bactériennes utilisés dans cette étude sont des bactéries pathogènes d'origine humain, de catégorie Gram-négative et Gram-positive, isolés cliniquement au niveau d'hôpital el Qatar Bab EL Oued -Alger- Leur prélèvement et leur isolement se faisaient en respectant les normes d'hygiène.

Le choix de ces souches a été porté sur la base de leur importance dans le domaine clinique (Infections...etc.) et leur multirésistance envers les antibiotiques chimiques, pour la réalisation de cette partie de notre travail, les tests antibactériens.

Table 1 : Les souches bactérienne utilisées

Bactéries à Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i>
Bactéries à Gram négative	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>

2. Méthodes :

2. 1. Extraction des polyphénols :

L'objectif de cette extraction est de libérer les polyphénols présents dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion. Ces derniers sont extraits par extraction solide-liquide en utilisant l'eau distillée comme solvant d'extraction, et d'autres solvants organiques : l'acétone, méthanol, éthanol, sont des solvants d'extractions les plus communément utilisés.

2. 1.1 séchage :

Après la récolte, les échantillons ont été bien nettoyés (débarrassé des débris) et établi sur papier. Le matériel végétal est séché à l'abri de la lumière, à une température ambiante, et nous avons versées les échantillons chaque trois jours pour éviter tous développement de moisissures, pendant 20 jours en moyenne (Figure : 7).



Figure 7 : séchage du matériel végétal.

2. 1.2. Broyage :

Les extrémités des feuilles dans leur nature solide et partiellement imperméable, ne peuvent pas être analysées directement. Celles-ci doivent au préalable être broyées en une fine poudre à l'aide d'un mixeur électrique, cette poudre est ensuite, conservées dans des bocaux en verre, fermés, stockée au sec et dans le noir afin d'éviter toute photo-dégradation des composés. (Figure :

2. 1.3. Préparation des extraits bruts :

Nous avons réalisé une macération séparée de chaque solvant organique : méthanol (99,8%), éthanol (96%) et acétone (99,5%).

A l'aide d'une balance, une quantité de 20 g de la poudre du matériel végétal est mélangée avec 320 ml du solvant organique + 80 ml d'eau distillée dans un bécher de 1000ml, Le mélange a été laissé agiter pendant 24h à une température ambiante, en utilisant un agitateur à hélice.

On a utilisé le papier aluminium pour éviter tout contact avec la lumière, afin d'éviter la dégradation des polyphénols.

Le mélange a été filtré en utilisant du papier filtre (Wattman), après filtration, les solutions obtenues (méthanolique, éthanolique et acétonique), sont évaporées à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (extraction solide-liquide) jusqu'à évaporation complète du solvant organique (annexe).

Les résidus secs pesés sont repris par 15ml du méthanol pour l'extrait méthanolique, 15 ml d'éthanol pour l'extrait éthanolique et 10ml d'acétone pour l'extrait acétonique.

2. 1.3 Extraction par l'eau distillée :

En utilisant une balance de précision, 37,5 g de la poudre du matériel végétal est pesé, puis mélangé avec 350ml d'eau distillée dans une Erlenmeyer, le mélange est mis sous agitation pendant 72H (3 jours) à l'aide d'un agitateur magnétique. Ce dernier est centrifugé à (3000 tours) pendant 15 minutes et le surnageant est récupéré et séché à l'étuve à 60°C jusqu'à évaporation totale de l'eau distillée.

Les résidus secs pesés sont repris par 15 ml d'eau distillée.

2. 2. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie :

- **Principe :**

Le dosage des polyphénols se fait par la méthode de Folin-Ciocalteu (Est un acide de couleur jaune, qui permet de quantifier globalement les composés phénoliques. En milieu alcalin, les polyphénols réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en oxyde de tungstène et de molybdène de couleur bleue. L'intensité de cette couleur bleue renseigne sur le contenu en polyphénols totaux dans le mélange (**Dewanto et al., 2002**). Il possède une absorption maximum aux environs de 750-760 nm. Elle est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques oxydés (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Dans des tubes à essai, un volume de 250 µl d'extrait végétal aqueux est dilué avec 2,5 ml de l'eau distillée, après centrifugation et récupération de surnageant de la solution préparée, une prise de 200 µl d'extrait est mise avec 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué avec de l'eau distillée) plus 800 µl de bicarbonate de sodium (NaHCO₃)

à concentration de (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après agitation et repos du mélange pendant 5 min, l'absorbance est mesurée à 760nm, à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux. Avant la lecture d'absorbance de chaque extrait nous avons étalé avec le blanc, dans ce cas là c'est le solvant organique utilisé.

Une solution d'acide gallique a été préparé à concentration de 200 µg/ml et une dilution binaire a été effectuée, afin de réaliser une droite d'étalonnage avant l'analyse avec de l'acide gallique (0, 12.5, 25, 50 , 100 et 200 µg/ml).

La concentration en polyphénols est estimés à partir d'une équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage réalisé à base d'acide gallique, dont $y=0,0094+0,2317$

Les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits préparés sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait.

2. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne :

- **Principe** : Méthode de diffusion sur disques (antibiogramme)

L'antibiogramme ou bien la méthode des disques est une méthode de diffusion des produits à tester à partir d'un disque de papier (sur lequel on dispose une quantité donnée d'extrait végétal) qui permet de mesurer qualitativement le pouvoir antibactérien des huiles essentielles ou bien des extraits végétaux.

L'extrait diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration faisant apparaître une zone claire autour du disque, plus la zone d'inhibition est grande plus grande est la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'extrait étudié. (Aouni et al., 2013).

- **Mode opératoire** :

L'ensemencement : Méthode standard de Kirby et Bauer

En premier temps, le milieu de culture (Mueller-Hinton) a été liquéfier au bain-marie à 60°C. ensuite il a été préalablement coulé dans des boîtes de Pétri stérile (4mm d'épaisseur), et laissé jusqu'à solidification.

A l'aide d'un écouvillon, la culture bactérienne est ensemencée à la surface d'une gélose de Mueller-Hinton (MH), l'écouvillon doit passer sur toute la surface de manière à obtenir un ensemencement homogène sur la moitié de la boîte de pétri, ensuite nous avons tournées la boîte et ensemencé la 2ème moitié de la même manière.

Des disques stériles de 6mm de diamètre de papier Wattman sont déposés à la surface de la gélose (à 15 mm minimum de la périphérie de la boîte de manière que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas), ces derniers ont été imprégnés avec l'extraits à tester. On a 4 disques imprégné de 25 µl d'extrait végétal préparés, dont 3 à partir des solvant organique (extrait éthanolique, méthanolique, acétonique) et un celui de l'eau distillée, alors que 1 disque serve de témoin.

Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures, après incubation, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile.

Le test a été répéter 3 fois afin de confirmer les résultats par des analyse statistiques.

- **Lectures :**

Nous avons mesuré avec précision les diamètres des zones d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle graduée et un logiciel Digimizer

Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne sont classés en 4 classes (Tableau 2).

Tableau 2 : Degré de sensibilité des souches microbiennes selon le diamètre de la zone d'inhibition (**Moreira et al., 2005**)

