



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière Sciences Biologiques

Option : Biodiversité et physiologie végétale

Thème

Bio valorisation et caractérisation biochimique des extraits des
feuilles de *Tetraclinis articulata Vahl* (Master)

Présenté par :

*Aliaoui Loubna

*Elfertas Rania

Date de soutenance:

14/07/2022

Devant le jury :

Nom	Grade/ Lieu	Qualité
Mme Benassal .N	MAA/USDB1	Présidente
Mme Bensalah.L	MAA/USDB1	Examinatrice
Mme Cherif .H.S	MCA/USDB1	Promotrice
Mme Bendoui .H	Doctorante/USDB1	Co-promotrice

Promotion : 2021-2022

Remerciements

Nous tenon à remercier DIEU le tout puissant, qui nous a donné le courage, la force et la volonté d'accomplir ce modeste travail.

*Nos remerciements, en premier lieu, s'adressent à notre promotrice **Mme Cherif H.S.** Pour tous ses efforts, sa patience, sa présence, ses conseils et encouragement qu'elle a manifesté durant son encadrement tout le long de la réalisation de ce mémoire.*

Tous nos remerciements s'adressent aux lecteurs attentifs et les membres des jurys qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail.

*Nous tenons à remercier Madame **Benassal. N** chargé de cours à l'Université de Blida-1, Pour l'honneur qu'elle nous fait en présidant ce jury.*

*Nous remercions également Madame **Bensalah. L** chargée de cours à l'Université de Blida-1 d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer notre travail.*

*Nous tenons aussi à remercier notre Co-promotrice, Madame **Bendoui. H** pour son aide et sa patience.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à Monsieur **Froudj. R**, chef du parc national d'EL HAMDANIA et toute son équipe, pour son aide dans la programmation des sorties et la collecte de l'espèce végétale.*

Nous exprimons notre gratitude à tous nos enseignants qui n'ont pas épargné leur précieux savoir durant tout notre parcours universitaire.

Aussi, nous voudrions exprimer cette reconnaissance à tous les ingénieurs des laboratoires de la faculté SNV qui nous ont toujours aidés.

Enfin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Dédicace

Je dédie ce travail a :

Mes chers parents Mr Elfertas Ahcene et Mme Gacem Zakia

Pour leur amour, soutien, encouragement, confiance et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs, ce succès et pour vos beaux yeux.

A mes frères : Rafik et Adem.

A ma sœur : Wicem.

A ma belle famille et mon cher fiancé Mr Hamza

Mon confident, qui m'a encourager et soutenu depuis le début.

A ma grande mère maternelle

Qui m'a entouré de sa prière.

A la mémoire de mes grands parents

Que dieu les accueille dans son vaste paradis.

A mes oncles et ma tante et ma cousine adorée Maroua ainsi que tous mes cousins et cousines.

A toute la Famille ELFERTAS et GACEM.

A mes copines Achwak, Madjeda et Manel

Qui ont fait de mes années universitaires une période inoubliable remplie de bons souvenirs.

A ma chère binôme Loubna,

Avec qui j'ai partagée des moments difficiles et d'autres agréables le long de ce travail.

Elfertas Rania

Je dédie ce travail :

A mes chers parents,

Qui ont toujours cru en moi et qui ont su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous, qui m'ont toujours encouragés, pour leurs sacrifices et leurs soutiens aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de nous combler, que dieu leur procure bonne santé et longue vie. Merci pour tout.

A toute la famille ALIAOUI et BOUZIANE RAHMANI

À ma sœur et mes frères

Qui m'ont soutenu chacun à sa manière pendant ces nombreuses années d'études, et qui m'ont toujours donné la force pour continuer.

A mon compagnon Mr BOUZIANE RAHMANI HALIL,

Qui me soutient depuis le début. Lorsque je doute ou que je baisse les bras, il est toujours là pour me montrer sa vision positive de la vie et me faire avancer.

A mes amies

Qui m'ont aidé par leur présence et leur amitié, particulièrement KENZA LARACHI, AALET ROUBAILA

A mon Binôme RANIA

Avec qui j'ai partagé les meilleurs moments durant toutes ces années.

Aliaoui Loubna

Résumé

Le Thuya de berbérie (*Tetraclinis articulata* Vahl) appartenant à la famille des Cupressacées est une espèce endémique de l'Afrique du nord. Dans la présente étude nous nous sommes intéressées à la caractérisation biochimique de l'extrait éthanolique des feuilles de *Tetraclinis articulata* et la mise en évidence des activités antimicrobienne et antioxydante.

Les feuilles sont récoltées dans la région d'El-Hamdania (Algérie), et l'extrait éthanolique obtenu par Soxhlet.

La teneur en eau moyenne mesurée est de 57%, et le rendement de l'extrait estimé à 39.18%. L'étude de screening phytochimique des extraits a révélé la présence des métabolites secondaires tels que : les tanins catéchiques, les flavonoïdes, les saponines, les terpénoïdes et l'absence des anthocyanes et les alcaloïdes.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction du fer (FRAP) nous a montré que l'extrait éthanolique des feuilles exerce une importante activité, la méthode de scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) nous a montré que l'extrait a un pouvoir antioxydant plus au moins moyen par rapport au produit de référence l'acide ascorbique, cependant la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH a révélé que l'extrait a une activité anti radicalaire proche de celle montrée par l'acide ascorbique.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique des feuilles de *T.articulata* par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) a permis de constater que *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* sont moins sensibles (+) par rapport au *Staphylococcus aureus* qui est sensible (++) , par contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* révèle très résistante (-).

En outre, les résultats de la méthode par contact directe en milieu gélosé nous a révélé la présence d'une zone d'inhibition pour les souches suivantes : *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli*, contrairement à *Pseudomonas aeruginosa* qui affiche une faible croissance microbienne.

Mots clés : *Tetraclinis articulata*, extrait éthanolique, screening phytochimique, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

Berberian cedar (*Tetraclinis articulata* Vahl) belonging to the Cupressaceae family is an endemic species of North Africa. In the present study we were interested in the biochemical characterization of the ethanolic extract of the leaves of *Tetraclinis articulata* and the highlighting of the antimicrobial and antioxidant activities.

The leaves were harvested in the region of El-Hamdania (Algeria), and the ethanolic extract was obtained by soxhlet. The average water content measured was 57%, and the yield of the extract was estimated at 39.18%.

The phytochemical screening study of the extract revealed the presence of secondary metabolites such as: catechic tannins, flavonoids, saponins, terpenoids and the absence of anthocyanins and alkaloids.

The evaluation of the antioxidant activity by the method of reduction of iron (FRAP) showed us that the ethanolic extract of the leaves exerts an important activity, the method of scavenger of the hydrogen peroxide (H₂O₂) showed us that the The extract has a more or less average antioxidant power compared to the reference product ascorbic acid, however the DPPH free radical scavenging method revealed that the extract has an anti-radical activity close to that shown by ascorbic acid.

The evaluation of the antimicrobial activity of the ethanolic extract of *T. articulata* leaves by the disc diffusion method (aromatogram) revealed that *Bascillus subtilis*, *Candida albicans* are less sensitive (+) compared to *Staphylococcus aureus* which is sensitive (++) , while *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* was found to be highly resistant (-).

In addition, the results of the direct contact method in agar medium revealed the presence of a zone of inhibition for the following strains : *Bascillus subtilis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*, in contrast to *Pseudomonas aeruginosa*, which shows a low microbial growth.

Keywords: *Tetraclinis articulata*, ethanolic extract, phytochemical screening, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

العرعار (*Tetraclinis articulata* Vahl) التي تنتمي إلى عائلة Cupressaceae من الأنواع المستوطنة في شمال إفريقيا. في هذه الدراسة ، كنا مهتمين بالتوصيف الكيميائي الحيوي للمستخلص الإيثانولي لأوراق نبات *Tetraclinis articulata* وإثبات الأنشطة المضادة للميكروبات والأوكسدة .

يتم حصاد الأوراق في منطقة الحمداية (الجزائر) ، والمستخلص الإيثانولي الذي حصل عليه soxhlet. بلغ متوسط المحتوى المائي المقاس 57٪ وحاصل المستخلص 39.18٪. كشفت دراسة المسح الكيميائي النباتي للمستخلصات عن وجود مستقلبات ثانوية مثل: التانينات الكاتيكية ، الفلافونويد ، الصابونين ، التربينويدات وغياب الأنثوسيانين والقلويدات.

أظهر تقييم نشاط مضادات الأوكسدة عن طريق طريقة تقليل الحديد (FRAP) أن المستخلص الإيثانولي للأوراق يمارس نشاطاً مهماً ، وأظهرت طريقة سكاغانغر لبيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) أن المستخلص يحتوي على أكثر أو أقل من متوسط القوة المضادة للأوكسدة مقارنة بالمنتج المرجعي حمض الأسكوربيك ، إلا أن طريقة مسح الجذور الحرة DPPH كشفت أن المستخلص له نشاط مضاد للجذور قريب من ذلك الذي يظهره حمض الأسكوربيك .

أتاح تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص الإيثانولي لأوراق *T. articulata* بطريقة الانتشار على القرص (aromatogram) ملاحظة أن *Bascillus subtilis* و *Candida albicans* أقل حساسية (+) مقارنة بالمكورات العنقودية الذهبية وهي حساسة (++) ، من ناحية أخرى ، أثبتت *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* أنها شديدة المقاومة (-).

بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت نتائج طريقة التلامس المباشر في وسط أجار وجود منطقة تثبيط للسلاسل التالية: *Bascillus subtilis* و *Candida albicans* و *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* على عكس *Pseudomonas aeruginosa* التي تظهر ضعف نمو الميكروبات.

الكلمات المفتاحية: *Tetraclinis articulata* ، مستخلص إيثانولي ، فحص كيميائي نباتي ، نشاط مضاد للأوكسدة ، نشاط مضاد الميكروبات.

Liste d'abréviation

APG III	: Angiosperm Phylogeny Group III
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
ABS	: Absorbance
ATCC	: American Type Culture Collection
DPPH	: 2,2-diphényle picryl-1hydrazyl
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
E.coli	: Escherichia coli
FeCl₃	: Chlorure ferrique
FRAP	: Ferric reducing antioxydant power
HE	: Huile essentielle
HCL	: Chlorhydrique
HE	: Huile essentielle
HPLC-DAD	: Chromatographie en Phase liquide a haute performance avec Diod array Detector
HPLC-MS	: Chromatographie en Phase liquide a haute performance couplé a la spectrométrie de masse
H₂So₄	: Acide sulfurique
NH₄OH	: Ammoniaque
P. aeruginosa	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S. aureus	: <i>Staphylococcus aureus</i>
T.articulata	: <i>Tetraclinis articulata</i>
UICN	: Union International pour la Conservation de la Nature
UV	: Ultra violet
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine

Listes des figures

Figure 01 : Aspect général de thuya de berbérie.....	3
Figure 02 : Les feuilles de <i>Tetraclinis articulata</i>	4
Figure 03 : Fleur mâle et femelle de <i>Tetraclinis articulata</i>	5
Figure 04 : Cône femelle a maturité de <i>Tetraclinis articulata</i>	6
Figure 05 : Aire de répartition du Thuya de Berbérie en méditerranée Sud-occidentale : Carte de Quezel et Santa (1962), modifiée par Hadjadj (2016)	8
Figure 06 : Localisation des stations d'études secteur El-Hamdania (PNC ,2015).....	18
Figure 07 : Schéma générale des procédures expérimentales effectuées sur <i>T.articulata</i>	21
Figure 08 : Les feuilles fraîches de <i>Tetraclinis articulata</i>	Annexe II
Figure 09 : Séchage des feuilles de <i>T.articulata</i> dans l'étuve	Annexe II
Figure 10 : Poudre de <i>T.articulata</i> (après broyage).....	Annexe II
Figure 11 : Extraction des feuilles de <i>T.articulata</i> à l'aide d'un soxhlet	Annexe II
Figure 12 : Elimination de solvant à l'aide d'un rota vapeur.....	Annexe II
Figure 13 : Extrait des feuilles de <i>T.articulata</i>	Annexe II
Figure 14 : Protocole expérimental de l'activité antioxydante par FRAP.....	26
Figure 15 : Protocole expérimental de l'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène.....	27
Figure 16 : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri.....	30
Figure 17 : Teneur en eau des feuilles de <i>T.articulata</i>	31
Figure 18 : Rendement de l'extrait éthanolique.....	32
Figure 19 : Mise en évidence des métabolites secondaire par screening phytochimique	Annexe III

Figure 20 : Pouvoir réducteur du fer : FRAP (Ferricreducing antioxydant power) en fonction de différentes concentrations.....	34
Figure 21 : Teste de pouvoir réducteur du fer par la méthode de FRAP (Ferricreducing antioxydant power).....	Annexe IV
Figure 22 : Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) en fonction de différentes concentrations.....	36
Figure 23 : Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	Annexe IV
Figure 24 : Détermination CI ₅₀ de l'acide ascorbique et l'extrait éthanolique (H ₂ O ₂).....	Annexe IV
Figure 25 : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	38
Figure 26 : Teste de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	Annexe IV
Figure 27 : Détermination CI ₅₀ de DPPH	Annexe IV
Figure 28 : Préparation des souches bactériennes.....	Annexe IV
Figure 29 : Résultats de la méthode de diffusion sur disque.....	Annexe IV
Figure 30 : Résultats de la méthode contact direct en milieu gélose.....	Annexe IV
Figure 31 : Courbe représente résultats du pouvoir du fer, FRAP.....	Annexe V
Figure 32 : Courbe représente l'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	Annexe V
Figure 33 : Courbe représente Piégeage du radical libre DPPH.....	Annexe V

Liste des tableaux

Tableau I : Composition chimique de l'essence de certaines parties de <i>Tetraclinis articulata</i>	13
Tableau II : Caractéristiques de la collecte des feuilles de <i>T.articulata</i>	19
Tableau III : Origines des souches utilisées pour l'étude du pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique.....	20
Tableau IV : Appareillage, verrerie et réactifs.....	Annexe I
Tableau V : Teneur en eau des feuilles de <i>T.articuata</i>	Annexe V
Tableau VI : Rendement de l'extraction des trois échantillons.....	Annexe V
Tableau VII : Résultats de quelques métabolites secondaires trouvés dans l'extrait éthanolique de <i>T.articulata</i>	33
Tableau VIII : Résultats du Pouvoir réducteur du fer : FRAP	Annexe V
Tableau IX : Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	Annexe V
Tableau X : CI ₅₀ de l'extrait et du standard contre H ₂ O ₂	37
Tableau XI : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	Annexe V
Tableau :XII : Valeurs des CI ₅₀	39
Tableau XIII : Diamètre des zones d'inhibition des souches bactériennes par la technique aromatoigramme.....	40
Tableau XIV : Diamètre des zones d'inhibition des souches bactériennes par la méthode de contact direct en milieu gélose.....	41