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

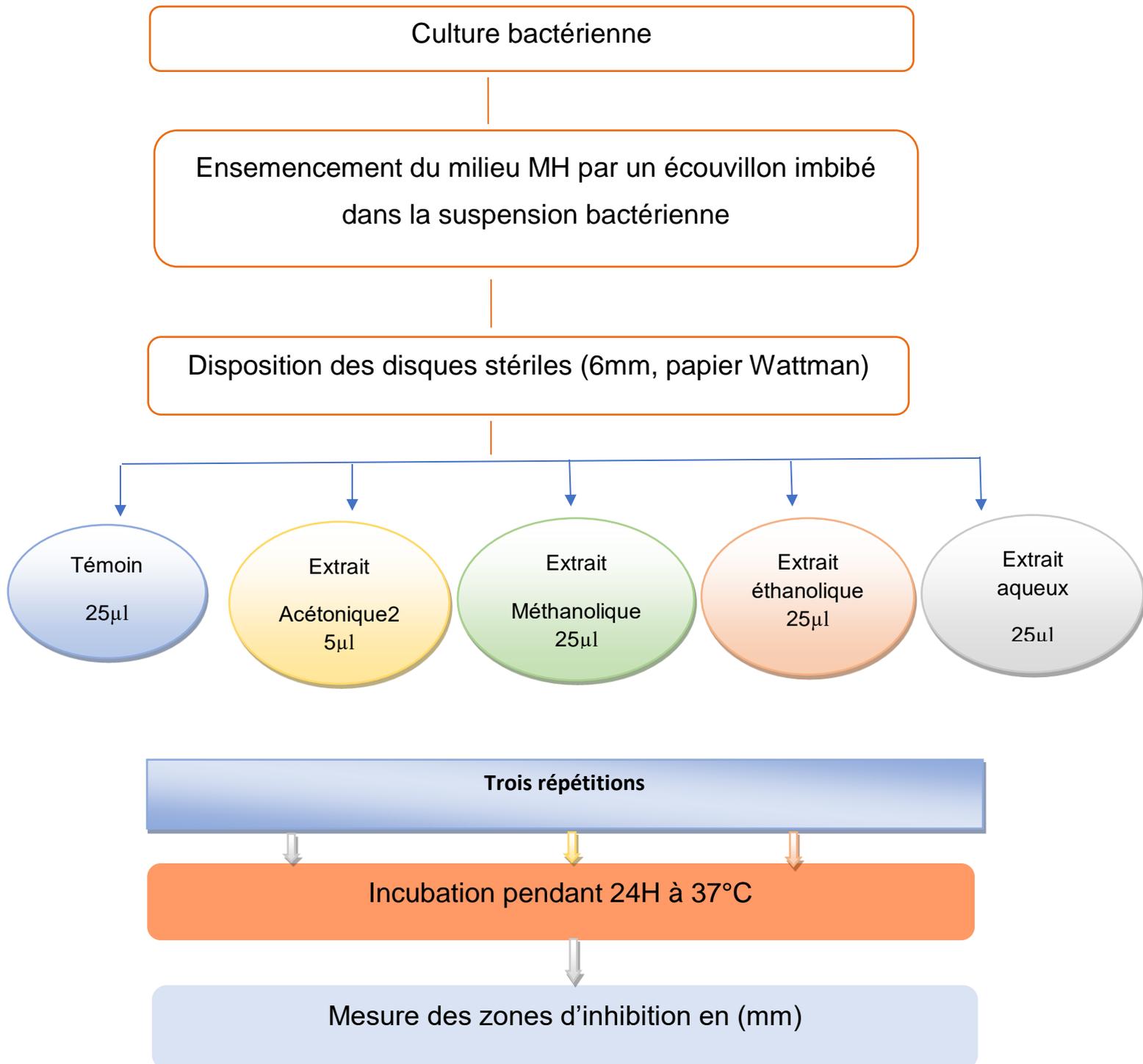


Figure 8 : Etapes de réalisation du test d'activité antibactérienne.

- **Analyse statistique :**

Trois répétitions ont été réalisées pour chaque extrait analysé et les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart type. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2016.

Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel ANNOVA et la différence a été considérées significatives à (**P < 0,05**).

1. Teneurs en polyphénols totaux des extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* :

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits : acétonique, méthanoliques, éthanolique et aqueux des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* ont été déterminées par la méthode colorimétrique, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

La concentration totale en polyphénols est estimée à partir des courbes d'étalonnage réalisé à base d'acide gallique (figure :9) et est exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait). Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme (figure : 10)

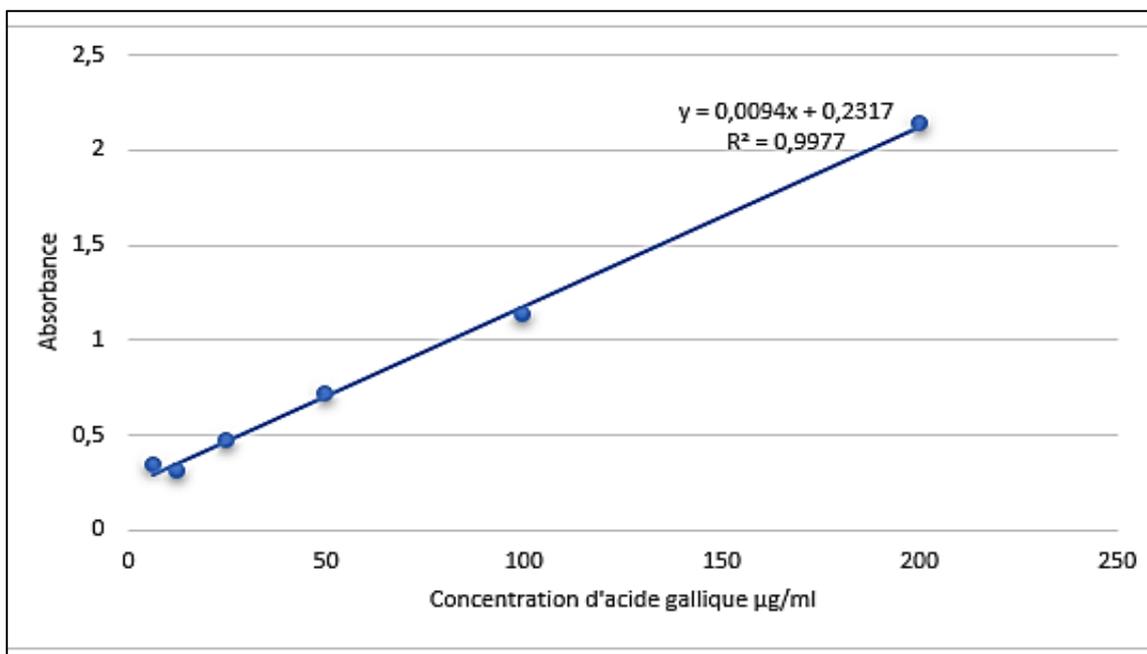


Figure 9 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

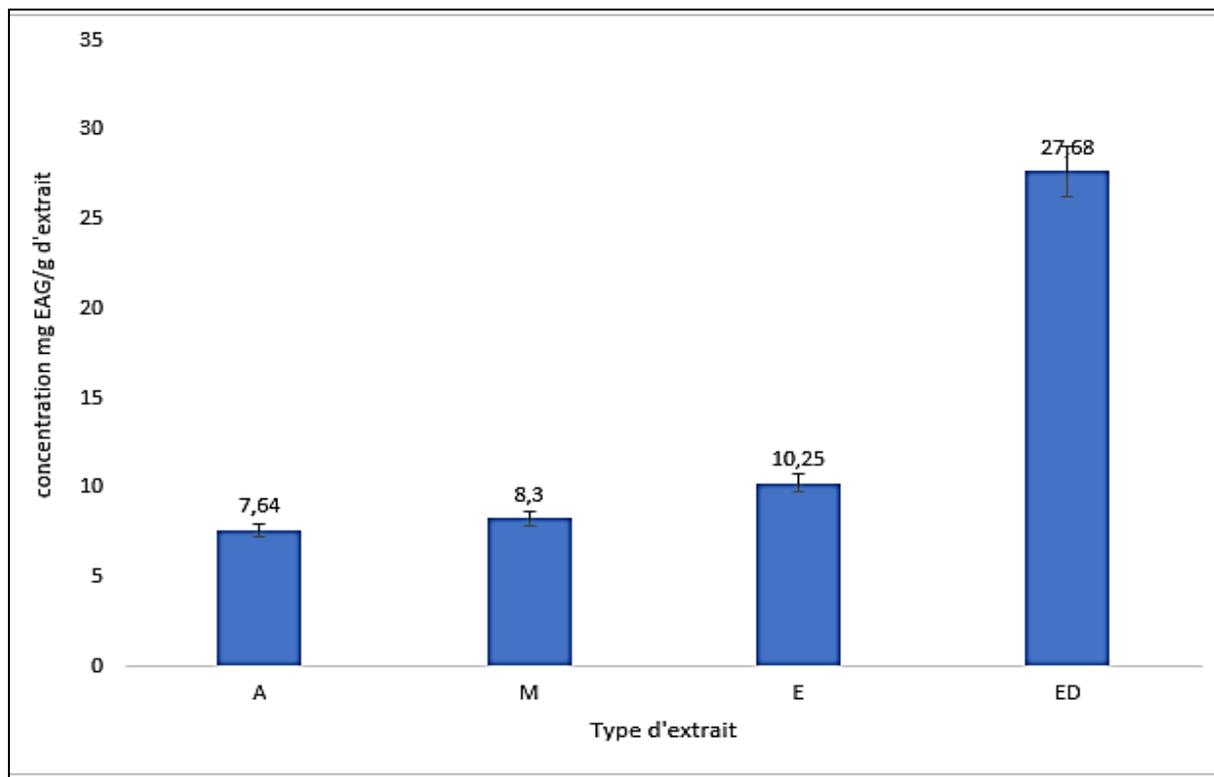


Figure 10 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens* L. (les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type) (**A** : extrait acétonique. **M** : extrait méthanolique. **E** : extrait éthanolique. **ED** (eau distillée) : extrait aqueux).

En général, tous les extraits de cette étude ont présenté des teneurs en composés phénoliques. Les résultats d'histogramme (figure : 10) montrent que l'extrait aqueux est le plus riche en polyphénols totaux, (27,68 mg Eq AG/g d'extrait) suivi par l'extrait éthanolique à 96% avec une teneur de $10,25 \pm 0.6$ mg Eq AG/g d'extrait, tandis que des teneurs faibles sont enregistrées dans l'extrait méthanolique à 99,8% et l'extrait acétonique à 99,5% ($8,3 \pm 0.07$ mg Eq AG/g d'extrait ; $7,54 \pm 0.06$ mg Eq AG/g d'extrait respectivement).

2. Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne des extraits : méthanolique, éthanolique, acétonique et aqueux (eau distillée) des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* a été évaluée in vitro, contre 3 souches bactériennes de Gram + (*Staphylococcus aureus*) et Gram - (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*), par la méthode des disques.

Les résultats de l'effet inhibiteur des extraits préparés envers les bactéries sont repris ci-dessous. Dans ces histogrammes sont inclus les valeurs des zones ou diamètre d'inhibition (DI) en (mm), en moyenne de 3 répétitions pour chaque extrait (méthanolique, éthanolique, acétonique et aqueux) pour les 3 souches testés.