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse Bibliographique	
I.1 Présentation de thuya de berbérie	2
I.1.1 Historique	2
I.1.2 Description botanique	3
I.1.3 La signification des l'origine du nom.....	7
I.1.4 Systématique	7
I.1.5 Aire de répartition du thuya	8
I.1.6 Ecologie de la plante	9
I.1.7 Composition chimique des différents organes de <i>Tetraclinis articulata</i>	10
I.1.7.1 Les huiles essentielles.....	10
I.1.7.2 Les extraits bruts	12
I.1.8 Importance de thuya	14
I.2 Généralités sur les métabolites secondaires.....	14
I.2.1 Les flavonoïdes.....	15
I.2.2 Les Anthocyanes.....	15
I.2.3 Les tanins	15
I.2.4 Les Alcaloïdes	16
I.2.5 Les saponines	16
Chapitre II : Matériel et méthode	
II.1 Matériel.....	19
II.1.1 Matériel biologique.....	19
II.1.1.1 Matériel végétale	19
II.1.1.2 Matériel microbien	19
II.1.2 Matériel non biologique	20
II.2 Méthodes.....	21
II.2.1 Détermination de la teneur en eau	22
II.2.2 Préparation de l'extrait éthanolique.....	22
II.2.3 Rendement de l'extraction	22
II.2.4 Screening phytochimique	23
II.2.4.1 Identification des flavonoïdes.....	23
II.2.4.2 Identification des Tanin	23

II.2.4.3	Identification des saponines.....	23
II.2.4.4	Identification des anthocyanes	24
II.2.4.5	Identification des alcaloïdes	24
II.2.4.6	Identification des terpénoïdes	24
II.2.5	Evaluation des activités biologiques	24
II.2.5.1	Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire.....	24
A.	Détermination du pouvoir réducteur du fer : FRAP (Ferricreducing antioxydant power).....	24
B.	Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	27
C.	Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	28
II.2.5.2	Evaluation du pouvoir antimicrobien des Extraits des feuilles de Thuya de berbérie.....	29
A.	Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme).....	29
B.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé.....	30
Chapitre III : Résultats et discussion		
III.1	Teneur en eau	31
III.2	Rendement de l'extraction	31
III.3	Résultats de l'étude phytochimique	32
III.4	Résultats de l'activité antioxydante et antiradicalaire	34
III.4.1	Résultats du pouvoir réducteur du fer : FRAP (Ferricreducing antioxydant power).....	34
III.4.2	Résultats de l'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	35
III.4.3	Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	37
III.5	Résultats de l'activité antimicrobienne.....	39
III.5.1	la technique aromatogramme.....	39
III.5.2	La technique de contact direct en milieu gélosé	41
Conclusion		43
Référence bibliographique.....		45

Annexe

Introduction

Le thuya de Berbérie, *Tetraclinis articulata* (Vahl) Master, espèce résineuse, de la famille des Cupressacées, constitue un élément important dans la végétation forestière nord-africaine puisqu'il couvre plus d'un million d'hectare (EL Mouridi, 2011), en dehors de son aire nord-africaine, on ne rencontre que deux stations limitées, l'une dans la province de Carthagène en Espagne et l'autre à Malte (Achhal *et al.*, 1985).

Cet arbre joue un rôle socio-économique important dans le domaine de l'artisanat, et ce, grâce à son bois de grande valeur employé en ébénisterie et à son écorce riche en résine dont les extraits sont utilisés dans la fabrication de certains vernis (Zahir *et al.*, 2020).

Différentes parties de Thuya sont employées en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques. Il est principalement utilisé contre les fièvres infantiles, les infections respiratoires et intestinales, les douleurs gastriques, le diabète et l'hypertension (Ziyyal *et al.*, 1997 ; Touayli, 2002).

Ces utilisations révèlent que les extraits et les huiles essentielles (HE) de *T. articulata* possèdent des composés actifs qui exercent de nombreuses activités biologiques (Dane *et al.*, 2016 ; El Jemli *et al.*, 2016 ; Montassir *et al.*, 2017 ; Rached *et al.*, 2018 ; Sadiki *et al.*, 2018).

C'est dans ce sens que ce travail revêt un intérêt capital. Il consiste à mettre en valeur quelques effets biologiques de l'extrait éthanolique des feuilles de *T.articulata*, particulièrement les activités antimicrobiennes et antioxydantes, ainsi que l'étude qualitative des métabolites secondaires de la plante.

Nous avons structuré le présent mémoire de fin d'études en trois chapitres :

- Le premier chapitre consiste en une présentation globale du thuya de berbérie, et la composition chimique des extraits des feuilles, l'utilisation médicinale et thérapeutique de la plante. Ainsi que les métabolites secondaires de la plante.
- Le deuxième chapitre englobe l'expérimentation, il comporte le screening phytochimique et la mise en valeur des activités antimicrobiennes et antioxydantes.
- Le troisième chapitre est consacré sur les résultats obtenus.

Enfin, une conclusion et des perspectives ont été dégagées sur l'ensemble des résultats.



Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. Présentation de thuya de berbérie

I.1.1. Historique

L'installation du *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast en Méditerranée occidentale remonte au Tertiaire, ère au cours de laquelle son aire était importante en Europe centrale. Il est ainsi le dernier survivant de la forme qui s'étendait jusqu'au Groenland à l'époque jurassique et qui peuplait encore l'Europe occidentale au Tertiaire (**Maire, 1952**).

Le thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*), a été décrit par Vahl en 1791, sous le nom de *Thuya articulata* = *Callitris articulata* (Vahl) Link ; par la suite il a été reporté au genre *Tetraclinis* par Maire en 1926.

Les botanistes arabes ont connu et décrit l'arbre bien avant Vahl. Le médecin botaniste andalou Ibn al-Baitar, qui a vécu en 12^{ème} siècle a décrit « Araar » et ses propriétés thérapeutiques dans son ouvrage « Kitāb al-Jamil-Mufradat al-Adwiya wa-l-Aghdhiya » qui fait partie des manuscrits les plus anciens, il a même annoncé que d'autres médecins musulmans ayant vécu avant lui comme Avicenne, connaissaient l'arbre et ces vertus médicinales (**Benyamina ,2019**).

Aussi, Quezel et Santa (1962-1963), rattachent l'espèce au genre *Callitris* qui a été décrit par Vent en 1808. Ce dernier lui donne le nom de *Callitris quadrivalvis* Vent. La plupart des flores actuelles (Flore pratique du Maroc, Flore de Tunisie, Med-checkliste, ...) rattachent d'ailleurs l'espèce au genre *Tetraclinis*. C'est le seul représentant de ce genre en Afrique du Nord.

Galiber (1844), signalait que les essences qui se trouvaient en plus grande abondance dans les régions de l'Afrique septentrionale pendant l'ère tertiaire étaient : le chêne vert, l'olivier, l'orme, le frêne, le chêne liège, l'aulne, le pin d'Alep et le thuya articulata. Malheureusement, la régression de l'aire du thuya de Berbérie est frappante car cette essence, constituait dans l'Antiquité des peuplements étendus en Cyrénaïque et se trouvait même dans l'oasis de Siwa, en plein désert lybique (**Quezel-Santa, 1962**).

Au Maroc, le thuya de Berbérie au Jbel Amsitten en province d'Assaouira est parmi les essences les plus anciennes du monde méditerranéen, dont les ancêtres seraient apparus dès le commencement de l'ère tertiaire (**Mhirt et al., 1999**).

Depuis longtemps, les populations de l'Atlas occidental gemmaient le thuya pour obtenir la gomme sandaraque, une résine utilisée en pharmacie et dans l'industrie des vernis. Ce produit était entièrement exporté par voie maritime, à partir de Mogador (Essaouira) vers l'Europe et les Etats-Unis (Auclair, 1993).

I.1.2. Description botanique

Il s'agit d'un arbre de forme conique-pyramidale, monoïque à croissance très lente, pouvant atteindre 15 m de hauteur avec un tronc de 1m de diamètre, très souvent petit et buissonnant (Maire ,1952). L'écorce est rugueuse, de couleur brune-grisâtre, montrant des stries longitudinales. Il possède des brindilles terminales fines, flexibles, aplaties et d'un aspect articulé (Esteve Selma *et al.*, 2017) (Figure 01).



Feuilles

Branche



A : Aspect général de *Tetraclinis articulata* dans son milieu naturel
Station de Hamdania, Le 01/03/2022

B : Aspect d'un tronc développé de *Tetraclinis articulata*
<https://murcianatural.carm.es>

Figure 01 : Aspect général de thuya de berbérie

Les feuilles sont opposées paraissant verticillées par 4, longuement soudées à la tige (dont chaque entre-nœud est ainsi enveloppé par 4 feuilles), à partie libre squamiforme courte, aiguë (Maire ,1952). Les jeunes spécimens présentent des aiguilles glauques juvéniles qui se distinguent par leur forme élargie et pointue de 0,5 à 1 cm de long (Esteve Selma *et al.*, 2017) (Figure 02).



C : Rameaux feuillés de *Tetraclinis articulata*
Station de Hamdania. Le 01/03/2022

D : Feuilles de *Tetraclinis articulata*
<https://www.biodiversidadvirtual.org>

Figure 02 : les feuilles de *Tetraclinis articulata*

Les inflorescences masculines correspondent à des cônes ovales de 0,6-1 de long cm et celles féminines possèdent 4 valves ou squames et des ovules érigées en forme de bouteille. Les deux types d'inflorescences sont disposés de manière terminale sur les brindilles apicales des rejets annuels (**Figure 03**).



E : Cônes mâles (pollinifères) de
Tetraclinis articulata

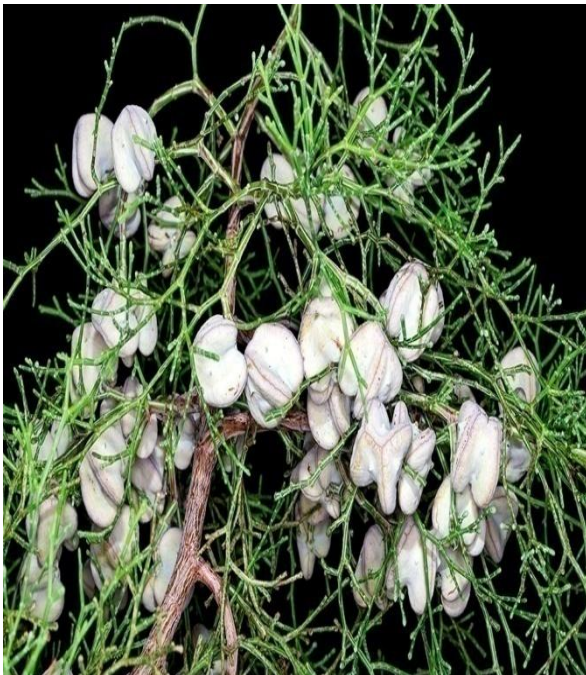
<https://www.monaconatureencyclopedia.com>

F : Fleur femelle (ovulifère) de *Tetraclinis articulata*

<https://www.monaconatureencyclopedia.com>

Figure 03 : Fleur mâle et femelle de *Tetraclinis articulata*

Les fruits sont des strobiles ligneux de 8-15 mm de largeur qui, au fur et à mesure qu'ils mûrissent, changent de couleur, depuis le vert couvert du blanc visqueux au brun rougeâtre ou violacé. La forme tétragonale du fruit est caractéristique et elle s'ouvre en 4 valves, deux larges en forme de cœur et deux plus étroites à fente externe plus prononcée à la base. Les graines pourvues d'ailes sub-scarieuses de 5-8 mm de largeur présentent des poches résineuses périphériques. Se trouvant en nombre et en position variable dans le fruit de (4 à 8) (Esteve Selma *et al.*, 2017).(Figure 04)



G : Strobile de *Tetraclinis articulata*

[https://www.monaconatureencyclopedia.c](https://www.monaconatureencyclopedia.com)

[om](https://www.monaconatureencyclopedia.com)



H : Strobile (Cône femelle a maturité) de *Tetraclinis articulata*

[https://www.monaconatureencyclopedia.c](https://www.monaconatureencyclopedia.com)

[om](https://www.monaconatureencyclopedia.com)

Figure 04 : Cône femelle a maturité de *Tetraclinis articulata*

I.1.3. La signification des l'origine du nom

L'espèce *Tetraclinis articulata* a plusieurs noms a travers le monde, parmi ces nomenclatures on distingue :

Noms scientifiques : *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters ; *Callitris quadrivalvis* Vent. ; *C. articulata* (Vahl) Link (**Quézel et Santa, 1962**).

En Français : Thuya de Berbérie (Haddad *et al.*, 2006 ; Lahsissene *et al.*, 2009 ; Bourkhiss *et al.*, 2012) ; Thuya de Maghreb (Maatoug *et al.*, 2004).

En Arabe : Ahrar ou Berbouch (Quézel et Santa, 1962 ; Buhagiar *et al.*, 2000) ; Arar (Buhagiar *et al.*, 2000).

En anglais : Cartagena cypress (Buhagiar *et al.*, 2000) ; Barbary Thuya (El Bouhtoury-Charrier *et al.*, 2009).

I.1.4. Systématique

Selon la classification phylogénétique actuelle (**APG, 2009**), *Tetraclinis articulata* est classé comme suit :

Règne : plantae

Embranchement : spermatophytes

Sous embranchement : gymnospermes

Division : piniphyta

Classe : pinopsida

Ordre : pinales

Famille : cupressaceae

Genre : tetraclinis

Espèce : *Tetraclinis articulata* (Vahl Mast).

I.1.5. Aire de répartition du thuya

Le thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*), est une espèce endémique de l'Afrique du Nord et en particulier des pays du Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie). Il se rencontre aussi dans quelques secteurs très ponctuels, au Sud-est de l'Espagne (région d'Almeria) et sur l'île de Malte (**Rikili, 1943 ; Quézel, 1980**). En Espagne, il a été classé dans la catégorie «en danger» sur la liste rouge de l'UICN (**Achhal et al., 1985 ; Uicn, 2011**), (**Figure 05**).

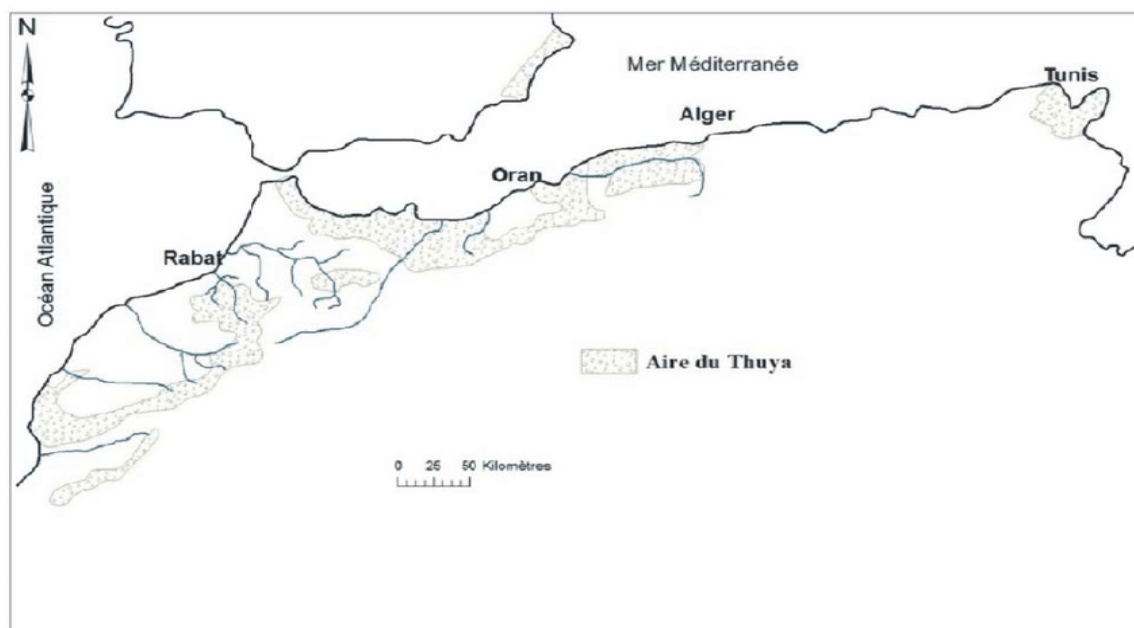


Figure 05: Aire de répartition du Thuya de Berbérie en méditerranée Sud-occidentale : Carte de Quézel et Santa (1962), modifiée par Hadjadj (2016)

En Algérie, les *Tetraclinis* couvraient une superficie de 161.000 ha vers le début du siècle dernier (**Benabdelli, 1992**), alors que vers la fin de cette période les chiffres avancés par l'administration des forêts varient entre 143.000 ha et 130.000 ha (**Letreuch-Belarouci, 1991**). QUEZEL et SANTA (1962, 1963) ont mentionné que le thuya est très commun dans le secteur oranais, assez commun dans le secteur algérois et dans le sous-secteur des hauts plateaux et qu'il est très rare dans la grande Kabylie. On les trouve dans les circonscriptions de Cherchel, Média, Ténès et Theniet el Had sous forme de vieux taillis dégradés par les incendies ; ils se trouvent aussi dans les régions de Delles et Lakhdaria sous forme de pieds isolés et de petits bouquets, puis dans la vallée de l'oued sahel vers M'Chandella sur le piémont sud de Lalla Khadîdja du Djurdjura (**Lapie et Maige, 1914 ; Hadjadj-Aoul, 1995**).

I.1.6. Ecologie de la plante

➤ Conditions climatiques

Le thuya est une essence de lumière thermophile et xérophile caractérisée par ses faibles exigences en eau, de 300 à 500 mm par an. Son optimum écologique est lié à l'étage bioclimatique semi-aride à variante tempérée douce, chaude et très chaude ; il se développe aussi en étage sub-humide à variante chaude, douce et tempérée sur sol filtrant (calcaire) ; il craint les froids humides et préfère les expositions chaudes (**Quezel, 2000**).

En Algérie, le thuya occupe essentiellement l'étage semi-aride, étage le plus répandu d'ailleurs en Oranie. Il peut déborder dans l'étage subhumide à la faveur de l'altitude (**Hadjadj-Aoul, 1988**).

➤ Conditions lithologiques

Sur le plan lithologique, le thuya se trouve aussi bien sur les roches siliceuses que sur les roches calcaires et les sols fersiallitiques meubles plus au moins profonds. Il a cependant une préférence pour les sols calcaires, qui sont plus aérés et plus **chauds** (**Boudy, 1952 ; Hadjadj-Aoul, 1995**).

En Algérie, on le rencontre sur tous les étages, sur le crétacé, dans les régions de l'Ouarsenis et Ténès, sur le jurassique dans celles de Frenda, Saida et Tlemcen et sur le quaternaire et pliocène dans celle de Mostaganem (**Boudy, 1950**).

➤ Altitudes

Le thuya ne se trouve pas aux hautes altitudes, mais plutôt sur les plateaux de basses et moyennes altitudes. Sa limite supérieure est de 1.800 mètres (Grand Atlas), sa limite inférieure est variable, il s'observe localement jusqu'au bord de la mer, mais dans le grand Atlas, il n'apparaît qu'à 800 ou 1000 mètres d'altitude (**Boudy, 1952**).

En Algérie, le thuya s'observe jusqu'à une altitude maximale de 1.400 m en montagne sèche (Djebel Reguirat), on le trouve jusqu'au bord de la mer dans la région de Mostaganem (Alcaraz, 1982), (Hadjadj-Aoul, (1995) et Hadjadj-Aoul (1999) soulignent qu'en haute altitude, le thuya se trouve écarté par des essences plus résistantes aux froids tels que le chêne vert et le genévrier oxycèdre.

I.1.7 Composition chimique des différents organes de *Tetraclinis articulata*

La composition chimique des huiles essentielles de tous les organes de *T.articulata* a été identifiée par différents chercheurs (Bourkhiss *et al.*, 2007 ; Buhagiar *et al.*, 2000 ; Chikhounne *et al.*,2013 ; Djouahri *et al.*,2015 ; Barrero *et al.*,2005) , par contre les extraits bruts de l'arbre a été moins étudié.

I.1.7.1 Les huiles essentielles

➤ L'huile essentielle des Feuilles

Les feuilles de Thuya de berbèrie ont bénéficié de plusieurs études chimiques qui ont porté sur la séparation et l'identification d'une diversité de substances naturelles. Plusieurs compositions chimique sont décrite avec une variation quantitative de trois constituants majoritaire : acétate de bornyl, le camphre et q-pénene, (Barrero *et al .*, 2005), (Bourkhis *et al.*,2015), (El jemli *et al.*, 2016). Ensemble, ces trois composés constituent plus des trois quarts de la composition totale, (Bourkhiss *et al*, 2007). (Tableau I)

L'huile essentielle du *Tetraclinis articulata* d'Algérie est essentiellement riche en monoterpènes et sesquiterpènes ; un seul diterpène oxygéné, l'A-biétal, a été identifié dans l'huile essentielle de la région d'Ouled Mimoun (1,09%). Néanmoins, il faut signaler que c'est la première fois qu'un diterpène a été identifié dans une huile essentielle de *T. articulata* (Benali Toumi *et al .*, 2011).

➤ L'huile essentielle des cônes

Les cônes de Thuya de berbèrie ont bénéficié de trois études chimiques réalisées en trois régions différentes: Malte, Algérie et Tunisie.

Les études réalisées en Malte (Buhagiar *et al.*, 2000) et en Algérie (Chikhounne *et al.*, 2013), rapportent une composition chimique dominée par l' α -pinène (68,2% en Malte, 57,5-75,0% en Algérie), suivi par le limonène (16,6% et 10,6-20,9%) en dernier le β -myrcène (3,6-10,6%) dans l'huile essentielle d'Algérie En revanche l'échantillon tunisien comporte une composition chimique totalement différente : p-cymèn-8-ol (10,4%), β -phellandrene (8.1%), trans-pinacarveol (6.1%), carvone (5,3%), acétate de fenchyle (5,1%). (Tékaya-Karoui *et al.*, en 2007). (Tableau I)

➤ L'huile essentielle des graines

Buhagiar et *al.*, 2000, ont été les seuls à étudier la composition chimique des HE des graines de Thuya de berbérie de Malte (Msida), certains composés majoritaires ont été repérés : l' α -pinène (46,3%), et le limonène (25,3%).

➤ L'huile essentielle du bois

La composition chimique du bois et de la sciure du bois de Thuya de berbérie ont été étudiées par plusieurs chercheurs dans différentes régions : (**Tableau I**)

- ❖ **En Algérie** : Djouahri et *al.* (2015) ont étudié la composition chimique des huiles essentielles du bois récolté dans quatre régions (Zeddine; Mansourah; Zekkar et Tazoult). Les composés majoritaires, sont le camphène (15,5-18,8%), cédrol (10,5-12,7%) et α -acorénol (8,2-10,4%), suivi par le (Z)- β -ocimène (5,1-5,5%), le β -cédrene (4,0-5,1%), l' α -acoradiène (5,3-6,1%) et trans-totarol (5,5-6,5%).
- ❖ **Au Maroc** : des recherches ont été faites sur la même partie de *T.articulata* originaire du Maroc (Amsa) et ont montré une absence totale de camphène et une présence de cédrol (28.2%) et le 1,7-di-épi-cédrol (17.9%), (Barrero et *al.*, 2005)
- ❖ Par contre Zrira et *al.* (2005) ont déterminé une composition chimique un peu différente des deux échantillons de la sciure du bois récoltés dans les régions de khemisset et Aoulouz (Maroc). Les composés majoritaires sont respectivement : Le carvacrol (21,3%, 36,4%), l' α -cédrene (10,1%, 13,1%), le cédrol (1,0%, 7,3%) et le terpinène-4-ol (2,8%, 6,0%) .

➤ L'huile essentielle des branches

La composition des huiles des branches de *Tetraclinis articulata*, diffère d'un pays à l'autre. Les huiles marocaines contiennent principalement l' α -pinène (30.2%), limonène (22.3%), cédrol (5.4%), acétate de bornyle (4.8%), (Bourkhiss et *al.*, 2007) . Les huiles d'origine maltaise diffèrent légèrement par leur teneur en α -pinène (31.0%), Acétate de bornyle (19.1%), camphène (18.1%), (**Buhagiar et al., 2000**).

Par contre l'échantillon tunisien présentait des compositions différentes de celle de Malte et de Maroc avec une teneur élevée en Camphène (43.2%) et (Z)- β -ocimène (11.7%) (**Tékaya-Karoui ., 2011**). (**Tableau I**).

I.1.7.2 Les extraits bruts

➤ Les extraits des feuilles de *T.articulata*

En 2014 Zidane et al a analysé les extraits des feuilles de *T.articulata* obtenus par 4 solvants différents (l'hexane, dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, méthanol), il a signalé la présence de six composés sans fournir leurs pourcentages. La HPLC DAD de différents extraits confirme la présence de myricitrine, catéchine et de quercitrine et montre un troisième pic qui est l'afzéline (kaempférol-3-rhamnoside). De plus, le chromatogramme HPLC de l'extrait d'acétate d'éthyle a montré deux autres pics principaux, il s'agissait de amentoflavone (3',8'' biapigénine) et cupressuflavone (8, 8'' biapigénine).

En 2016 Dane et al ont effectué des analyses sur l'extrait méthanolique des feuilles de *T.articulata* par HPLC-MS, portant sur la séparation et l'identification d'une diversité de substances naturelles. Les composés majoritaires identifiés sont : Myricetin-rhamnoside (42.76%), quercetin-3-O-rhamnoside (31.05 %), catéchine (18.83%).ces composés ont été identifiés auparavant par Zidane et al en 2014.

➤ Les extraits des cônes de *T.articulata*

Djouahri et al en 2014 a analysé l'extrait méthanolique de *T.articulata* caractériser la présence de 6 composés majoritaires : l'acide tannique, l'acide caféique, acide gallique, rutine et quercetine.

Tableau I : Composition chimique de l'essence de certaines parties de *Tetraclinis articulata*.

Pays	Partie utilisé	Composé majoritaire	Auteur et date de publication
Algérie (Blida)	Feuille	Acetate de bornyl(40.2%),q-pinene (24.9%)	(Chikhouné <i>et al.</i> , 2013)
Algerie (Ouled Mimoun, Telemcen)	Feuille	Camphre (31.6%), acetate de bornyle (17.7%),bornéol (14.3%)	(Benali Toumi F <i>et al.</i> , 2011)
Tunisie (Bou kornine)	Feuille	Acetate de bornyle (31.4%),q-pinène (24.5%),camphre (20.3%)	(Ben jemia <i>et al.</i> , 2012)
Maroc (khemisset)	Feuille	Acetate de bornyl (30.7%),q-pinène (23.5%),camphre (17.3%)	(Bourkhiss <i>et al.</i> , 2007a)
Algerie (blida et tipaza)	Cône	q-pinène (57.5%/75%), limonène (10.6%/20.9%)	(Chikhouné <i>et al.</i> , 2013)
Tunisie	Cône	p-cymen-8-ol (10.4%), β -phyllandrene (8.1%),trans-pinacarveol (6.1%),	(Tékaya-Karoui <i>et al.</i> , en 2007).
Malte (Msida)	Cône	q-pinene (68.2%),limonene (16.6%)	(Buhagiar <i>et al.</i> , 2000)
Maroc	Branche	q-pinene (30.2%), limonene (22.3%),widdrol (5.4%),acétate de bornyle(4.8%)	(Bourkhiss <i>et al.</i> , 2007b)
Tunisie	Branche	Camphene (43.2%),(Z)- β -ocimene(11.7%)	(Tékaya-Karoui ., 2011)
Malte(Msida)	Branche	q-pinène (31.0%),Acetate de bornyle (19.1%), ,camphre (18.1%)	(Buhagiar <i>et al.</i> , 2000)
Maroc (Amsa)	Bois	cedrol (28.2%) et le 1,7-di-épi-cedrol (17.9%),	(Barrero <i>et al.</i> , 2005)
Maroc (khemisset et Aoulouz)	Bois	Carvacrol (21.3%, 36.4%), l' α -cédrene (10.1%, 13.1%), le cédrol (1,0%, 7,3%) et le terpinèn-4-ol (2,8%, 6,0%)	(Zrira <i>et al.</i> , 2005)
Algerie (Zeddine; Mansourah; Zekkar et Tazoult)	Bois	le camphène(15,5-18,8%), cédrol (10,5-12,7%) et α -acorénol (8,2-10,4%)	(Djouahri <i>et al.</i> , 2015)
Malte (Msida)	Graines	l' α -pinène (46,3%), et le limonène (25,3%).	(Buhagiar <i>et al.</i> , 2000)

I.1.8. Importance de thuya

➤ En médecine traditionnelle

Depuis les temps les plus anciens, le thuya est réputé pour ses vertus culinaires et médicinales. Au Maroc, la macération de feuilles et de cônes fructifères est largement utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des diarrhées et des intoxications alimentaires. Humectée d'eau de rose, elle est utilisée contre l'inflammation des yeux (**Bellakhdar, 1997**). En usage local, le thuya est traditionnellement utilisé contre les eczéma (**Bouayyadi *et al.*, 2015**), les brûlures (**Salhi *et al.*, 2019**). Le macérât de la plante est utilisé pour le traitement du diabète et de l'hypertension (**Jouad *et al.*, 2001**; **Eddouks *et al.*, 2002**; **Tahraoui *et al.*, 2007**). Dans la pharmacopée algérienne, les graines et les feuilles sont communément utilisées contre le diabète (**Buzabata, 2013**; **Hamza *et al.*, 2019**).

➤ En l'économie et l'écologie

Le peuplement de Thuya assure un rôle très important dans la vie économique et sociale des populations. Dans le secteur artisanal, le bois de *T. articulata*, par sa rusticité et sa résistance aux agents de destruction est considéré comme excellente matière de technologie pour l'ébénisterie dure et moderne qui supporte très bien l'écrasement. Au Maroc, le travail du bois de Thuya est localisé principalement dans la ville d'Essaouira, ce secteur emploie environ 1690 ouvriers (**Toumi, 2009**). Les racines, surtout des vieux arbres, constituent un bois précieux et parfumé très utilisé en ébénisterie (**Uicn-Med et Agir, 2011**).

I.2. Généralités sur les métabolites secondaires

Le métabolisme secondaire regroupe les voies de synthèse de composés qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance de la plante. Ils interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement (soutien, protection contre les UV, défense, mise en place de symbiose, attraction d'insectes utiles pour la pollinisation...). Certains de ces composés participent à la défense contre les bios agresseurs (**Herms et Mattson, 1992**). Les métabolites secondaires se classent en de nombreux groupes, dont quatre grands groupes chez les plantes : les composés phénoliques, les saponines, les alcaloïdes et composés azotés et les composés terpéniques.