Rappelons que lorsque :

D=9 : Souche résistante

$10 \leq D \leq 14$: Souche sensible

$15 \leq D \leq 19$: Très sensible

D>20 : Extrêmement sensible

2. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur *Escherichia coli* :

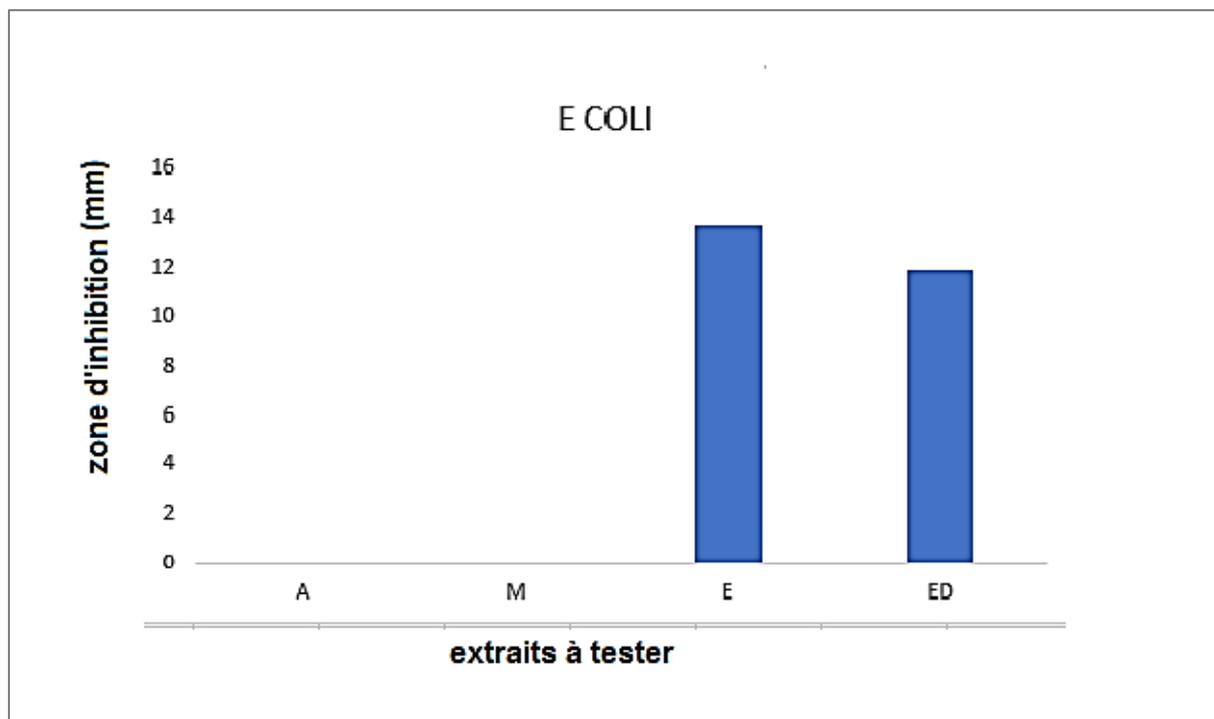


Figure 11 : effet antibactérien des 4 extraits préparés sur *E. coli*.

(**E.COLI** : *Escherichia coli* **A** : extrait acétonique. **M** : extrait méthanolique. **E** : extrait éthanolique. **ED** (eau distillée) : extrait aqueux).

D'après les résultats de la figure (19), on constate que *E. coli* s'est montrée sensible vis-à-vis l'extrait éthanolique à 96% et l'extrait aqueux avec une zone d'inhibition de 13,76 mm et 11,96 mm respectivement ($10 \leq DI \leq 14$) par contre aucune activité n'a été observée avec les autres extraits, méthanolique et acétonique.

2. 2. Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur *Klebsiella oxytoca* :

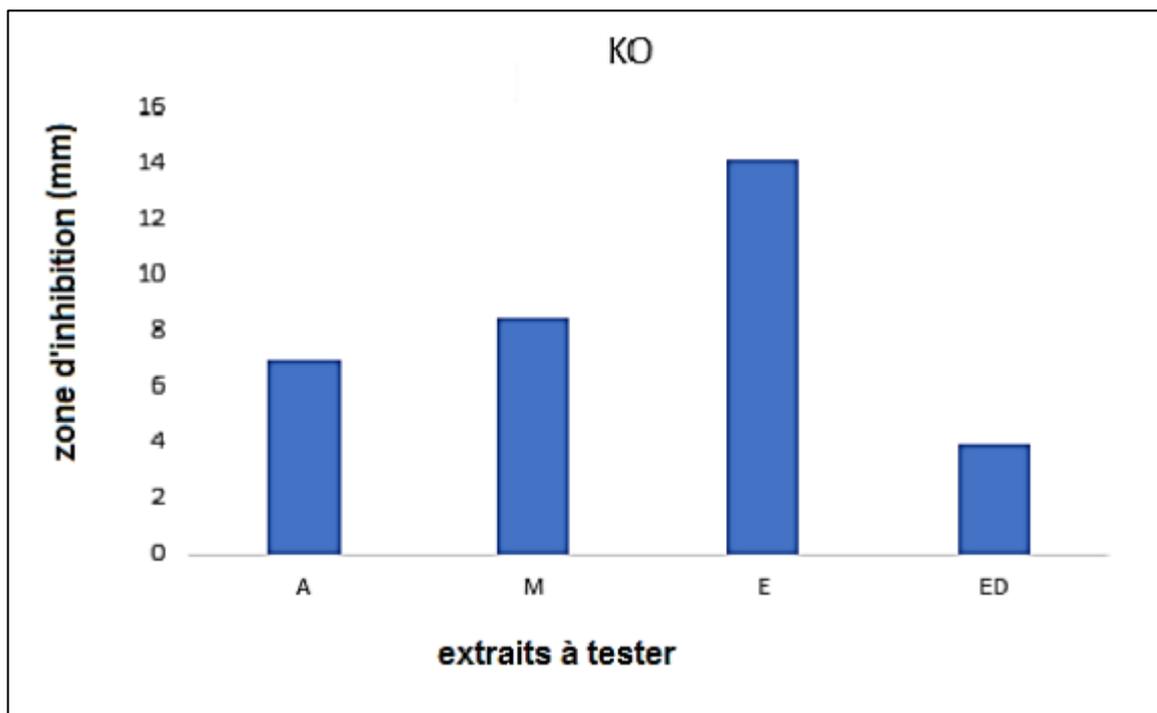


Figure 12 : effet antibactérien des 4 extraits préparés sur *Klebsiella oxytoca*.

(**K.O** : *Klebsiella oxytoca* **A** : extrait acétonique. **M** : extrait méthanolique. **E** : extrait éthanolique. **ED** (eau distillée) : extrait aqueux)

D'après la figure (12), on remarque que la souche à Gram-négative *Klebsiella oxytoca* a montré une sensibilité la plus élevée vis à vis l'extraits éthanolique, avec une zone d'inhibition de 14,15 mm ($10 \leq DI \leq 14$) Cependant elle s'est montrée résistante vis-à-vis les autres extraits, dont la plus faible valeur appartient à l'extrait aqueux avec une zone d'inhibition de 3,90 mm, et nous avons noté des zones d'inhibitions de 8,51mm et 7mm pour l'extrait méthanolique et acétonique respectivement (DI=9 : Souche résistante)

2. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur *Staphylococcus aureus* :

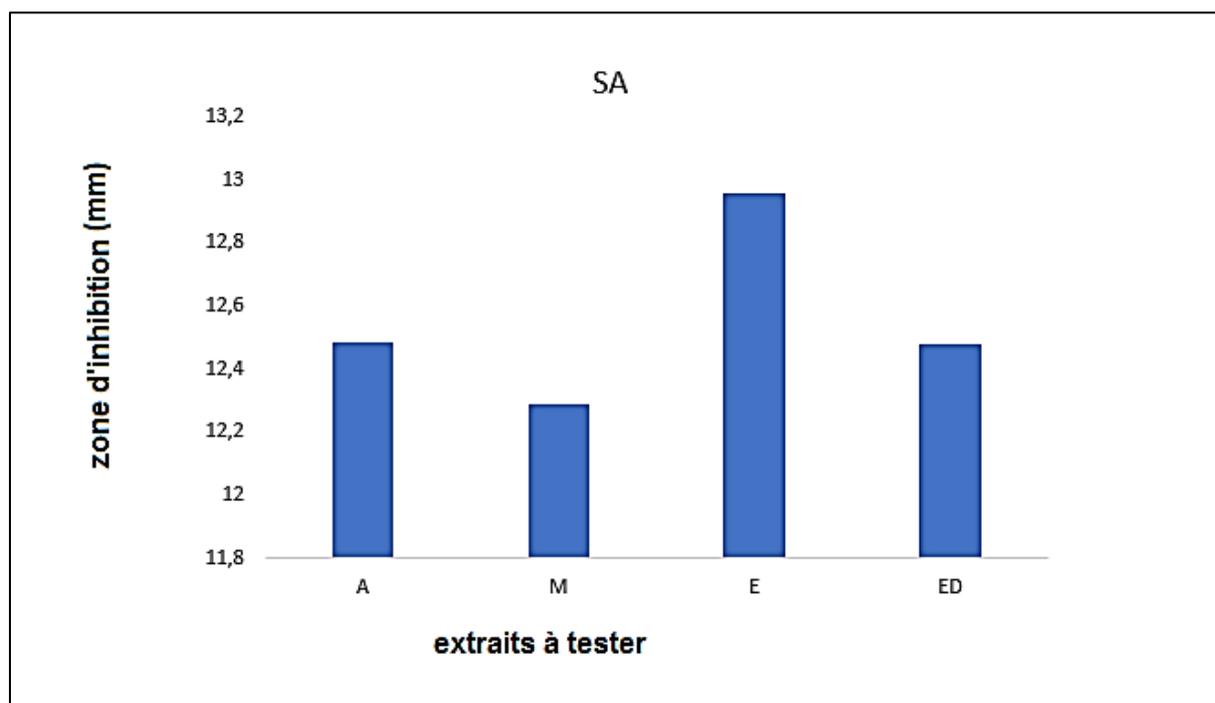


Figure 13 : effet antibactérien des 4 extraits préparés sur *staphylococcus aureus*.

(**A** : extrait acétonique. **M** : extrait méthanolique. **E** : extrait éthanolique. **ED** (eau distillée) : extrait aqueux

Selon l'histogramme, Nous constatons une sensibilité remarquable de la souche testée vis-à-vis l'extrait éthanolique à 96%, méthanolique 99,8%, acétonique à 99,5% et l'extrait aqueux (eau distillée) , on note que l'extrait éthanolique possède un effet antibactérien le plus élevé, par sa zone d'inhibition de 12,95 mm, suivi par l'extrait méthanolique avec une zone d'inhibition de 12,29 mm, et 12,48 mm pour les extraits aqueux et acétonique ($10 \leq DI \leq 14$).

2. 4. Evaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur toutes les souches bactériennes :

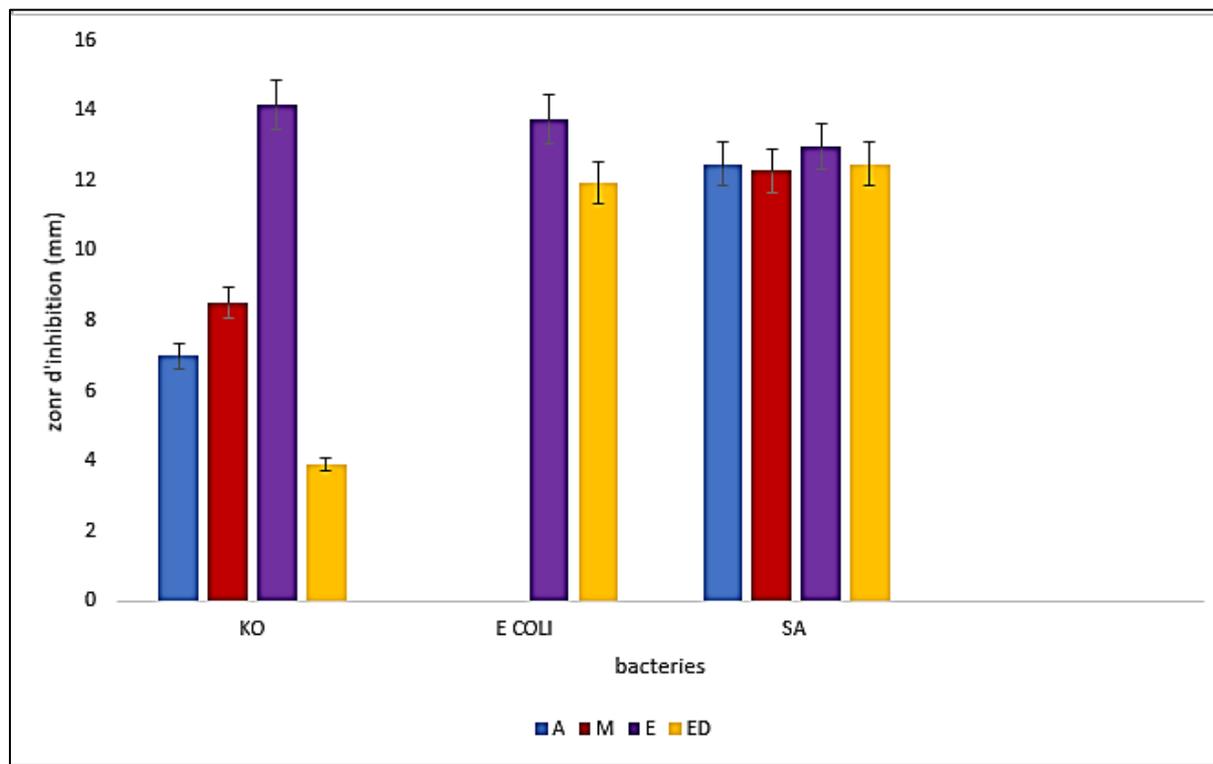


Figure 14: l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* sur toutes les souches testées. Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne \pm l'écart type.

(**A** : extrait acétonique. **M** : extrait méthanolique. **E** : extrait éthanolique. **ED** (eau distillée) : extrait aqueux ; **KO** : *Klebsiella oxytoca* ; **E.coli** : *Escherichia coli* ; **SA** : *Staphylococcus aureus*.)

A la lecture des résultats obtenus on remarque que les extraits végétaux des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* ont présentés une activité inhibitrice importante sur l'ensemble des souches testées, dont l'extrait éthanolique montre une activité inhibitrice la plus élevée contre les 3 souches, cependant l'extrait méthanolique et acétonique ne présentent aucun effet inhibiteur sur la souche *E.coli*.

On note également une activité antibactérienne plus prononcée sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif.

L'activité antibactérienne des extraits montre que *Staphylococcus aureus* possède un potentiel de sensibilité plus élevé par sa zone d'inhibition que celui de *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca*.

2. 5. l'activité antibactérienne des extraits sur les trois souches bactériennes : (analyse en composant principale)

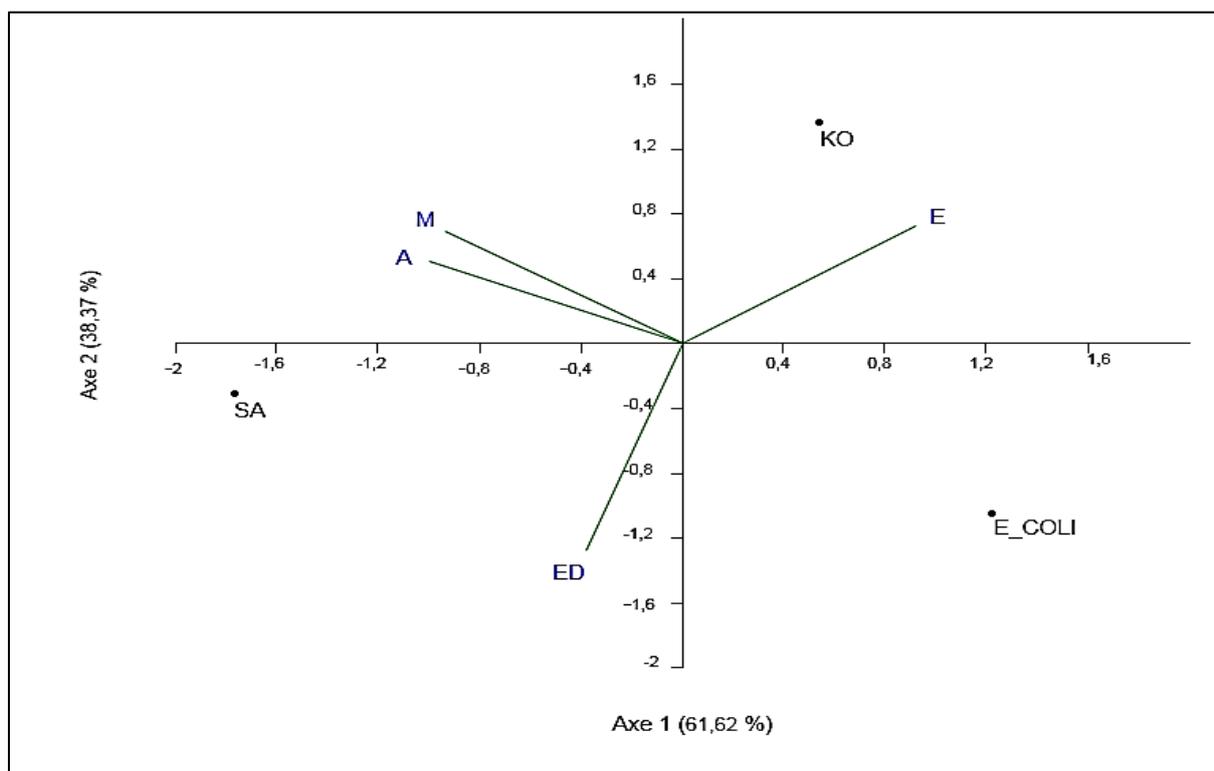


Figure 15 : Analyse en composantes principales (A.C.P) de l'activité antibactérienne des différents extraits contre une souche à Gram-positif (*S.aureus*) et deux souches à Gram-négatif (*E.coli* et *K. oxytoca*).

(**A** : extrait acétonique. **M** : extrait méthanolique. **E** : extrait éthanolique. **ED** (eau distillée) : extrait aqueux ; **KO** : *Klebsiella oxytoca* ; **E.coli** : *Escherichia coli* ; **SA** : *Staphylococcus aureus*).