I.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un grand groupe de composés phénoliques naturels omniprésents dans le règne végétal (Seyoum *et al.*, 2006). Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chromoplastes (Guignard, 1996) in (François, 2010).

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. (Fuhrman *et al.* , 1995).

Selon Tim *et al.*(2005) il y a une étroite concordance entre la structure des flavonoïdes et l'activité antibactérienne.

I.2.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels colorés que l'on retrouve dans les plantes vasculaires. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Une caractéristique importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques peuvent en témoigner (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

I.2.3. Les tanins

Les tanins sont un groupe de polyphénols hydrosolubles de poids moléculaire intermédiaire à élevé. Les tanins sont des molécules hautement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles avec les glucides, les protéines et les enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments (Alkurd *et al.*, 2008).

Il existe deux groupes de tanins différents par leur structure : Les tanins hydrolysables sont généralement composés d'une molécule de noyau de polyol, généralement du glucose, mais d'autres molécules de base peuvent inclure le glucitol, le hammamelose, l'acide shikimique, l'acide quinique et le quercitol .

Les tanins condensés : également appelés proanthocyanidines, sont constitués d'oligomères ou de polymères de sous-unités flavan-3-ol. Les sous-unités flavan-3-ol présentes dans la tomodensitométrie varient, mais celles qui se produisent couramment comprennent la catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine (**Naumann *et al.*,2017**).

I.2.4. Les alcaloïdes

Un alcaloïde est une substance organique hétérocyclique azotée, à caractère alcalin et présente une structure complexe. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, ayant des propriétés thérapeutiques et toxiques. Par exemple, la caféine, la mescaline, nicotine, l'atropine, la cocaïne (**Ouahes, 1996**). L'importance de ces molécules réside dans le fait qu'ils possèdent de puissantes activités biologiques même à faibles doses (**Bouchelta *et al.*,2005**). Elles sont utilisées par exemple comme antidépresseurs, stimulants, anesthésiques, antitumoraux, antipaludiques (**Bruneton, 1999**) in (**Moualek,2018**).

I.2.5. Les saponines

Les saponines sont une classe structurellement diversifiée de composés présents dans de nombreuses espèces végétales, qui sont caractérisées par un squelette dérivé du précurseur 30-carbone oxydosqualène auquel les résidus de glycosyle sont attachés (**Vincken *et al.*,2007**).

Fondamentalement, on distingue les saponines stéroïques et les saponines triterpéniques dérivant tous deux biosynthétiquement de l'oxyde de squalène (**Manach *et al.*, 2004**).



Chapitre II

Matériels et méthodes

Objectif de l'étude

Notre travail consiste à une évaluation de l'activité antioxydant des extraits des feuilles de *Tetraclinis articulata* . provenant de la région de oued el merdja –El hamdania-. Cette analyse à été complétée par une étude phytochimique , et par une évaluation de l'activité antimicrobienne.

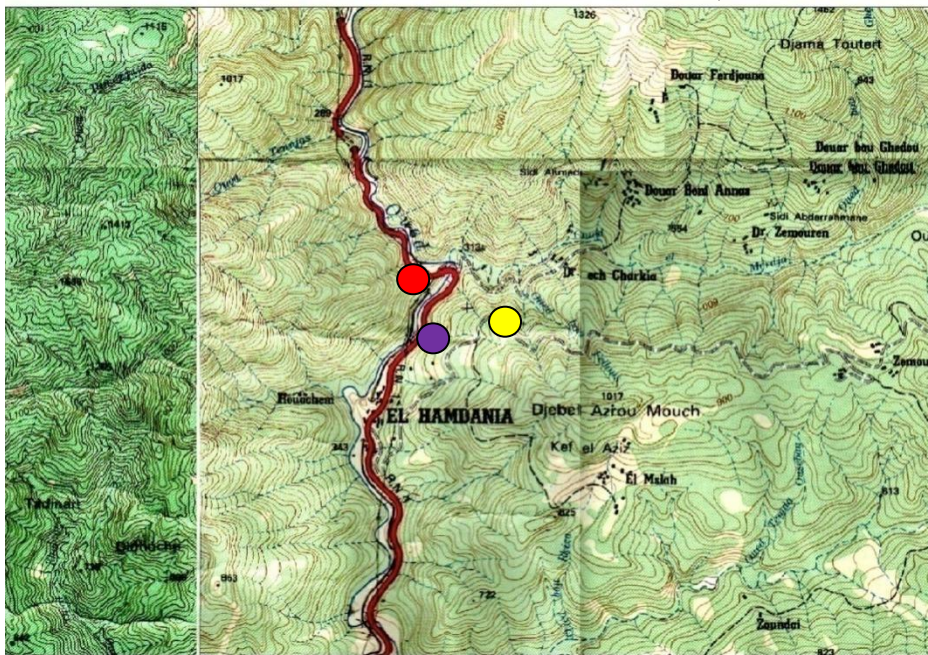
- Ce travail a été réalisé dans une durée de 5 mois au sein de :
 - Laboratoire de biotechnologie Environnement et santé faculté SNV , USDB-1-
 - Laboratoire de PFE de l'institut des sciences vétérinaire, USDB-1-
 - Laboratoire de PFE au niveau du département de biotechnologie ,USDB-1-
 -

➤ Présentation de la zone d'étude

La station d'Oued Elmerdja se situe administrativement dans la wilaya de Blida, à l'Ouest du Parc National de Chéra. C'est une région montagneuse localisée à 400 m d'altitude entre x : 2°46'29.69" et y : 36°22'34.82. Elle est limitée au nord par Djbel Beni Anass, à l'Est par Cherkia , à l'Ouest Djbel Mozaia et au Sud par Djbel Sidi rabeH (PNC, 2015) (Figure 06).

➤ Programme de la sortie

Nous avons réalisé une seule sortie sur terrain le 01 mars 2022, en compagnie du responsable de la station d'Elhamdania, cette sortie a concerné la récolte des échantillons des feuilles de 3 arbres différents de Thuya de berberie, et la prise des données géographiques de la station (Figure 06).



• **Légende**

- Station oued el merdja.
- Station Oued Chiffa (commune Hamdania).
- Station Oued chiffa (Commune de chiffa).

Échelle : 1/ 50 000°

Figure 06 : Localisation des stations d'études secteur Elhamdania (PNC ,2015)

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Matériel végétal

L'étude a concerné la partie aérienne de *Tetraclinis articulata* (feuilles), récoltée dans son habitat naturel (**Tableau II**).

Le tableau II regroupe l'ensemble des informations sur le lieu, la période, le climat et la partie végétale récoltée.

Tableau II : Caractéristiques de la collecte des feuilles de *T.articulata*

Lieu de la récolte	La station Oued Elmerdja Elhamdania (Blida)
Altitude	400m
Date de la récolte	1/03/2022
Heure de la récolte	11h-12h.30
Climat	Ensoleillé
Température	23°C
Quantités	3,3kg
Parties récoltés	Feuilles

❖ Broyage de la plante

Après la récolte, les feuilles ont été lavées à l'eau pour les débarrasser de la poussière et d'autres particules, puis séchées dans l'étuve à 70°C en prenant soin de les peser régulièrement jusqu'à la stabilisation de la masse. Ensuite, les feuilles séchées sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique, et conservées à sec dans des boites en verre, à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

II.1.1.2 Matériel microbien

Les souches bactériennes sur lesquelles nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'extrait, ont été sélectionnées en fonction de leurs pouvoirs pathogène.

Il s'agit de deux bactéries a Gram (-) et deux a Gram (+), qui sont : *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et une levure *Candida albicans*, provenant du laboratoire de microbiologie du CHU de Blida, et le laboratoire d'hygiène de Blida (Tableau III).

Tableau III : Origines des souches utilisées pour l'étude du pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique.

Les souches bactériennes		ATCC/TSA	Source
Bactérie a Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	43300	Laboratoire de microbiologie (Hôpital de Blida CHU)
	<i>Bacillus subtilis</i>	6655	Laboratoire d'hygiène (wilaya de Blida)
Bactérie a Gram (-)	<i>Echerichia coli</i>	25922	Laboratoire de microbiologie (Hôpital de Blida CHU)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Laboratoire de microbiologie (Hôpital de Blida CHU)
Levure	<i>Candida albicans</i>	6623	Laboratoire d'hygiène (wilaya de Blida)

II.1.2. Matériel non biologique

L'appareillage, les verreries et accessoires en plus des réactifs sont mentionnés dans l'Annexe I.

II.2. Méthodes

Nous avons divisé ce travail en deux parties, la première porte sur l'identification des métabolites secondaires, la deuxième sur les activités biologiques. Le plan général du protocole est illustré par la **Figure 07**.

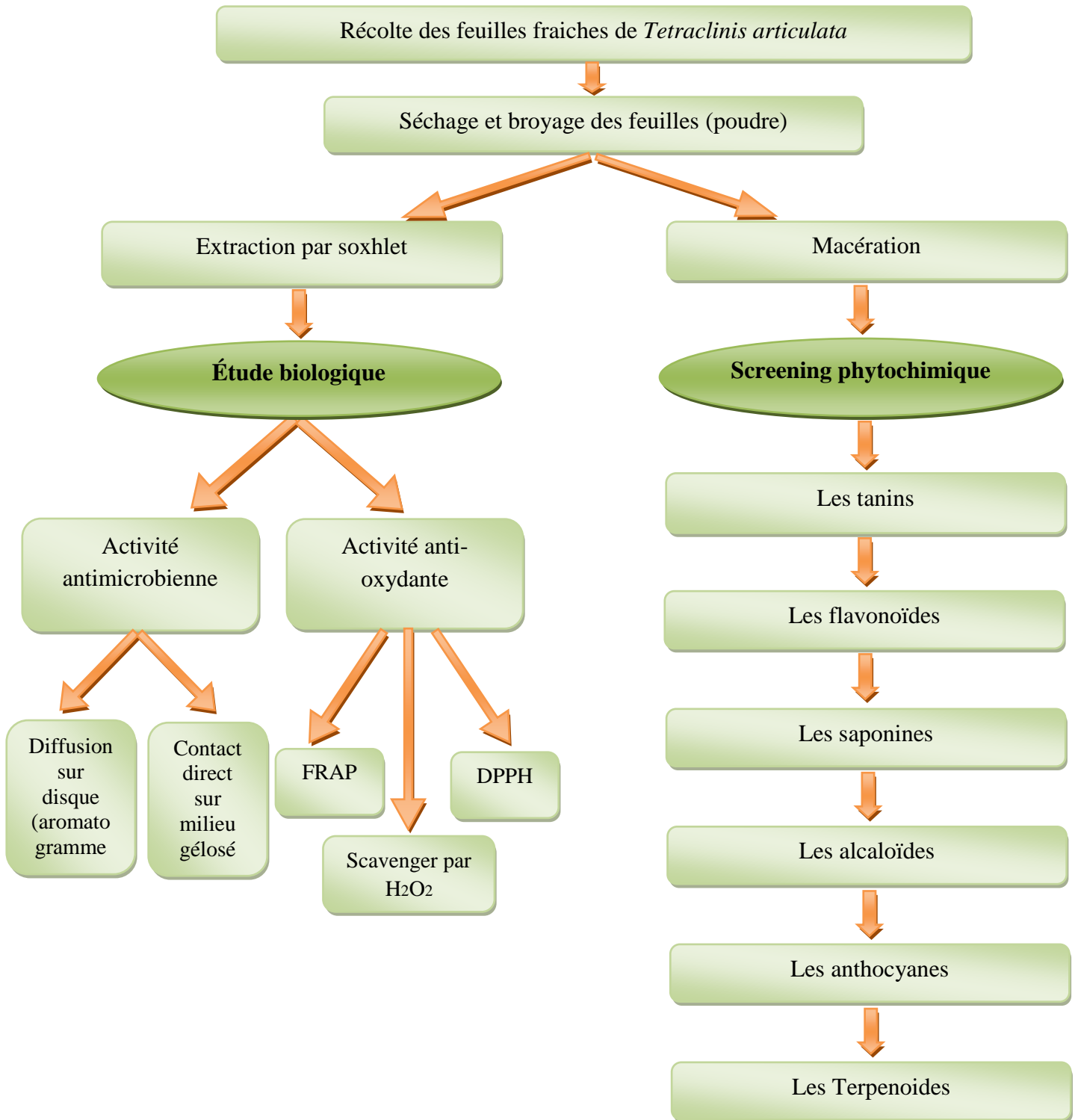


Figure 07 : Schéma générale des procédures expérimentales effectuées sur *T.articulata*

II.2.1. Détermination de la teneur en eau

Selon la Pharmacopée Européenne, (2005) le pourcentage du poids d'eau est exprimé par rapport au poids initial par la formule suivante :

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

H% : Taux d'humidité en pourcentage.

P1 : Poids frais moyen en gramme.

P2 : poids sec moyen en gramme.

II.2.2. Préparation de l'extrait éthanolique

La préparation de l'extrait éthanoliques des feuilles de *T.articuata* a été réalisée dans le laboratoire de PFE à l'aide d'un appareil de type Soxhlet.

30 g de la poudre pesée est introduite dans une cartouche placée dans le réservoir de Soxhlet surmonté d'un réfrigérant porté par un ballon contenant 300 ml de solvant d'extraction qui est l'éthanol est porté à ébullition, puis condensé avec le condenseur à boules dans le réservoir à siphon, contenant la poudre dans une cartouche de papier épais. Le réservoir se remplit et dès que le niveau du solvant est à hauteur du coude 2, il se vidange automatiquement et retourne dans le ballon de récupération : l'opération est répétée plusieurs fois pendant 4h jusqu'à épuisement total de la plante (épuisement pour 13 cycles (siphonage)).

Le contenu du ballon (Solvant plus matières solubilisées) est séparé à l'aide du l'évaporateur rotatif pour éliminer le solvant.

L'extrait brut obtenu a été récupéré dans des tubes protégé par un papier aluminium, à l'abri de la lumière et conservé à une température de 6°C.

II.2.3. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction par Soxhet est calculé, il s'exprime en pourcentage par rapport au poids du matériel végétal de départ, et est déterminé par l'équation suivante (**Clémence et Dongmo, 2009**).

$$R = \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{éch}}} * 100$$

R %=Rendement (en%).

M ext : Est la masse de l'extrait après l'évaporation du solvant en g.

M éch : Est la masse de l'échantillon végétale en g.

II.2.4. Screening phytochimique

➤ Préparation du macérat

25 g de poudre de feuille de *T.articulata* sont mis à macérer dans 100 ml d'éthanol pendant 72 h. ensuite filtrés à l'aide d'un papier filtre et passés dans le rota vapeur jusqu'à l'élimination totale du solvant (éthanol).

Les extraits éthanoliques ont été soumis à divers tests phytochimiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques contenus dans ces extraits éthanoliques, en utilisant la méthode standard basée sur des réactions colorimétriques et de précipitation (**Houmenou et al., 2018**).

II.2.4.1. Identification des flavonoïdes

À 1 ml de l'extrait on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) concentré et quelques milligrammes de magnésium (Mg). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition de la couleur rouge ou orange (**Karumi et al., 2004**).

II.2.4.2. Identification des Tanins

Pour détecter la présence des tanins, on ajoute à 2 ml de l'extrait quelques gouttes de FeCl₃ à 1%. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiqes (tanins condensés) (**Karumi et al., 2004**).