L'analyse en composantes principales (A.C.P.), effectuée avec le logiciel PAST, à partir des valeurs des zones d'inhibition des différents extraits des feuilles de

Cupressus sempervirens L. est satisfaisante pour le paramètre étudié dans la mesure où plus de 80% de la variance sont exprimés sur les 2 premiers axes (Figure 15) .

La projection des valeurs des zones d'inhibition sur le premier axe 1 (61,62%) montre que l'extrait éthanolique est plus proche à *E.coli* et *K.oxytoca* accusent une corrélation positive entre le contenu en polyphénols et l'activité inhibitrice de la croissance bactérienne contre *E.coli* et *K.oxytoca*, cette activité est traduits par des zones d'inhibition mesurés après 24h d'incubation. Une corrélation négative établie affiche nettement l'effet inhibiteur des deux extraits méthanolique et acétonique sur *K.oxytoca* et *S.aureus*, car on remarque toujours que les deux extraits méthanolique et acétonique sont proche à *S.aureus* dans le coté négative, et *K.oxytoca* dans le coté positive , on note aussi l'effet inhibiteur d'extrait aqueux (eau distillée) sur *S.aureus* et *E.coli*.

La projection des mêmes données à travers le deuxième axe (38, 37%) montre un effet inhibiteur différent entre les différents extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* contre les trois souches testés, ou les extraits éthanolique, méthanolique et acétonique présentent une activité antibactérienne claire sur *K.oxytoca* et *S.aureus*. La corrélation négative montre l'activité inhibitrice d'extrait aqueux (eau distillée) contre *E.coli* et *S.aureus*.

2. 6. Etude comparée de l'effet antibactérien des différents extraits sur les trois souches bactériennes

L'analyse de la variance du test d'ANOVA reportés sur la figure (16) présentent une différence significative entre les extraits préparés à partir des feuilles de *Cupressus Sempervirens* et leurs activité antibactérienne. Etant donné que la p-value calculée est inférieure au niveau de signification $\alpha=0,05$ ($F=4,141$; $P=0,006$; $P<0,05$)

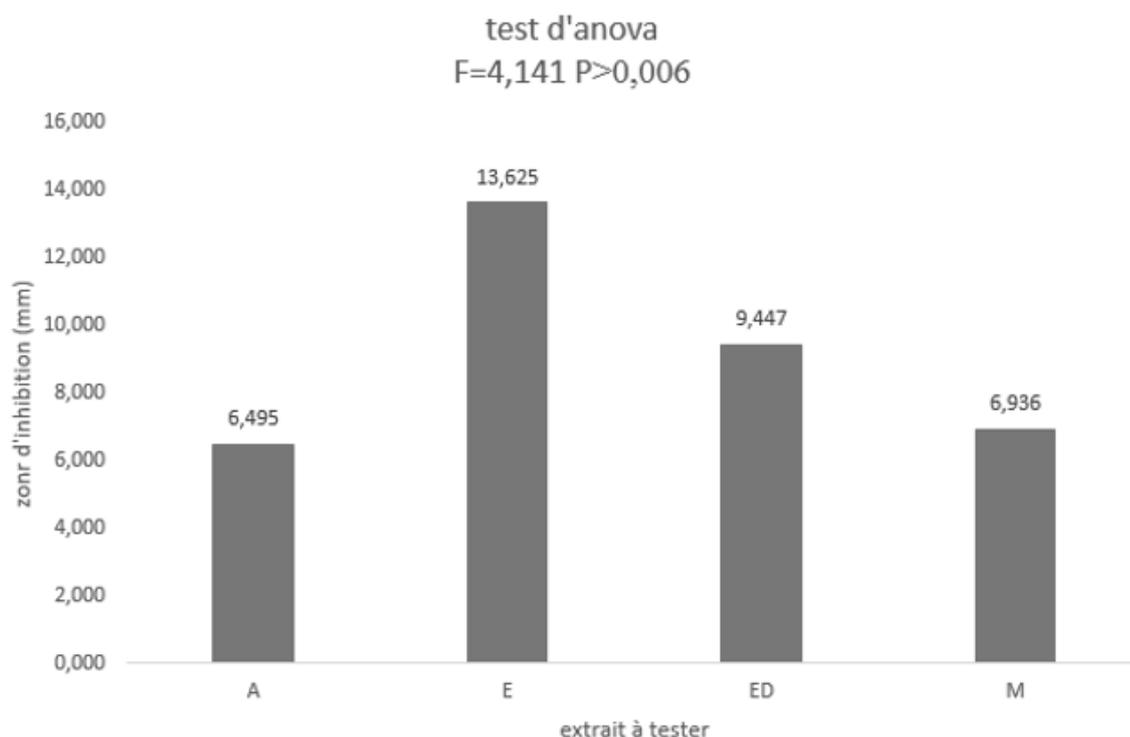


Figure 16 : effet comparé par le test d'ANOVA pour l'ensemble des bactéries.

(**A** : extrait acétonique. **M** : extrait méthanolique. **E** : extrait éthanolique.
ED (eau distillée) : extrait aqueux)

L'analyse comparative des moyennes confirme les résultats précédentes, le test d'ANOVA montre que l'extrait éthanolique possède une activité inhibitrice vis-à-vis des souches testées, dont l'extrait éthanolique avec une zone d'inhibition la plus élevée avec un diamètre de 13,62 mm suivi par l'extrait aqueux avec un diamètre de 9,44 mm cependant les extraits méthanolique et acétonique présentent des zones d'inhibition plus faibles par rapport aux deux extraits précédents, avec un diamètre de 6,93 mm et 6,49 mm respectivement.

Donc nous constatons que l'effet inhibiteur de l'extrait éthanolique sur l'ensemble des bactéries est important avec un diamètre de 13,62 mm, alors que les autres extraits, méthanolique, acétonique et aqueux présentent une activité antibactérienne modérée.

1. Dosage des polyphénols totaux :

L'étude quantitative des différents extraits au moyen des dosages spectrophotométriques, en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu, a donné différentes valeurs entre les extraits en la teneur en polyphénols.

Ce rendement est influencé par plusieurs facteurs comme la température, la méthode d'extraction, la durée d'extraction, le type du solvant utilisé, au fait que la solubilité des composés phénoliques est influencée par le solvant d'extraction (Tsao, 2010).

Une autre étude réalisée par Boudjema (2017), sur les feuilles de *Cupressus sempervirens L.* a donné des valeurs allant de $08,70 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{mg}$ Eq AG/ g d'extrait. En utilisant l'éthanol et le méthanol comme solvant d'extraction, la plus faible concentration en phénols a été mesurée dans des extraits à l'acétate d'éthyle.

2. Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne des différents extraits éthanolique, acétonique, méthanoliques et aqueux (eau distillée), des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* a été évaluée in vitro par la méthode des disques (technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton), qui a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des bactéries à Gram-positif et Gram-négatif.

En vue d'ensemble, les trois bactéries ont montré une certaine sensibilité, vis-à-vis des quatre extraits étudiés. Les zones d'inhibitions les plus élevées sont obtenues par l'extrait éthanolique (13,62 mm) on peut déduire que l'éthanol était le meilleur solvant d'extraction dans cette étude.

L'extrait éthanolique et l'extrait aqueux (eau distillée) étaient actifs contre toutes les souches bactériennes, par contre l'extrait méthanolique et acétonique n'ont aucun effet inhibiteur sur la bactérie à Gram-négatif *Escherichia coli*, on note une grande résistance de cette bactérie à ces deux extraits. Nous pouvons dire que c'est une forme d'adaptation de la souche d'*Escherichia coli* aux deux

extraits, grâce à l'existence des mécanismes naturels de résistance, à cette introduction, **(Courvalin, 2007)**.

Dans notre étude l'effet le plus élevé est obtenu par l'extrait éthanolique sur *S.aureus* qui est traduit par un diamètre de 12,53 mm, ces résultats sont conformés à ceux obtenus dans une autre étude par **Zhang et al. (2012)** Ils ont trouvé que l'activité antimicrobienne d'extrait éthanolique des cônes de *Cupressus sempervirens L.* a montré une activité puissante contre la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*.

Cependant l'effet inhibiteur sur *E.coli* et *K.oxytoca* a révélé une zone d'inhibition de 6,43 mm et 8,39 mm respectivement, c'est-à-dire l'activité antimicrobienne de nos extraits était plus prononcée contre la bactérie à Gram-positif (*Staphylococcus aureus*) que contre les bactéries à Gram-négatif (*Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca*).

Selon **Nikaido (2003)**, cette sensibilité peut être due à la différence dans les couches externes des bactéries Gram-positive et Gram-négative. Ces derniers possèdent une couche additionnelle, une membrane externe qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules, Ceci est en totale adéquation avec la majorité des travaux antérieurs **(Amara et al, 2017)**.

Nos résultats sont similaires à ceux indiqués par **Boudjemaa (2017)**, Ils ont étudié Les propriétés antibactériennes des extraits à l'acétate d'éthyle des feuilles de *C. sempervirens* in vitro, contre 6 souches cliniques et de référence sur la base de deux essais : la méthode de diffusion par puits et la méthode de dilution en gélose. Ils ont trouvé que *Cuperssus sempervirence* a agi en tant qu'agent antibactérien à la fois contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, en présentant des valeurs de DI allant de 10,4mm jusqu'à 12,4mm.

Il a été intéressant de tester l'effet inhibiteur des extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* car plusieurs travaux ont été consacré à l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des plusieurs partie de la plante du *C.sempervirens*, rarement des extraits par des solvants organiques. Nos résultats

sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux. En effet, l'activité antimicrobienne de l'HE de *C. sempervirens* est attribuée (**Amara et al, 2017**).

Chanegriha et al (1998), ont trouvés que l'huile essentielles de *cupressus smepervirens* L. d'Algérie présente une activités antibactérienne in vitro contre des bactéries à Gram-positive et Gram-négative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*) dont La bactérie à Gram-positif est plus sensible que la levure et beaucoup plus que les bactéries à Gram-négatif.

Les mêmes résultats ont été signalés par **Boukssaim et al (2013)**, ce qui concerne l'effet inhibiteur des H.E des cônes des cyprès contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilus*.

Ibrahim et al (2009), démontrent une activité antibactérienne remarquable des H.E des feuilles de *C.sempevirrens* contre des bactéries à Gram-positive et Gram-négative, dont *Escherichia coli* n'a pas du tout été inhibée.

Cette étude a montré d'intéressantes propriétés antibactériennes en particulier sur la bactérie à Gram-positive *Staphylococcus aureus*. Cette activité varie selon les souches testées et selon les solvants d'extraction (**Machiex et al, 2005**). Mais aussi le climat, la nature du sol, la zone géographique sont parmi les principaux facteurs qui influent sur la composition et la quantité en métabolites secondaires **Chanegriha et al (1998)**.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne in vitro, des extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens* L. vis-à-vis des souches bactériennes, d'origine pathogène à Gram positif et à Gram négatif.

Dans ce but une extraction solide-liquide a été effectuée en utilisant l'eau distillée et trois solvants organiques (éthanol, méthanol, acétone).

Les résultats des différents dosages des polyphénols totaux, ont montré une teneur en polyphénols totaux dans l'ensemble des extraits, dont l'extrait aqueux présente une teneur la plus élevée de ($27,68 \pm \dots$ mg Eq AG/g d'extrait). On peut dire que l'eau distillée était le meilleur solvant d'extraction, dans cette étude suivie par l'éthanol.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, les extraits ont exhibé une appréciable activité vis-à-vis *S.aureus*, dont l'extrait éthanolique montre une activité inhibitrice la plus élevée contre les trois souches testés, cependant l'effet inhibiteur sur *E.coli* et *K.oxytoc* a signifié une activité un peu modéré des extraits préparés.

Dans cette perspective et dans le but de compléter cette étude qui est préliminaire :

- Il serait intéressant de procéder à une identification et purification des extraits des feuilles de *Cupressus sempervirens* L. en utilisant diverses techniques chromatographiques. (HPLC : chromatographie en phase liquide à haut performance...).
- Il serait également intéressant d'évaluer l'activité antibactérienne des extrait d'autre partie d la plante (cônes, écorce, racines, graine..) ainsi celui de l'huile essentielles de *Cupressus sempervirens* L.
- Développer une formulation des extraits pour améliorer leur effet et les mieux conserver.

➤ Dans le cadre d'application pharmacologique et industriels, des études plus profondes sur d'autres activités biologiques (anti-oxydante, antivirale, anti-inflammatoire et antifongique...) s'avèrent aussi très importantes à réaliser.

Chapitre 1 :

Partie bibliographique

Chapitre 2 :

Matériels et Méthodes

Chapitre 3 :

Résultats

Chapitre 4 :

Discussion

Références bibliographiques

Résumé

Introduction

**Conclusion
&
Perspective**

- **Abdel-Shafy H. et Mansour M.S.M.**, 2017 - Polyphenols: Properties, Occurrence, Content In Food and Potential Effects. *Environ. Sci. & Engg, Toxicology*, Edition, volume 06 (11) lieu Egypt, pp.232 – 261. [En ligne] Disponible sur https://www.researchgate.net/publication/313638203_Polyphenols_Properties_Occurrence_Content_in_Food_and_Potential_Effects (consulter le 14 Avril 2019).
- **Aboya Moroh J.L.**, 2013 - Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morindamorindoides. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale – Brest.
- **Achat S.**, 2013- *polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques*. Université d'Avignon.
- **Agostini-Costa T., Vieira R.F., Bizzo H., Silveira D. et Gimenes M.**, 2012 - Secondary Metabolites, Chromatography and Its Applications, Dr. Sasikumar Dhanarasu (Ed.), Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics
- **Alam M.A., Subhan N., Hossain H., Hossain M., Reza H.M., Rahman M.M. et Ullah M.O.**, 2016 - Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*, volume 13(1), pp.1-13. [En ligne] Disponible sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4827240/> (consulter le 12 Avril 2019)
- **Alberto M.R., Canavosio M.A.R. et Manca de Nadra M.C.**, 2006 - Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. *Electronic Journal of Biotechnology*, volume 9(3), pp. 205-209.
- **Allais M.**, 2018 - Matériaux fonctionnels à base de polyphénols. Sciences agricoles. Université de Strasbourg.
- **Almajano M.P., Carbo´R., Jimenez J.A.L. et Gordon M.H.**, 2007_ Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, volume 108 (1), pp. 55–63. [En ligne] disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607010631> (consulter le 3 mai 2019)
- **Amara N. et Bougherara Y.**, 2017 - Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle du Cyprès Vert (*Cupressus Sempervirens L.*). *Algerian Journal of*

Natural Products, volume 5(2), pp. 455-462. [En ligne] Disponible sur <https://www.asjp.cerist.dz/en/article/34632> (consulter le 12 Février 2019)

- **Anonyme**, 2016 – Les plantes Médicinales. [En ligne] Disponible sur https://www.iesv.org/wp-content/uploads/2015/11/YIESVLIP-RV04_bd-SANS-TRAITS-COUBE.pdf (consulter le 14 Avril 2019).
- **Anulika N.P., Ignatius E.O., Raymond E.S., Osasere O-I., Abiola A.H.**, 2016 - The Chemistry Of Natural Product: Plant Secondary Metabolites. *International Journal Of Technology Enhancements And Emerging Engineering Research*, volume 4(8), pp.2347-4289.

Aouni M., Pelen F., Soulimani R., 2013 - Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, Volume 1, pp. 225-236.

Arnef A., 1985 -les cyprès. *Oxford*, volume. 174(44), pp. 13-24.

Atindehou M., 2012 - Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de *Chromolaena odorata*. Sciences agricoles. Université de Strasbourg.

Avramidou E., Andreas G., Doulis F.A et Aravanopou L., 2017 - Linkage and QTL mapping in *Cupressus sempervirens* L. provides the first detailed genetic map of the species and identifies a QTL associated with crown form. *Tree Genetics & Genomes*, volume. 13(2), pp. 1-14.

Balière C., 2016 - Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest.

Bartels A., 1998 – Guide des plantes du bassin méditerranéen. Traduit par, Cordate J.P. Allemagne.

Basharat S., 2015 - Le pouvoir antioxydant des additifs phylogéniques. *Biomin Holding GmbH*, pp.1-8.

Bellebcir L., 2008 - Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. MEMOIRE En vue de l'obtention du Diplôme de Magister Option : Biodiversité et production végétale. UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE, 119 pages.

Ben Nouri A., Dhifi W., Bellili S., Ghazghazi H., Aouadhi C., Chérif A., Hammami M. et Mnif W., 2015 - Chemical Composition, Antioxidant Potential, and

Antibacterial Activity of Essential Oil Cones of Tunisian Cupressus sempervirens. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry*, 8 pages.

Benveniste R. et Davies J., 1973 - Mechanisms Of Antibiotic Resistance In Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, volume 42 (1), pp. 471- 506. [En ligne] disponible sur <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.42.070173.002351?journalCode=biochem> (consulter le 23 mai 2019).

- **Bernays E.A., Cooper Driver G. et Bilgener M.**, 1989 - Herbivores and Plant Tannins. *Advances in ecological research*, volume 19(8), pp.263-302.
- **Boizot N. et Charpentier J P.**, 2006 - Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques.
- **BouarabChibane L., Degraeve P., Ferhout H., Bouajila J et Oulahal N.**, 2019 - Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Wiley, volume. 99 (4), pp.1457-1474.
- **Boudjema H.**, 2017. Antibacterial activity of ethyl acetate extracts from algerian cupressus sempervirens var against some human pathogens bacteria. *Algerian Journal of Natural Products*, Volume 5(3), pp. 524-529.
- **Bouharmont J et Evrard C.**, 2002. *botanique systématique une perspective phylogénétique*. Bruxelles.
- **Boukssaim H., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M et Khia A.**, 2013 - Caractérisation chimique et microbiologique des huiles essentielles des rameaux, des cônes et du bois de Cupressus atlantica, arbre forestier endémique du Maroc. *Phytothérapie*, Volume (11), pp. 294-300.
- **Bouyahya A., Bakri Y., Et-Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa A., Charfi S., Abrini J et Dakka N.**, 2017 - Resistance to Antibiotics and Mechanisms of Action of Essential Oils against Bacteria. *Phytothérapie*, 2-12.
- **Bravo L.**, 1998 - polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional, significance. *Nutrition Reviews*, Volume. 56(11), pp. 317-333.
- **Bruneton, J.**, 1999 - pharmacognosie. *Phytochimie, Plantes médicinales*", (3^{ème} éd.). Paris : Editions médicales internationales. Editions Tec And Doc Lavoisier", 1120p
- **Brzozowska J. et HANOWER P.**, 1976 - *Sur Les Composés Phénoliques Des Végétaux Et Leur Rappor Avec Un Déficit Hydrique Chez Des Cotonniers*.