II.2.4.3. Identification des saponines

À 5ml de l'extrait on ajoute 10 ml d'eau distillée, le tout est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Puis, le mélange est laissé au repos pendant 15 min.

La persistance de la mousse d'au moins 1 cm pendant 15 min indique la présence des saponines (N'Guessan *et al.*, 2009).

II.2.4.4. Identification des anthocyanes

On prend 5 ml de macération auquel on ajoute 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4 1M), puis 5 ml d'ammoniaque (NH_4OH 1M). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut confirmer la présence d'anthocyane (Dialo, 2005).

II.2.4.5. Identification des alcaloïdes

On fait humecter 5g de poudre végétale avec 20 ml d'ammoniaque (NH_4OH 1M), qu'on laisse macérer pendant 24 h dans 50ml d'un mélange éther/chloroforme (3v/1v), le filtrat est épuisé par de l'acide chlorhydrique (HCl 2N). A 1 ml du filtrat, on ajoute quelques gouttes de réactif de Dragendorff, l'apparition d'un précipité blanc jaunâtre, indique la présence d'alcaloïde (Pharmacopée URSS, 1991).

II.2.4.6. Identification des terpénoïdes

À 5 ml de l'extrait on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré, la formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence de terpénoïdes (Edeoga *et al.*, 2005).

II.2.5 Evaluation des activités biologiques

II.2.5.1 Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire

A. Détermination du pouvoir réducteur du fer : FRAP (Ferricreducing antioxidant power)

➤ Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant, cette technique est développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}).

En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance de milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Hubert, 2006).

➤ Protocole

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 µg/ml) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. ensuite, on ajout 2.5ml d'acide trichloracétique ($C_2HCl_3O_2$) à 10% pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tpm pendant 10 min. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (Chlorure ferrique) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé. Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant, l'acide ascorbique, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi, 1965). (Figure 14).

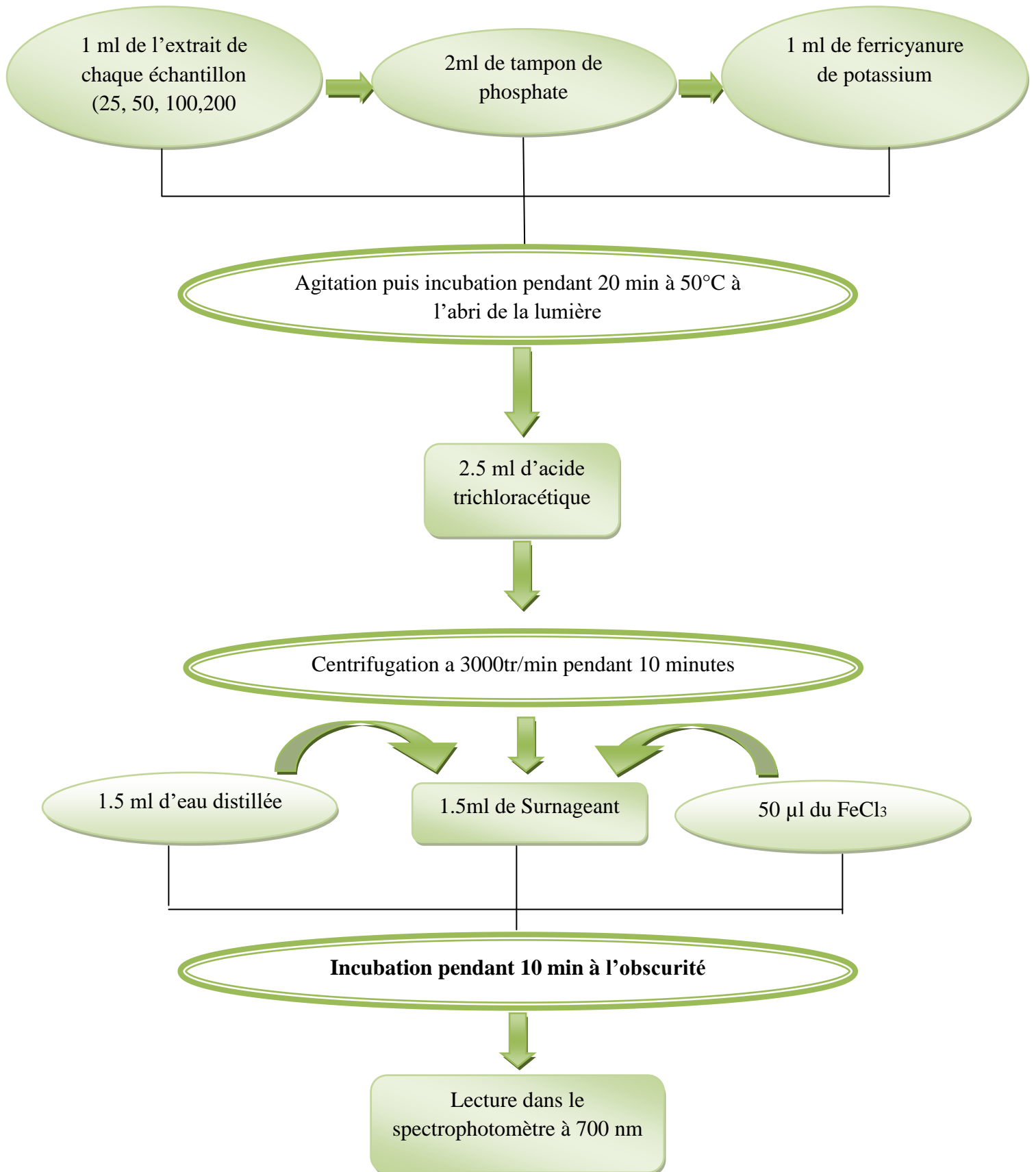


Figure 14: Protocole expérimental de l'activité antioxydante par FRAP

B. Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

➤ Principe

La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène est déterminée suivant la méthode rapportée par Atmani et *al.*, (2009). Le principe de la réaction est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène par un antioxydant qui va faciliter sa décomposition en molécule d'eau. Le pourcentage d'inhibition du H₂O₂ est calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger du H}_2\text{O}_2 = (\text{AT} - \text{AE} / \text{AT}) \times 100$$

Où:

AT : absorbance du témoin.

AE : absorbance de l'échantillon.

➤ Protocole

Un volume de 2 ml d'extrait à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 µg/ml) est mélangé avec 1,2 ml de la solution de H₂O₂ (40mM) qui est préparé dans un tampon phosphate (pH= 7,4). L'absorbance de H₂O₂ est mesurée à 230nm après 10 min de réaction (**Figure 15**).

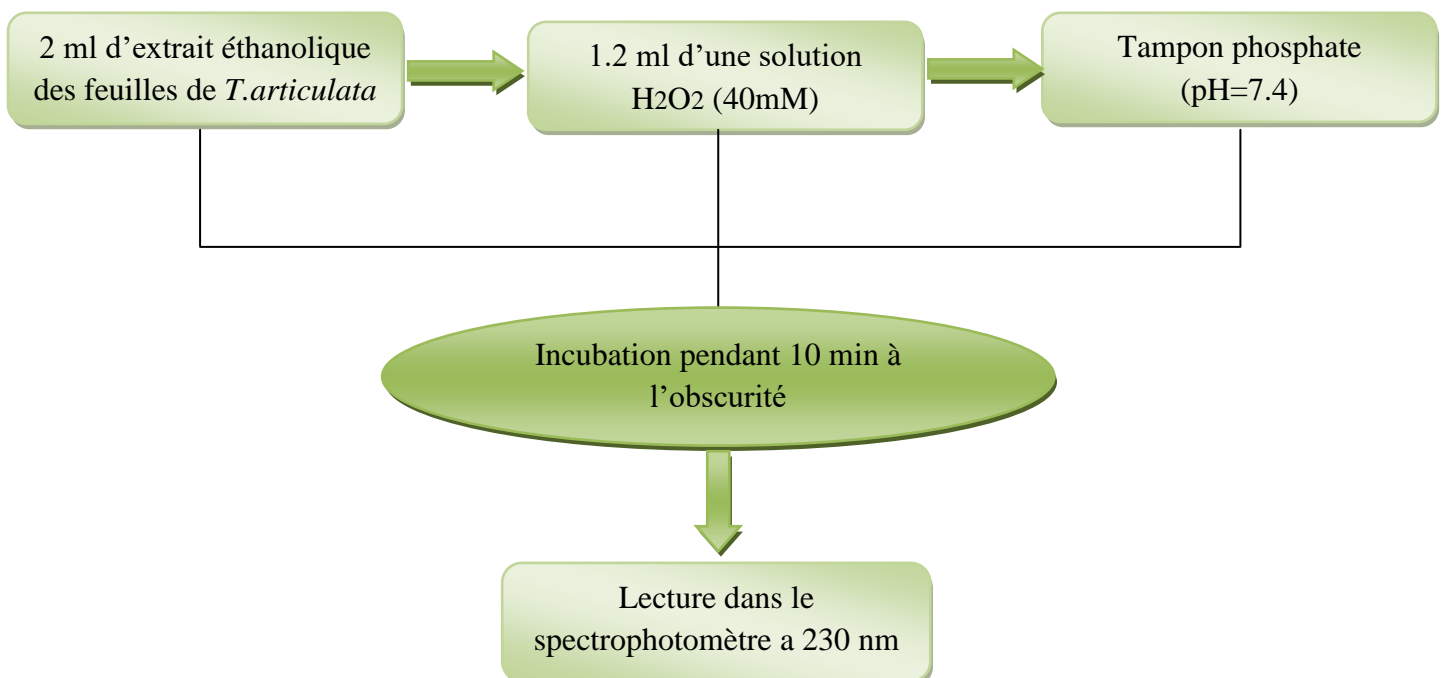


Figure 15 : Protocole expérimental de l'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène

C. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

La méthode du DPPH est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire, le DPPH-H. Ainsi, plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort (**Belmokhtar, 2015**).



➤ Protocole

L'activité antioxydante des différents extraits est mesurée selon la méthode de (**Lopes Lutz et al., 2008**). 25µl des différentes concentrations de l'extrait sont ajoutés à 1 ml de la solution éthanolique du DPPH (0,025g/l). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé, en mélangeant 25µl d'éthanol avec 1 ml de la solution éthanolique de DPPH, après 30min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 515nm.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration (**Bougandoura, 2013**).

➤ Calcul des CI₅₀

CI₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale de DPPH.

II.2.5.2 Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits des feuilles de Thuya de berbérie

Le choix des techniques utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne a une grande influence sur les résultats, l'insolubilité des constituants des extraits dans l'eau et leur volatilité constituent les principales difficultés rencontrées.

Les techniques classiques mises au point *in vitro* permettent soit de caractériser le pouvoir antimicrobien de le quantifier en termes de concentration minimale inhibitrice (CMI) ou de concentration minimale microbicide (CMB) (bactéricide). Ces méthodes sont appliquées en milieu solide ou en milieu liquide (**Fernandez et Chemat, 2012**).

Nous avons testé les extraits des parties aériennes (feuilles) vis-à-vis des souches microbiennes par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et ensuite, nous avons déterminé la concentration minimale (CMI) en milieu solide.

A. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

Cette méthode est reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies. Il s'agit d'une méthode qualitative permettant de tester la sensibilité ou la résistance des microorganismes aux extraits par contact direct. Pour effectuer ce test, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 15 µl de l'extrait et de 5 µl de DMSO sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri (3 disques par boîte), préalablementensemencées en surface en nappe avec 1 ml de suspension microbienne pendant 10 à 15 min. L'excédent de l'inoculum est éliminé par aspiration.

Les milieux de cultures utilisées sont la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud (SAB) pour les levures, les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18-24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures. Pendant l'incubation, les germes se développent sous forme de colonies visibles à l'œil nu. L'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition du développement microbien. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (mm), disque inclus.

Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (**Chao *et al.*, 2000 ; Andrews, 2001 ; Wilkinson, 2006**). La sensibilité aux différents extraits est mesurée en fonction des diamètres des zones d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour le diamètre moins sensible de 6 mm ; sensible (+) pour un diamètre entre 9-14 mm ; très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm (**Ponce *et al.*, 2003**) (**Figure 16**).

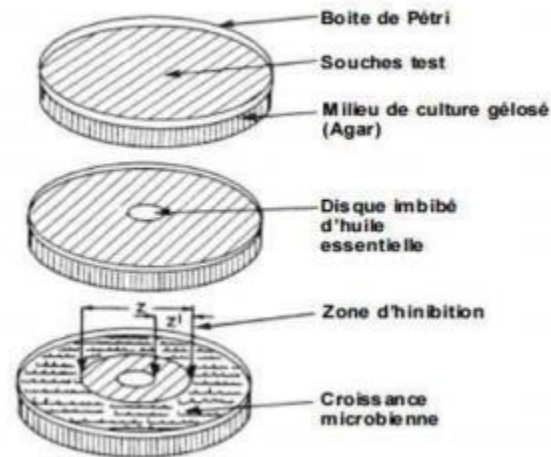


Figure 16 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

B. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé

En bactériologie médicale, chaque souche est caractérisée en termes de résistance ou de sensibilité aux antibiotiques au moyen de deux valeurs : le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique ou d'extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne. Fréquemment, la CMI n'est pas bactéricide, les cellules d'inoculum sont capables de se développer après repiquage sur milieu exempt du composé inhibiteur.

La CMI est la plus faible concentration requise pour l'inhibition complète de l'organisme. Le test est effectué après 24 ou 48 heures d'incubation (Fernandez et Chemat, 2012).

Pour déterminer les CMI des extraits vis-à-vis des souches sensibles, nous avons utilisé la méthode de contact direct en milieu gélosé. Les extraits sont déposés dans les boîtes de Pétri afin d'effectuer une gamme de concentration de 2 à 6 $\mu\text{l/ml}$ dans la gélose Mueller-Hinton, avec pour chaque concentration, son équivalent en DMSO.

Le mélange est alors homogénéisé et ensuite refroidi. Après une durée d'incubation de 24 h à 37°C, la lecture des résultats se fait par la présence ou l'absence de la croissance microbienne.



Chapitre III

Résultats et discussion

III.1 Teneur en eau

Le test d'humidité est réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau des feuilles de la plante étudiées, et de connaître la durée de séchage. Les résultats des analyses de nos échantillons sont affichés dans la figure 17 et le tableau V (**Annexe V**).