Annales de l'Université d'Abidjan, série C (Sciences], tome XII, Numéro 9071, pp. 65- 87.

- **Caudullo G. et de Rigo D.**, 2016 - *Cupressus sempervirens in Europe: distribution, habitat, usage and threats.* : San-Miguel - Ayanz J., de Rigo D., Caudullo G., Houston Durrant T. et Mauri A. - The MEDUSA Network: Conservation and Sustainable Use of Wild Plants of the Mediterranean Region, Eds. *European Atlas of Forest Tree Species*.
- **Cardonaa F.b., Andrés-Lacuevac C., Tulipania D.S., Tinahonesb F.J. et Queipo-Ortuñoa M.I.**, 2013_ Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (8), pp 1415–1422. [En ligne] disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286313000946> (consulter le 3 mai 2019)
- **COURVALIN P.**, 2007 - Bacterial Antibiotic Resistance : Combinations Of Biochemical And Genetic Mechanisms. *Bull. Acad. Vét. France* — 2008 - Tome 161 - N°1 [En ligne] disponible sur <http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/47917> (consulter le 23 mai 2019)
- **Chagnon F.**, 2014 - étude de la relation structure-activité de la tomatidine, un stéroïde alcaloïde aux propriétés antibiotiques contre les souches persistantes de staphylococcus aureus. Faculté des sciences, université de Sherbrooke. Québec, Canada
- **Chanegrihà N., Foudil-cherir A et Baailouamer B. M.**, 1998 - activité antimicrobienne des huiles essentielles de cypres et d'eucalyptus algériens. *ResearchGate*, pp. 12-16.
- **Chebaibi A., Rhazi Filali F., Amine A et Zerhouni M.**, 2011 - Eff et bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum L.*) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* , Volume (9), pp. 158–164
- **Chutipaijit S. et Sutjaritvorakul T.**, 2018 - Comparative study of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant capacities in pigmented and non-pigmented rice of indica rice varieties. *Food Measurement and Characterizatio*, Volume (12), pp. 781–788.

- **Coppo E. et Marchese A.**, 2014- Antibacterial Activity of Polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, volume. (15), p 380-390
- **Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H. et Madani K.**, 2015 - Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, volume 166, pp.585_599. [En ligne] Disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614009522> (consulter le 22 Avril 2019)
- **Dai J. et Mumper R.J.**, 2010 - Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, volume 15, pp. 7313-7352.
- **DESMIER T.**, 2016 - *Les Antioxydants De Nos Jours : Definition Et Applications*. Thèse Pour Le Diplôme D'état De Docteur En Pharmacie présentée et soutenue publiquement, UNIVERSITÉ DE LIMOGES Faculté de Pharmacie, 88 pages.
- **Daglia M.**, 2012_Polyphenols as antimicrobial agents.*current opinion in biotechnology*,volume 23(2),pp. 174-181. [En ligne] Disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166911006756> (consulter le 22 Avril 2019)
- **Dewanto V., WU X., Adom K.K. et Liu R.H.**, 2002 - Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric.Food Chem*, volume. (50) pp. 3010-3014.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards JF et Stocker P.**, 2007 - Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*, (224), 801–809.
- **Elkolli M.**, 2016 - cours : structure et activités des substances naturelles : principes et applications. Ecologie microbienne. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas de Sétif.
- **FATTOUCH S., CABONI P., CORONEO V., TUBEROSO C.I.G., ANGIONI ., DESSI S., MARZOUKI N. et CABRAS P.**, 2007_Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, Volume 55(3), pp. 963–969. [En ligne] disponible sur <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf062614e>(consulter le 3 mai 2019)
- **Ferrazzano G.F, Amato I., Ingenito. , Zarrelli A., Pinto G. et Pollio A.**, 2011_ Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules*, volume 16(2), pp. 1486-1507. [En ligne] disponible sur <https://www.mdpi.com/1420-3049/16/2/1486> (consulter le 3 mai 2019)

- **Froux F.**, 2002- *Caractéristiques hydrauliques, régulation stomatique et efficacité d'utilisation de l'eau de quatre espèces de conifères méditerranéens (Cupressus sempervirens, Cedrus atlantica, Pinus halepensis et Pinus nigra)*. L'Université Henri Poincaré, Nancy 1, 116P.
- **Ghasemian A., Mohabati Mobarez A., Hosseini Doust R.**, 2018 - Klebsiella Oxytoca: Clinical Significance, Virulence Factors And Developed Antimicrobial Resistance. *Romanian Archives Of Microbiology And Immunology*, pp. 104-109
- **Ghedadba N et Hambaba L., Ayachi A., Aberkane M.C., Bousselsela H et Oued-Mokhtar S.M.**, 2015 - Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de Marrubium deserti de Noé. *researchGate*, pp. 2-8.
- **Grotewold E.**, 2006 - The Science of Flavonoids. Erich Grotewold Department of Cellular and Molecular Biology .The Ohio State University Columbus, Ohio, USA. *Springer*, 274pages.
- **Hamadache N.**, 2011 - *Criblage Des Extraits Phénoliques D'origine Végétale Doués D'activité Antibactérienne : Recherche Des Inhibiteurs Naturels De B-Lactamases*. Magister En Biologie Option : Biochimie appliquée aux substances végétales bioactives. Université A/MIRA de Bejaia (UAMB), 100 pages.
- **Hassanpour S., Maheri-Sis N., Eshratkha B. et Mehmandar F.B.**, 2011 - Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *International Journal of Forest, Soil and Erosion*, volume 1(1), pp. 47-53.
- **Ibrahim E., Desoukey S., Hadad G., Abdel Salam R., Ibrahim A., Ahmed S., Radwan M., Wanas A. et ElSohly M.**, 2017 - Analysis of cupressuflavone and amentoflavone from *Cupressus sempervirens L.* and its tissue cultured callus using HPLC-dad method. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, Volume 5 (5), pp.174 -180.
- **Ibrahim N.A., El-Seedi H.R et. Mohammed M.M.**, 2009 - Constituents And Biological Activity Of The Chloroform Extract And Essential Oil Of *Cupressus sempervirens*. *Chemistry of Natural Compounds*, Volume 45(3) , pp. 1-5.

- **Ingrid M. Meer V., Maïke E., Stam., Arjen J., Tunen V., Joseph N. M. and Stuitje A. R.**, 1992 - Antisense Inhibition of Flavonoid Biosynthesis in Petunia - Anthers Results in Male Sterility, *The Plant Cell.*, Vol. 4, PP. 253-262.
- **Jayol A.**, 2018 Résistance à la colistine chez les bacilles Gram négatif. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bordeaux; Université de Fribourg, Suisse.
- **Jyoti B et Basu A.**, 2017 - Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle du Cyprès Vert (*Cupressus Sempervirens L.*). *Algerian Journal of Natural Products*, pp. 455-462.
- **Karimi H.R., Farahmand H et Hashemipour M.**, 2013 - Morphological diversity of some old accessions of *Cupressus sempervirens L.* in Iran. *Plant Syst Evol*, pp. 1379–1386.
- **Karou D., Dicko M.H., Simpore J. et Traore A.S.**, 2005_ Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, volume 4(8), pp. 823-828.
- **Khan M-F., Ahamad T. et Rawat P.**, 2017 - Biomedical and chemical profile of *cupressus sempervirens*. *A Mini review : Med Pub journals*, volumes2(3), 5 pages.
- **Khoddami A., Wilkes M.A. et Roberts T.H.**, 2013 - Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, volume 18(2), pp. 2328-2375. [En ligne] Disponible sur https://www.researchgate.net/publication/235689961_Techniques_for_Analysis_of_Plant_Phenolic_Compounds (consulter le 22 Avril 2019)
- **Kliebenstein D.J.**, 2004 - Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell and Environment*, volume 27(6), pp675_684
- **Kumar Trivedi M., Patil S., Shettigar H., Mondal S.H. et Jana S.**, 2015 - Antimicrobial Susceptibility Pattern and Biochemical Characteristics of *Staphylococcus aureus*: Impact of Bio field Treatment. *Journal Of Microbial biochemical technology*, OMICS Publishing Group, 2015, 7 (4), pp.238-241.
- **Kumarappan C.T., Thilagam E., Subhash C. et Mandal**, 2010 - Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, volume 19(3), pp. 349-355.

- **Lacampagne S.**, 2010 - *Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin : Etude de l'impact de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux*. THÈSE pour le DOCTORAT Mention : Sciences, Technologie, Santé Option Œnologie. UNIVERSITÉ BORDEAUX 2, France, 293pages.
- **Lattanzio V.**, 2013 - *Phenolic Compounds: Introduction*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1543-1573.
- **Lee G.I., Jang H.I., Hwang I.G. et Rhee M.S.**, 2009_ Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, volume 134(3), pp. 196–200. [En ligne] disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509003304> (consulter le 4 mai 2019).
- **Licois D.**, 1992_ *Escherichia coli* entéropathogènes du lapin. *Ann Rech Vet*, volume 23, pp, 27-48.
- **Lin D., Xiao M., Zhao J., Li Z et Xing B.**, 2016 - An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *MDPI* , pp. 2-19.
- **Lushchak V.I.**, 2015 - Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications.
- **Macheix J.J.**, 1996 - Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives a la fin du XXeme siècle ? . *Acta Botanica Gallica*, volume 143(6), pp. 473-479.
- **Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C.**, 2005 – les composées phénoliques des végétaux.
- **Marcucci M.C., Ferreres F., Garcia-Viguera C.G., Bankova V.C. , De Castro C.L. , Dantas A.P. , Valente P.H.M. et Paulino N.**, 2001_ Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, volume 72(2), pp.105-112. [En ligne] disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100003263> (consulter le 2 mai 2019).
- **Mariani-Kurkdjian P. et Bingen É.**, 2012_ Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Réanimation*, volume 21(3), pp. 268-279.
- **Mello B.**, 2015- phenolic compound. *Encyclopedia of Membranes*. Springer.