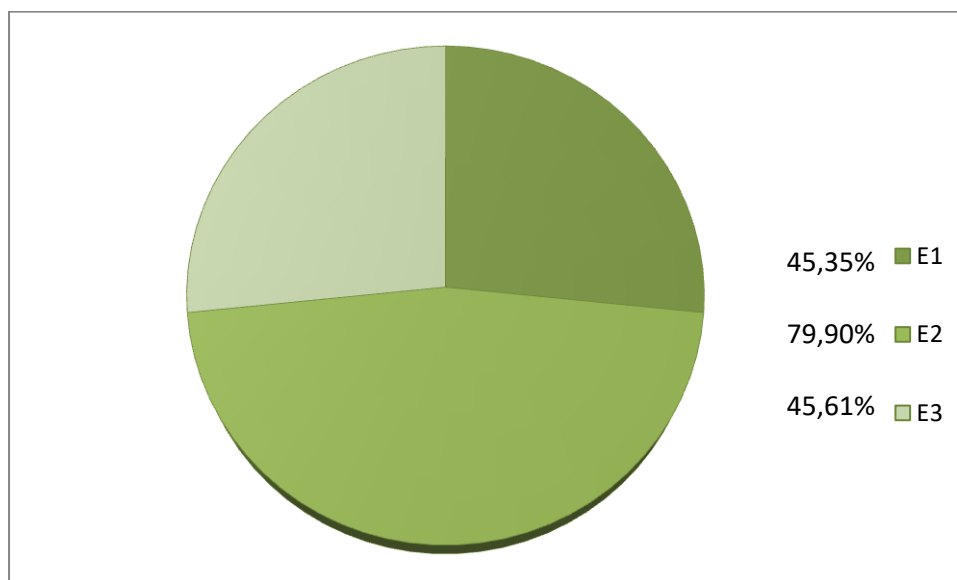


Figure 17 : Teneur en eau des feuilles de *T.articulata*

Les résultats obtenus dans notre étude ont révélé une forte teneur en eau allant de 45% à 79%, ce qui signifie que presque la moitié de la plante fraîche est constituée d'eau. Nos résultats sont différents de ceux trouvés par (**Bourkhiss et al., 2009**), qui rapportent des valeurs variant entre 12.50% et 38.40%. Cette variation entre nos résultats et ceux de (**Bourkhiss et al., 2009**) est simplement due à l'influence de la saison de récolte, l'origine géographique et les facteurs environnementaux.

III.2 Rendement de l'extrait éthanolique

L'extrait éthanolique de *T. articulata* a été obtenu par l'extraction des feuilles broyées à l'aide d'un appareil de type soxhlet. Le rendement est calculé par rapport à la matière végétale sèche. Les résultats sont regroupés dans le tableau VI (**Annexe V**) et illustrés par la figure 18.

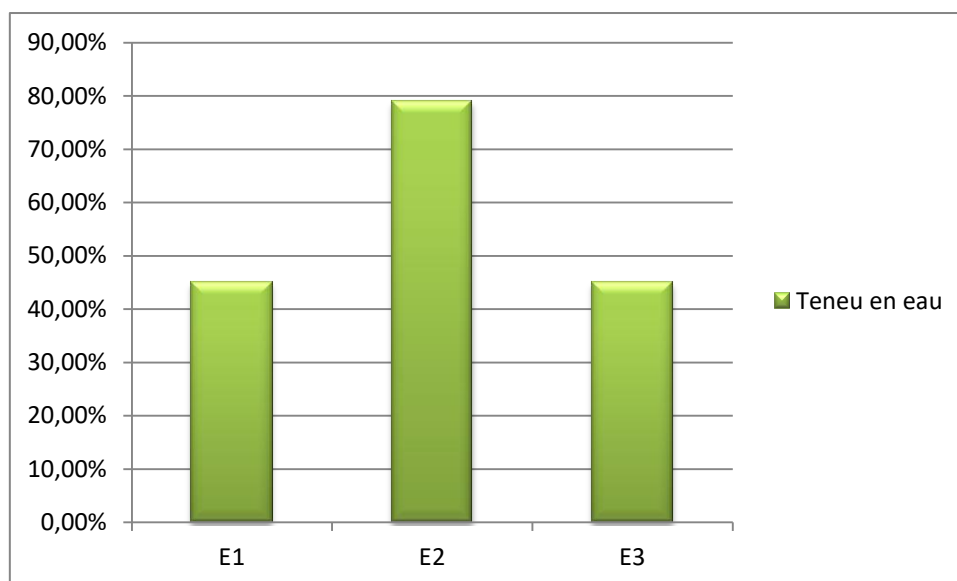


Figure 18 : Rendement de l'extrait éthanolique

Nous constatons à la lecture de cette figure que les rendements de l'extrait éthanolique des feuilles de *T.articulata* est d'une moyenne de 39%. Ce rendement est supérieur à celui cité par Djouahri *et al.*, 2013 .En effet, ce chercheur lors d'une étude réalisée sur les extraits méthanolique des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) prélevées dans la région de Ain-Defla, région d'El-Attaf du centre ouest de l'Algérie, a obtenu un rendement de 35.9%. Cette différence peut être due à la nature du solvant utilisé.

III.3 Résultats du screening phytochimique

Le screening phytochimique effectué sur l'extrait éthanolique des feuilles de Thuya de berbérie a permis de mettre en évidence la présence de différents groupes de métabolites secondaires dans la plante.

La phytochimie qualitative est basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques testées sur l'extrait de la plante étudiée. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VII et la figure 19 (**Annexe III**).

Tableau VII : Résultats de quelques métabolites secondaires trouvés dans l'extrait éthanolique de *T.articulata*

Métabolite	Réactif	Réaction	Résultat
Les tanins catechique	FeCl ₃	Coloration bleu verdâtre	+
Les flavonoïdes	HCl +Mg	L'appariation d'une couleur rouge	+
Les saponines	Eau distillée	L'apparition d'une mousse	+
Les alcaloïdes	Dragendroff	Pas de coloration	-
Les anthocyanes	H ₂ SO ₄ +NH ₄ OH	Pas de coloration bleu violacé	-
Les terpenoïdes	chloroforme +AC sulfurique	L'apparition d'une coloration marron	+

Les résultats du test qualitatif affiché dans le tableau VII et la figure 19 (**Annexe III**), ont révélé la présence de quelques métabolites secondaires principalement les tanins catéchiques, et également les flavonoïdes, saponines et terpenoïdes, et une absence totale des alcaloïdes et anthocyanes.

Les analyses phytochimiques effectuées sur les extraits des végétaux sont une étape préliminaire ayant une grande importance puisqu'elle révèle la présence des constituants connus pour leurs activités biologique et leurs vertus médicinales.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature de Djouahri *et al* en 2013 qui confirment la présence des Tanins, flavonoïdes, saponines et l'absence totale des alcaloïdes dans leur extraits méthanoliques des feuilles de *T.articulata* .

El jemli en 2020, à rapporté la présence des flavonoïdes, les tanins et les saponines, tandis que les anthocyanes et les alcaloïdes n'ont pas été mis en évidence dans l'extrait aqueux des feuilles de *T.articulata* issue de Maroc. **Rached *et al.* (2010)**, qui ont démontré la présence des flavonoïdes dans l'extrait aqueux de *T. articulata* issu de l'Algérie.

Ces tests phytochimiques réalisés sur l'extrait de thuya ont confirmé la présence de plusieurs familles de composés. La richesse de cet extrait en composés chimiques actifs pourrait expliquer leur implication dans de nombreuses activités biologiques, essentiellement dans la prévention du stress oxydatif (**Sayah *et al.*, 2017**). En effet, ils sont considérés comme des antioxydants forts et ils se révèlent plus efficaces que les vitamines C ou E et les caroténoïdes (**Mamta *et al.*, 2012**).

III.4 Résultats de l'activité antioxydante et antiradicalaire

III.4.1 Résultats du pouvoir réducteur du fer : FRAP (Ferricreducing antioxydant power)

Les valeurs d'absorbance de l'acide ascorbique (la solution de référence), ainsi que les valeurs d'absorbance de l'extrait des feuilles de *T.articulata*, sont représentées dans le tableau VIII (**Annexe V**), et illustré par la **figure 20**.

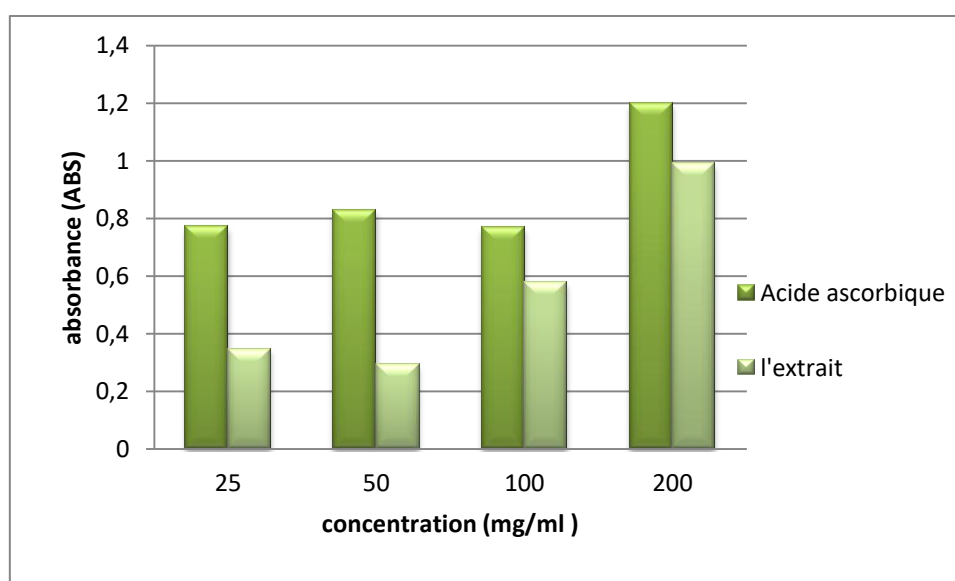


Figure 20 : Pouvoir réducteur du fer : FRAP (Ferricreducing antioxydant power) en fonction de différentes concentrations

- toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) .

D'après la figure 20 le tableau VIII (**Annexe V**) et, l'activité antioxydante de l'extrait des feuilles de *T.articulata* par le test du potentiel réducteur du fer a révélé que ce dernier exerce une importante activité, les résultats montrent que ce pouvoir augmente avec l'augmentation de la concentration, Néanmoins, l'extrait présente une activité antioxydante nettement inférieure à celle de l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique.

Le pouvoir réducteur de nos extraits a été mesuré selon la méthode **d'Oyaizu (1986)**, et déterminé par la mesure de l'absorbance à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur (**Ozsoy et al., 2008 ; Ribeiro et al., 2008**). Les résultats obtenus montrent que l'extrait présente un pouvoir réducteur du fer de manière dose-dépendante.

Donc, le pouvoir réducteur de l'extrait pourrait être lié à la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes qui ont la capacité de donner des électrons. Les résultats de cette activité sont en accord avec ceux de (**Ben Jemia et al., 2013**) où l'extrait aqueux à 80% d'acétone était le plus fort réducteur de radicaux avec une valeur CI50 de 1,5 mg/ml, par rapport à l'huile essentielle ; mais ces résultats ont également montré que les feuilles de *T. articulata* avaient une capacité réductrice très faible lorsqu'elles par rapport à l'acide ascorbique standard (CI50 1/4 40 mg/ml).

Kumarappan et al. (2012), ont signalé que les donneurs d'électrons pourraient réagir avec les radicaux libres pour les transformer en produits plus stables, c'est ce qu'on appelle pouvoir réducteur.

III.4.2 Résultats de l'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Les valeurs d'absorption de l'acide ascorbique qui est utilisé comme référence, ainsi que les valeurs d'absorption de l'extrait éthanolique des feuilles de *T.articulata*, est illustré par la figure 22 et représenté par le tableau IX (**Annexe V**).

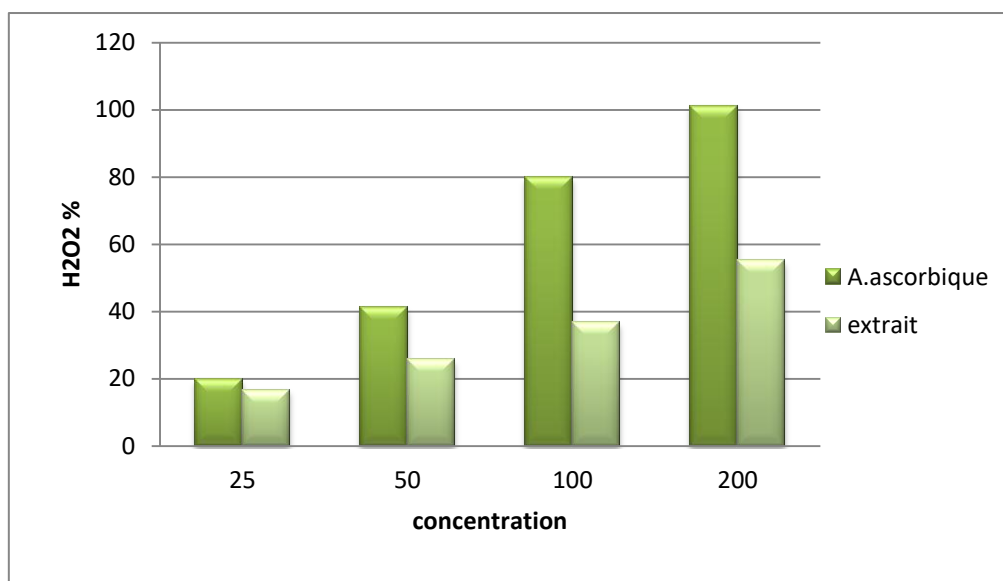


Figure 22 : Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en fonction de différentes concentrations

- Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3).

Le test H₂O₂ choisi pour cette étude, est basé sur le piégeage du radical libre stable H₂O₂ par une molécule anti radicalaire, ce qui entraîne sa décomposition en molécule d'eau (**Rajeshwar et al., 2005 ; Wang et al., 2008**) selon la réaction suivante :



Selon la figure, l'activité scavenger du H₂O₂ augmente avec l'élévation de la concentration de l'extrait et l'antioxydant desynthèse (Acide ascorbique).

Les résultats obtenus montrent que les pouvoirs antiradicalaires les plus élevés sont obtenus avec le standard (A. ascorbique) ceci se traduit par des pourcentages d'inhibition qui varient entre 19.67 à 101.16 % à des concentrations allant de 25 à 200 µg/ml. Tandis que l'extrait présente des pourcentages d'inhibitions plus au moins moyen par rapport au standard varies entre 16.67 à 55.2 %.

De là on peut déduire que notre extrait est dose-dépendant (Augmente avec l'augmentation des concentrations).

➤ Détermination des CI₅₀ de l'extrait et de standard

Tableau X : CI₅₀ de l'extrait et du standard contre H₂O₂.

Standard et extrait	CI ₅₀ µg/ml
Extrait de thuya	170.85
acide ascorbique	70.58

- Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3).

D'après le tableau X et la figure 22 l'extrait de *T.articulata* a exprimé un faible effet scavenger contre le radical H₂O₂, avec une CI₅₀ de 170µg/ml, qui présente une différence par rapport à l'acide ascorbique avec un CI₅₀ de 70µg/ml.

Par ailleurs, beaucoup d'études ont démontré que les extraits de plantes ont une meilleure activité antioxydante comparés à la vitamine C (**Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Espigares *et al.*, 2004, Oboh, 2005**).

Comparativement au standard, d'après les résultats des différentes activités antiradicalaires de l'extrait vis-à-vis des radicaux utilisés dans cette étude, les CI₅₀ qui expriment le potentiel antiradicalaire le plus important sont obtenues contre le radical H₂O₂. Ce qui pourrait être expliqué par la nature du milieu réactionnel. La polarité et l'hydrophobicité des antioxydants qui s'ajoutent aux facteurs mentionnés ci-dessus, présentant ainsi des rôles importants dans l'activité antioxydante (**Wu *et al.*, 2007**). Frankel et Meyer (2000) ont montré que les antioxydants polaires sont plus actifs dans des milieux aqueux tandis que les antioxydants non polaires sont plus actifs dans des milieux hydrophobes que dans des milieux aqueux.

III.4.3 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (diphényl picryl hydrazyl) en solution dans l'éthanol. L'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH conduit à une décoloration de ce dernier qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du produit ajouté (**Bourkhiss *et al.*, 2010**).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits testés et du standard (Acide ascorbique) exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans les figures 25 et le tableau XI (**Annexe V**).

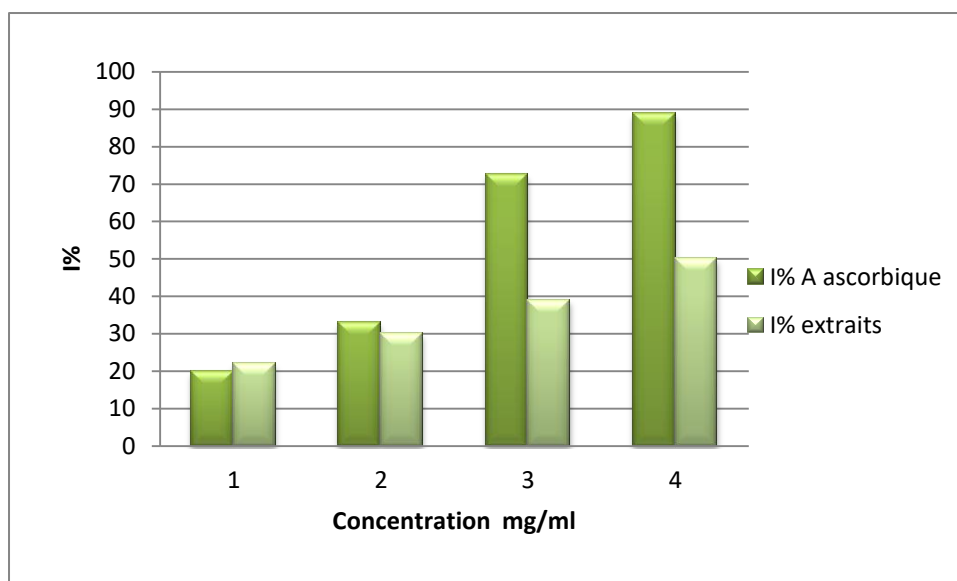


Figure 25 : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

- Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3).

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH de l'extrait éthanolique de la plante étudiée varie entre 22 et 50%, d'après la figure (25), on remarque que les pourcentages d'inhibition du radical DPPH augmentent au fur et à mesure que la concentration de l'extrait et de standards augmente.

A la concentration 25 et 50 $\mu\text{g/ml}$, l'activité de l'extrait révèle une activité anti radicalaire de 22 et 30 % respectivement, qui sont proche de celle montrée par l'acide ascorbique (20 et 33%).

➤ Détermination de CI_{50} de l'extrait

CI_{50} est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de CI_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (**Pokorny et al., 2001**). La concentration de l'échantillon essentiel pour inhiber 50% du DPPH radicalaire a été calculée par la régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations d'extraits préparés.

Les valeurs de CI_{50} trouvées pour l'extrait étudié et l'acide ascorbique sont représentées dans le tableau XII.

Tableau XII : Valeurs des CI₅₀

Standard et extrait	CI ₅₀ µg/ml
Extrait de thuya	185.06
acide ascorbique	84.53

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que l'extrait testé possède une activité anti radicalaire avec un CI₅₀ de 185.06 µg/ml. En comparaison avec l'antioxydant standard (l'acide ascorbique) qui a démontré un CI₅₀ de 84.53 µg/ml, nous constatons que ce dernier possède une activité antioxydante moyenne par rapport à l'antioxydant de référence. Nos résultats sont différents de ceux trouvés par **Sliti *et al* en 2015** où l'activité étaient importantes par rapport à la propriété antioxydante de deux étalons commerciaux, les extraits méthanol/eau ont les valeurs CI₅₀ les plus faibles (22,8 et 23,3 µg/ml pour 50 % de méthanol et 80 % de méthanol, respectivement) et l'antioxydant le plus efficace. Ces extraits présentent une activité très proche à celle du contrôle γ -tocophérol (CI₅₀ = 21,2 µg/ml), et ils ont liée cette activité au contenu phénolique présent dans cette plante.

III.5 Résultats de l'activité antimicrobienne

Suite à la détermination des propriétés antioxydantes de *Tetraclinis articulata*, nous avons entrepris de tester l'activité antibactérienne aussi par la technique d'aromatogramme et une méthode qualitative de diffusion sur gélose.

III.5.1 Technique de l'aromatogramme

Après incubation des boîtes Pétries à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pour les levures, nous avons mesuré les zones d'inhibition et interprété les résultats.

Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne sont classés par l'échelle de (**Ponce *et al.*, 2003**).

- ✓ moins sensible (-) >6 mm
- ✓ sensible (+) 9-14 mm
- ✓ très sensible (+ +) 15-19 mm
- ✓ extrêmement sensible (+++) <20 mm

Etant donné la non miscibilité des extraits dans l'eau et les milieux aqueux utilisés en bactériologie, un solvant apolaire « DMSO » est utilisé pour préparer les différentes dilutions. Comme il peut par lui-même exercer un effet antibactérien nous avons effectué un témoin sans extrait. Nous avons obtenu un résultat négatif avec ce témoin, ce qui signifie que le solvant choisi ne présentant aucun effet sur la croissance des bactéries à étudier. Ceci est en accord avec plusieurs travaux utilisant le DMSO lors du criblage de l'activité antibactérienne des extraits d'*Inula viscosa* (Maoz et Neeman, 2000).

L'objectif de présent travail est de mettre en évidence par la technique d'aromatogramme l'activité antibactérienne de l'extrait de thuya vis-à-vis des souches de référence et multi résistantes.

Les résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode d'aromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de *T. articulata* obtenus par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes sont regroupés dans le tableau XIII et illustrés par la figure 29 (Annexe IV).

Tableau XIII : Diamètre des zones d'inhibition des souches bactériennes par la technique aromatogramme

Souches utilisées		ATCC/TSA	Concentration de l'extrait			
			25	50	100	200
Bactérie a Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	9mm	10mm	13mm	16mm
	<i>Bacillus subtilis</i>	TSA 6655	Abs	10mm	Abs	8 mm
Bactérie a Gram (-)	<i>Echerichia coli</i>	ATCC 25922	Abs	Abs	Abs	7 mm
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Abs	Abs	Abs	Abs
Levure	<i>Candida albicans</i>	TSA 6623	Abs	15mm	10mm	10mm

Comme on peut le voir à partir De la figures 29 (Annexe IV) et le tableau XIII, l'extrait a inhibé la croissance de *S. aureus.* , *B subtilis*, et *C albicans* ou les diamètres d'inhibition enregistrés allant de 8 à 16 mm. Ce qui indique la sensibilité et l'effet bactéricide de cette extrait vis-à-vis ces souches.

Parmi les souches testées, *E. coli* et *P. aeruginosa* présente une résistance vis-à-vis l'extrait de thuya ou elle enregistre une absence d'une zone d'inhibition. Comparativement au travail de (Djouahri et al ., 2013) ou Les résultats montrent qu' *Escherichia coli* est sensible aux extraits avec une zone d'inhibition allant de 10,50 mm à 14,17 mm, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* se sont avérées résistante aux extraits testés.

Nous constatons également que l'activité n'est pas proportionnelle à la concentration de l'extrait.

III.5.2 La technique de contact direct en milieu gélosé

L'efficacité de l'extrait des feuilles sur les souches microbiennes sensibles a été déterminée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de contact direct en milieu gélosé. nous avons sélectionné quatre souches microbiennes à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et une levure : *Candida albicans*. Les résultats sont rapportés dans le tableau XIV et la figure 30 (Annexe IV).

Tableau XIV : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) en extrait de *Tetraclinis articulata* relatives aux souches sensibles

Souches microbiennes		extrait de <i>Tetraclinis articulata</i> (µl/ml)
GRAM(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
	<i>Bacillus subtilis</i>	1
GRAM (-)	<i>Echerichia coli</i>	2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
levure	<i>Candida albicans</i>	0.5

Interprétation globale des résultats montre que les valeurs des CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition, les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMI sur les souches correspondantes.

C'est le cas de l'extraits a une concentration de 2 µl/ml qui s'est révélée particulièrement très efficace contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI très faible, inférieure ou égale à 1,0 µl/ml.

En outre, nous avons constaté une activité modérée de l'extrait de thuya vis-à-vis des deux souches, *Echerichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec de de CMI 2 µl/ml. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Boussaid Maghnia., (2017)** qui avancent que les extraits de *Tetraclinis articulata* présentent une importante activité contre *S. aureus* avec des CMIs variant entre 0,5 et 2,0 µl/ml.

A green scroll graphic with a dark green border and a lighter green fill. The scroll is unrolled, showing a central area where the word "Conclusion" is written in a black, serif font. The scroll has a vertical strip on the left side and a small tab on the right side.

Conclusion

Conclusion

Notre étude porte sur la valorisation d'une espèce largement distribuée en Algérie, en l'occurrence *Tetraclinis articulata* (Thuya de berberie). C'est une plante employée dans la médecine traditionnelle pour ses multiples propriétés thérapeutiques.

Les feuilles de *Tetraclinis articulata* .représentent le support végétal de notre travail. Les résultats ont montré que la teneur en eau des feuilles est estimée à 57% et le rendement de l'extraction à 39,18%.

L'étude phytochimique de la macération montre la présence des métabolites La phytochimie qualitative est basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques testées sur l'extrait de la plante étudiée. Enfin nous avons évaluées les activités antioxydante et antimicrobienne de notre extrait éthanolique.

L'activité antioxydante de l'extrait des feuilles a été abordée en appliquant trois méthodes : la méthode de réduction du fer (FRAP), la méthode de scavanger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH. Les résultats obtenus ont révélé une moyenne activité antioxydante pour l'extrait éthanolique des feuilles de *T.articulata* comparativement à l'acide ascorbique.

L'étude de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque, a montré que de l'extrait des feuilles de *T.articulata* est très active contre *S.aureus* qui est la souche la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire car elle fait partie du premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales, notamment active contre *Candida albicans* et *Bacillus subtilis* alors qu' *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* s'avère résistante vis-à-vis de l'extrait éthanolique de la plante

Avec la méthode par contact directe en milieu gélosé, nous avons constaté que l'extrait des feuilles a une bonne activité contre *Candida albicans* avec une CMI =0.5 µl/ml, pour *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* une CMI très faible de 1,0 µl/ml a été obtenue, nous avons constaté aussi une activité modérée vis-à-vis les deux souches, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec une CMI= 2µl/ml.

Afin d'approfondir tous les volets abordés dans ce travail, et de contribuer plus à la valorisation d'une ressource phytogénétique, nous proposons comme perspectives les points suivants :

- Etudier d'autres propriétés thérapeutiques telles que l'activité antifongique, diurétiques et Tester l'activité anti-inflammatoire et particulièrement l'activité antidiabétique de *Tetraclinis articulata* , ces activités biologiques répondent aux usages majeurs de la plante selon la médecine traditionnelle.
- Entreprendre une étude phytochimique de cette espèce afin d'isoler d'autres métabolites secondaires.
- Tester l'activité antimicrobienne avec d'autres gammes des souches microbiennes.

Références bibliographiques

Achhal, A., Barbero, M., Ech-Chamikh, S. (1985). Productivité du thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) dans le bassin versant du N'Fis, *Ecologia Mediterranea*, tome 11 n°2-3, 1985. pp. 201-212.

Alkurd, A., Hamed, T. R., Al-Sayyed H. (2008). Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan, *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 - 274.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (48) : 1, p: 5-16.

Atmani, D., Chahe, N., Berboucha, N., Ayouni, M. (2008). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants , *journal of Food Chemistry*, 112 (2009): 303–309.

Balasundram, N., Sundram , K., Samman, S.(2005). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, (99)1: 191-203.

Barrero, F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Quílez, J., Akssira, M., Mellouki F & Akkad S. (2005). Chemical Composition of the Essential Oils of Leaves and Wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, *Journal of Essential Oil Research*, 17:2, 166-168

Benali, Toumi F., Benyahia, M., Hamel, L., Mohamedi H & Boudaghen L . (2011). Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie, *Acta Botanica Gallica*, 158:1, 93-100.

Ben Jemia, M., Chaabane, S., Senatore, F., Bruno, M., Elyes Kchouk, M. (2013). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and extract of Tunisian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. (Cupressaceae). *Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters*, 27(16) : 1419-1430.

Benelhadj Djelloul, S. (2018). Rôle des symbioses végétales dans la réhabilitation de la sablière de Terga (Wiaya d'Ain temouchent). thèse de doctorat: Exploitation des Interaction Plantes-Microorganismes. Université d'Oran Ahmed Benbella, p : 23.

Références bibliographiques

Benyamina, A. (2019). étude enthonopharmacologique et caractérisation des composés phénoliques des organes aériens du *Tetraclinis articulata* (VAHL) masters de l'ouest algérien. thèse de doctorat : science de l'environnement. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, p : 11.

Bouchelta, A., Boughdad, A., & Blenzar A. (2005). Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L.(Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Homoptera: Aleyrodidae). *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 9(4), 259-269.

Bougandoura, A. F., Kadifkova P. T. (2013). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf. *Advances in Food Sciences*, 29 (3), 155-161.

Bourkhiss, M., Lakhlifi, T., Chaouch, A., & Ouhssine, M. (2015). *Intérêt de l'huile essentielle du thuya de Berberie. Phytothérapie*, 14(2), 109–111.

Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., Chaouch A. (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science*. 03, 232-242.

Bourkhiss, M., Hnach, M., Paolini, J. et Costa, J. (2010). Propriétés antioxydantes et antiinflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) masters du Maroc, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 79. 141 .

Boussaid, M. (2017). Caractérisation des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Thuya de Barbarie) de la région de Tlemcen et étude de leurs activités biologiques. Thèse de doctorat : Produits Naturels, Aspects Nutritionnels et Activités Biologiques. Université Abou Bekr Belkid-Tlemcen. p : 210 .

Buhagiar, I., Podesta, MTC., Cioni, PL., Flamini, G., Morelli, I. (2000). Essential oil composition of different parts of *Tetraclinis articulata*, *Journal of Essential Oil Research*, 12, 29-32.

Castaneda, O ,A., Pacheco-Hernandez, M. D. L., Paez-Hernández, M. E., Rodriguez, J. A et Galan-Vidal, C. A. (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food Chemistry* 113(4): 859-871.

Références bibliographiques

Chikhoune, A., Hazzit, M., Kerbouche, L., Baaliouamer, A., Aissat, K. (2013). Huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters: Composition chimique et activités biologiques. *Journal of Essential Oil Research*, 25,300-307.

Chao S.C., Young D.G., Oberg G.J. (2000). Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res*, 12: 639-649.

Dane, Y., Mouhouche, F., Canela-Garayoa, R., Delpino-Rius, A.(2016). Phytochemical Analysis of Methanolic Extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae) and evaluation of their biological activity for stored grain protection. *Arab J Sci Eng* 41, 2147-2158.

Diallo, D.A. (2005). Etue de la phytochimie et des activités bioogiques des *Syzygium guineense* willd (Myrtaceae). Thèse de doctorat : pharmacie. Université de Bamako. P : 100.

Djouahri, A., Boualem, S., Boudarene, L., Baaliouamer, A. (2015). Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Industrial Crops and Products* 63, 138–146.