- **MghezziHabella R., Karou S., Kechebar M.S.A et Bounab H.**, 2016 - Etude des composés phénoliques et des activités antioxydantes de l'Acacia ehrenbergiana de la région de Tindouf. *Journal Algérien des Régions Arides (JARA)*, pp. 2-9.
- **Michane M.**, 2015 - *Contribution à l'étude du dépérissement du Cyprès vert (Cupressus sempervirens L.) dans les monts des Traras Occidentaux (Wilaya de Tlemcen). Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat, Ecologie animale .université de Tlemcen, 247 pages.*
- **Morigane**, 2007 – Grimoire des plantes. Ce livre est publié sous la licence libre Creative Commons BY-NC-ND.
- **Myburgh K.**, 2014- Polyphenol Supplementation: Benefits for Exercise Performance or Oxidative Stress. *Rev. sports med.*, volume. (44), pp. 57-57.
- **Navarro R.**, 2016 - Men and cypress trees. *Science direct, volume 56*, pp.416 - 418.
- **Nikaido H.**, 2003 - Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, volume 67 (4), pp. 593–656.
- **Nkhili E Z.**, 2009 - Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant, université d'avignon et des pays de vaucluse. Montpellier.
- **Ozcan T., Akpinar-Bayizit A., Yilmaz-Ersan L. et Delikanli B.**, 2014 - Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, volume 5(5), pp. 393-397
- **Pasquier C.**, 1995 - stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, volume 267, pp.87-92.
- **Pereira M., Valentão P., Pereira J., et Andrade P.**, 2009 -phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, pp. 2-9.
- **Phaniendra A., Jestadi D.B. et Periyasamy .**, 2015 - Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of clinical Biochemistry*, volume 30(1), pp.11-26.
- **Prasanna B.D., Sathyanarayana N., GummadiPraveen V et Vadlani.,** 2016. *Biotechnology and Biochemical Engineering*. Springer Nature.

- **Riom C.**, 2010 - *Le cupressus sempervirens et Approche du concept Sentinelle Nantais*. Thèse pour le le diplôme de docteur en pharmacie. Faculté de pharmacie, université de Nantes. 123 pages. [En ligne] Disponible sur <file:///C:/Users/s-com/Downloads/riomPH10.pdf> (consulter le 12 Février 2019)
- **Rispail N., Philip M et Webb K.J.**, 2005 - Phenolic compounds: extraction and analysis . In *lotus japonica hand book*, pp. 349-355
- **Rodrigues A.E., Pinto P., Barreiro M., Costa C., Mota M., et Fernandes I.**, 2018 – An intergrated approach for added value producuts from lingocellulosic biorefiners. Switzerland: Springer Nature.
- **Romani A., Galardi C., Pinelli P., N. Mulinacci et Heimle P.**, 2002 - HPLC Quantification of Flavonoids and Biflavonoids in Cupressaceae Leaves. *Chromatographia*, pp. 469- 06
- **Sahin S., Samli R.**, 2013 - Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, volume 201, pp. 595-602. [En ligne] Disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417712001757> (consulter le 22 Avril 2019)
- **Saïchi N et Durand Ph.**, 2009 – guide des conifères et espèces apparentées. Institut Klorane : Entreprise pour la Protection et la Bonne Utilisation du Patrimoine Végétal, pp. 16-17
- **Savoie F .**, 2011 - Optimisation du protocole de recherche des Escherichia coli producteurs de Shigatoxines (STEC) dans les aliments. Sciences agricoles. Université de Bourgogne.
- **Saxena M., Saxena J., Pradhan A.**, 2012 - FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS AS ANTIOXIDANTS IN PLANTS AND HUMAN HEALTH. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, volume 16(2), pp. 130-134.
- **Scalbert A., Johnson I.T.et Saltmarsh M.**, 2005 - Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal Of Clinical Nutrition*, volume 18(1), pp. 215S-217S. [En ligne] Disponible sur <https://academic.oup.com/ajcn/article/81/1/215S/4607494> (consulter le 13 Avril 2019)
- **Sękiewicz K., Dering M., Romo A., Dagher-kharrat M.B., Boratyńska K., OK T et Boratyński A.**, 2018 - Phylogenetic and biogeographic insights into

long-lived Mediterranean Cupressus taxa with a schizo-endemic distribution and Tertiary origin. *Botanical Journal of the Linnean Society*, volume. (188), pp. 190–212.

- **Selim S.A., Adam M.E., Hassan S.M et Albalawi A.R.**, 2014 - Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and (Cupressus sempervirens L.). *BMC Complementary and Alternative Medicine* , Volume 14(179), pp. 1-8
- **SIES H.**, 1997 - Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial And Smooth Muscle Cell Function In Oxidative Stress Oxidative Stress: OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS. *experitnental Physiology*, volume 82, pp.291 295.
- **Soltani J., MahdiehS et Moghaddam H.**, 2014 - Antiproliferative, Antifungal, and Antibacterial Activities of Endophytic Alternaria Species from Cupressaceae. *Curr Microbiol* , Volume (69), p. 349–356
- **Soltani J., MahdiehS et Moghaddam H.**, 2015 - Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Mediterranean Cypress Cupressus sempervirens. *Curr Microbiol* , volume. (70), PP. 580–586
- **Stalikas D.**, 2007 - Extraction, séparation, and détection méthodes for phenolic acides and flavonoids. *Wiley inter science*, 30, 3268-3295 pages.
Surre J., 2017 - Détection précoce de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Bactériologie. Université Sorbonne Paris Cité.
- **Talbi M.**, 2015 - *Dosage des polyphénols de la plante d'Artémisia campestris.L par chromatographie HPLC, mise en évidence de l'activité biologie*. Spécialité : chimie moléculaire et biomoléculaire, mémoire de Magister. Université d'Oran 1 Ahmed Benbella, Algérie, 104 pages
- **Teixeira J., Gaspar A., Garrido E.M., Bourges F.**, 2013 - Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, volume 2013, pp.1-11.

- **Tian F., Li B., Ji B., Yang J., Zhang G., Chen Y. et Luo Y.**, 2009 - Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, volume 113(1), pp. 173-179. [En ligne] disponible sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608009096> (consulter le 21 mai 2019)
 - **Tien Tran D.**, 2015 - Conception et synthèse de sondes moléculaires pour l'étude d'interactions polyphénol-protéine. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2015.
- Toms-barberan F.A. et Andres-lacueva C.**, 2012 - Polyphenols And Health: Current State And Progress. *J. Agric. Food Chem*, volume 60(36), pp. 8773-8775.
- **Tso R.**, 2010 – Chemistry and biotechnology of dietary Polyphenols. *Nutrients*, Volume (2), PP. 1231-1246.
 - **Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A., et Yangsabai A.**, 2018 - Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical aspect : an over view. *Medicines*, volume. 5(93), pp. 2-16
 - **Verdu.**, 2013 - Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme. Chimie analytique. Université d'Angers
 - **Weston L.A. et Mathesius U.**, 2013 - Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Springer Science+Business Media New York*, volume 39, pp. 283–297.
 - **Winkel-Shirley B .**, 2002 - Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2002, volume 5, pp. 218–223.
 - **Yahiaoui B.**, 2014- *Cours de Microbiologie générale*.
 - **Zakaryan H., Arabyan E., Oo A. et Keivan Z.**, 2017-Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Rev. Arch Virol*, Volume. 162(2539). pp. 2245-2250.
 - **Zhang J., Rahman A.A., Jain S., Jacob M.R., Khan S.I., Tekwani B.L. et Ilias M.**, 2012 - Antimicrobial and antiparasitic abietane diterpenoids from *Cupressus sempervirens*. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*, volume 2, pp. 1-6. [En ligne] disponible sur <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=54219&content=PDF> (consulter le 10 Juin 2019)

Annexe :

Annexe1 : produits et matériels utilisés

Produits et réactif chimiques	Matériel de laboratoire	Matériel de microbiologie
Méthanol	Eau distillées	Bec Bunsen
Éthanol	Bécher	Etuve
Acétone	Erlenmeyer	Bain-marie
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	Entonnoir	Ecouvillons secs
Acide gallique	Tube à essai	Micropipette
Réactif du Folin-ciocalteu	Papier filtre Wattman	Boites de Petri
	Balance	Milieus de culture : gélose Mueller-Hinton
	Balance de précision	
	Mixeur de type (WARING Commercial Blendor)	
	Agitateur de type (Heidolph RZR- 2000)	
	Agitateur magnétique	
	Etuve	
	Spectrophotomètre	
	Evaporateur	

Annexe 2 : protocole de préparation des extraits bruts



Annexe 3 : extraction solide liquide à l'aide d'un évaporateur-rotatif



Annexe 4 : dosage des polyphénols totaux