Djouahri, A., Boudarene, L., Sabaou, N.(2013). Dépistage phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne de Extraits bruts de Feuilles *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters algérien, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 5(1); 45-50.

Djouahri A, Saka B, Boudarene L, Benseradj F, Aberrane S, Aitmoussa S, Chelghoum C, Lamari L, Sabaou N, Baaliouamer A. (2014). In vitro synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters with antibiotic and anti-inflammatory agents. *Industrial Crops and Products*, 56, 60-66.

Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.

El jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Doukkali, Z., Boudida, EH., Touati, D et Nejjari, R. (2016). Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulata* L. p : 281-287.

Références bibliographiques

EL jemli, M. (2020). Contribution à l'étude ethnobotanique, toxicologique, pharmacologique et phytochimique de quatre Cupressacées marocaines : *Juniperus thurifera L.*, *Juniperus oxycedrus L.*, *Juniperus phoenicea L.* et *Tetraclinis articulata L.* thèse de doctorat : Sciences du Médicament. Université Mohammed V, Rabat. P :204.

Espigares, M. Y. Q., Chen, J. C., Liu, D. H., Ye, X. Q. (2004). Simultaneous extraction of phenolic compounds of *citrus* peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1): 57- 62.

Esteve Selma, M.A., Montoya, P., Moya, J.M., Minano, J., Hernandez, I., Carrion, J. S., Charco, J., Fernández, S., Munuera, M., & Ochando, J. (2017). *Tetraclinis articulata* : biogéographie, écologie, menaces et conservation. Direction Générale du Milieu Naturel. P : 247.

Fernandez, X., Chemat, F. (2012). La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation. Vuibert, Paris, 288.

Fuhrman, B., Lavy, A., and Aviram, M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*61. p:549-554.

Hadjadj, K., Letreuch belarouci, A. (2017). Synthèse bibliographique sur le thuya de berbérie *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.],41 .p :13-21.

Herms, D. A., Mattson, W. J. (1992). "The dilemma of plants: to grow or defend". *The quarterly Review of Biology.* 67,p : 283-335.

Houmenou, V., Adjatin, A., Assogba, F., Gbénou, J., & Akoègninou, A. (2018). Étude Phytochimique Et De Cytotoxicité De Quelques Plantes Utilisées Dans Le Traitement De La Stérilité Féminine Au Sud-Bénin. *European Scientific Journal*, 14(6), 156-171.

Hubert, J. (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja : Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 174.

Karumi, Y. O. V. O., Onyeyili, P. A., & Ogugbuaja, V. O. (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3), 179-182.

Références bibliographiques

Kumarappan, T ., THilagam, E ., Subhach, S. (2012). Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*, *Journal of Biological Sciences are provided here courtesy of Elsevier*,19(3): 349–355.

LePerchec, P. (1994). Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection. Ed. Nathan, Paris, p :142 (cited in François N,2010).

Maire, René. (1952). Encyclopédie Biologique. Paul le chevalier; *Flore de l'Afrique du nord*,vol1 : p 108.

Majob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., & Vahidipour, H. R. (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian J Pharma Res*, 2, 77-82.

Mamta, S., Jyoti, S., Alka, P. (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 16(2) ,p : 130-134.

Maoz, M., Neaman, I. (2000). Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*, *Journal of ethnopharmacology*, (71)3: 479-481.

Moualek, I. (2018). Activités biologiques de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* de la région de Tizi-Ouzou. Thèse de doctorat : Biochimie Appliquée et Biotechnologie. Université mouloud mammerie de tizi. P : 176.

Naumann, H. D., Tedeschi, L. O., Zeller, W. E., Huntley, N. F. (2017). The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46,p : 929-949.

N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).

Oboh, G. (2005). Effect of Blanching on the Antioxidant Property of Some Tropical Green Leafy Vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 38, 513-517.

Oloyede, O. I. (2005). Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*, 4(6), 379-381.

Oyaizu, M. (1986). Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Product of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N. (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chem.*, 110, 571-583.

Pokorny, M., Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (2001). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, (51): 15-25.

Ponce, A G., Fritz, R., Del Valle, C E., Roura, S I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of *organic Swisschard*. *Lebensmittel Wissenschaft und -Technologie*, 36: 679-684. Praloran C. (1971). Les agrumes. Ed. éditeur 8348, Paris, n° 5, p. 25.

Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., & Marouf, A. (2010). screening of the antioxidant potential of some algerian indigenous plants. *j. biol. sci*, 10(4), 316–324.

Rajeshwar, Y., Gupta, M., Mazumder, U.K. (2005). In Vitro Lipid Peroxidation And Antimicrobial Activity Of *Mucuna Pruriens* Seeds, *Iranian journal of pharmacology and therapeutics*, (4) : 1 : 32-35.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, Division of Biochemistry and Molecular Biology, UMDS-Guy's Hospital, London, UK, 20(7): 933-56.

Sayah, K., Marmouzi, I., Naceiri, Mrabti, H., Cherrah, Y., My, El Abbes, F. (2017). Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia. *BioMed Research International*, Article ID 2789482, p : 7.

Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 67, p: 2058–2070.

Singleton, V., Rossi, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Références bibliographiques

Sliti, S., Ayadi, S., Dumarçay, S., Arbi, M.K., Gérardin, P., André, E., Perrin, D., Abderrabba, M.(2016). Évaluation de la composition en huile essentielle et de la capacité Sliti et al. antioxydante des extraits hydrométhanoliques de *Tetraclinis articulata*, en fonction de la localisation et des variations saisonnières, *J. Mater. Environ. Sci.* 7 (3),p : 968-980.

Tekaya-karoui, A., Ben Jannet, H and Mighri, Z. (2007). Essential Oil Composition of Terminal Branches, Cones and Roots of *Tetraclinis articulata* from Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10:p : 2495-2499.

Tim, C.T.P., and Andrew J. L. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids.Int. J. Antimicrob. Ag. 26: p: 343–356.

UICN-Med et AGIR. (2011). Découvre la biodiversité du Parc National d’Al Hoceima – Le Thuya de Berbérie. Gland, Suisse et Malaga, Espagne: UICN.

Vincken, J.P., Heng, L., Groot, De. A., Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68: p: 275–297.

Wang, Y., Xu, Z., Bach, S. J., McAllister, T. A., (2008). Effets des phlorotannins d’*Ascophyllum nodosum* (algue brune) sur la digestion ruminale *in vitro* de fourrages mélangés ou de grains d’orge. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 145 (1/4): 375-395

Wilkinson, J M. (2006). Methods for testing the antimicrobialactivity of extracts. Chapitre VIII.pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag Gmb H & Co. KGaA, Weinheim,p: 405.

Wu, A., Shibamoto, T. (2010). Antioxidant/ lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7218-7225.

Zaika, L.L. (1988). Spices and Herbs: Their Antimicrobial Activity and Its Determination, *Journal of Food Safety*, 9, 97-118. Cited in (Boukhatem et al.,2014).

ZAHIR, I., ER-RAHMNY, A., ES-SADOUNI, R., EL HADRI, I.(2020). Activités biologiques de *Tetraclinis articulata* : revue de synthèse, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 89, articles, p. 91 - 114

Références bibliographiques

Zerrouki, N. (2009). Contribution à l'étude phytochimique de la plante *Tetraclinis articulata* activité biologique et biochimique de la plante. thèse de magister : chimie organique. Université d'Oran, P : 102.

Zidane, A., Tits, M., Angenotb, P., Waters,J.N., Frederichp, M., Diba, I., Mekhfia, H., Aziza, M., Bnouham, M., Legssyera, A., Ziyata A.(2014). Analyse phytochimique de *Tetracilnis articula* en relation avec sa propriété vasorelaxante, *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (5),p : 1368-1375.

Zrira, S., Bachir, B., Elamrani, B and Elamrani, A. (2005). Chemical Composition of the Sawdust Oil of Moroccan *Tetraclinis articulata* Vahl, *Journal of Essential Oil Research* 17, p: 96 - 97.

A green scroll graphic with a dark green border and a lighter green fill. The scroll is unrolled, showing a central area with the word "Annexe" written in a black, serif font. The scroll has a tab on the left side and a small loop on the top right corner.

Annexe

Annexe I

❖ Matériel non biologique

Tableau IV : Appareillage, verrerie et réactifs

Appareillage	Verrerie et accessoires	Réactifs et produits chimiques
Balance de précision	Ballons	Acide chlorhydrique
Bec bunsen	Boîtes de Pétrie	Ammoniaque
Centrifugeuse	Béchers	Acide sulfurique
Etuve	Entonnoir	Acide ascorbique
Plaque chauffante	Eprouvette graduée	Acide trichloracétique
Rota vapeur	Erlen Mayer	Alcool isoamylique
Soxhlet	Fioles	Chlorure ferrique
Spectrophotomètre	Tubes à essaie	Chloroforme
Incubateur à 37°C	Micropipette	Dmso
Incubateur à 25°C	Papiers filtre Watman 01	DPPH
	Pipette graduée	Ethanol
	Disque en papier	Ferricyanure de potassium
	Ecouvillon	Hydroxyde de sodium
	Gants	Magnésium
	Spatule	Réactif de drangendorff
		Tampon de phosphate

• Les Milieux de cultures

- Muller-Hinton (MH)
- Gélose de Sabouraud (SAB)

Annexe II

❖ Extraction de l'extrait éthanolique



Figure 08: Feuilles fraîches de *Tetraclinis articulata*



Figure 09: Séchage des feuilles de *T.articulata* dans l'étuve



Figure 10 : Poudre de *T.articulata* (après broyage)



Figure 11: Extraction des feuilles de *T.articulata* à l'aide d'un soxhlet

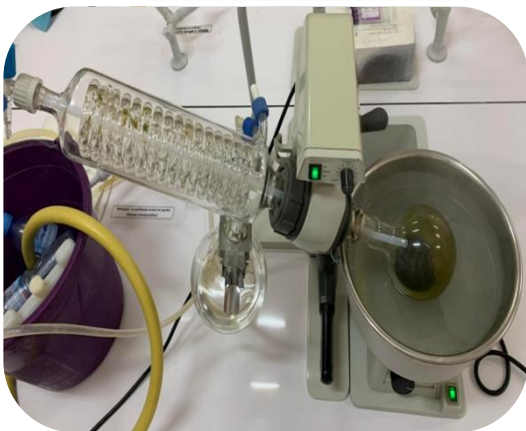


Figure 12: Elimination de solvant à l'aide d'un rota vapeur

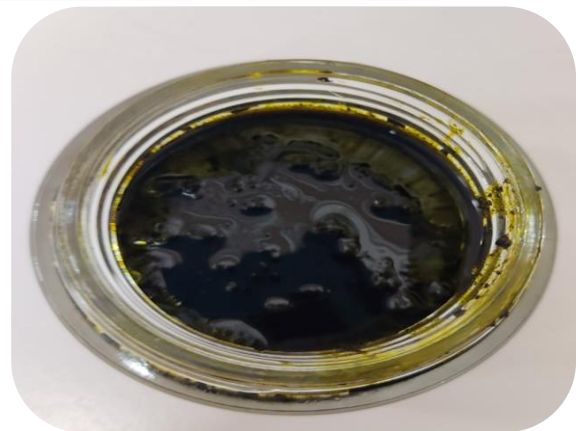


Figure 13: Extrait brut des feuilles de *T.articulata*

Annexe III

❖ Screening phytochimique

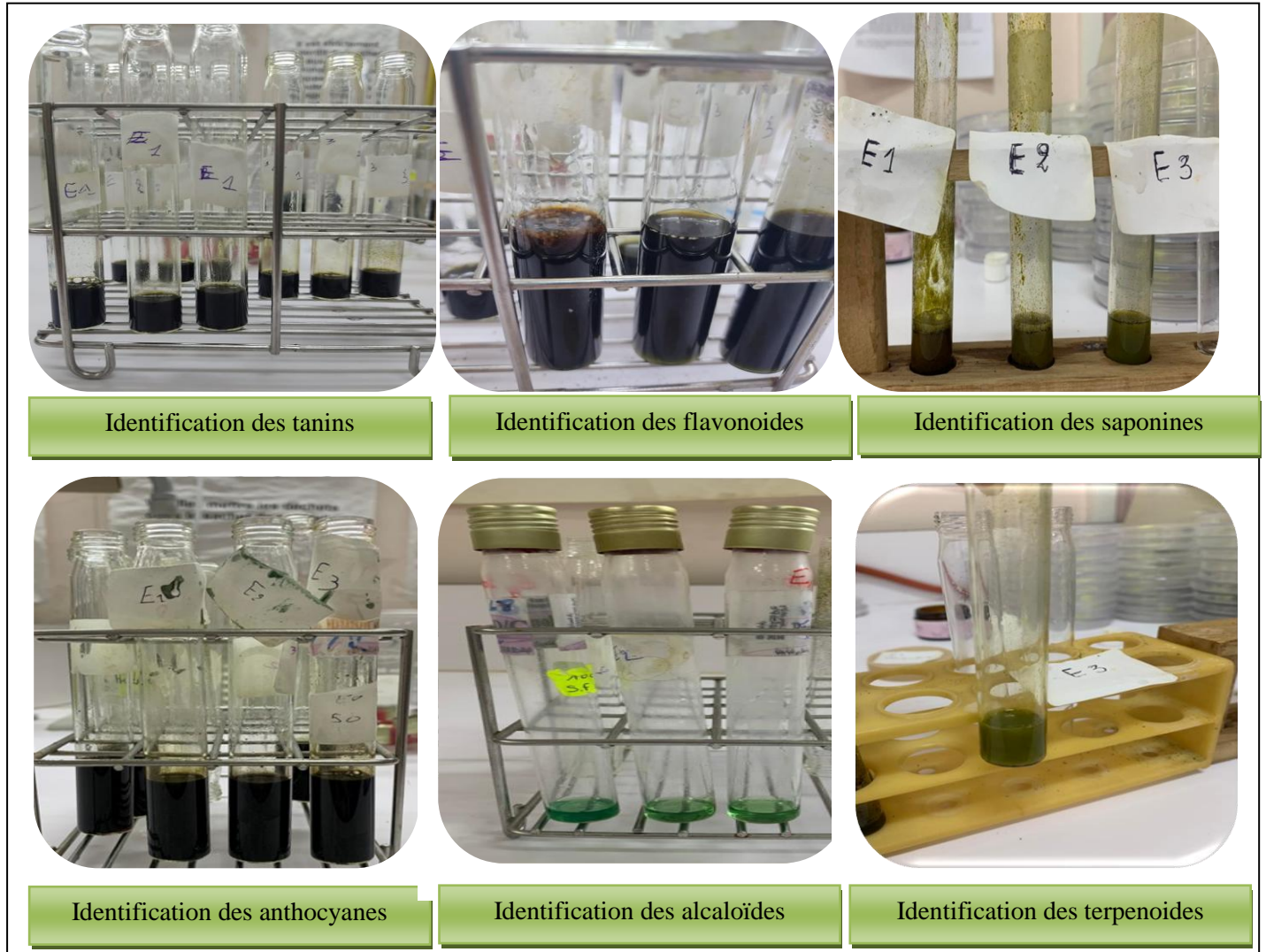


Figure 19: Mise en évidence des métabolites secondaires par screening phytochimique

Annexe IV

❖ Activités antioxydantes

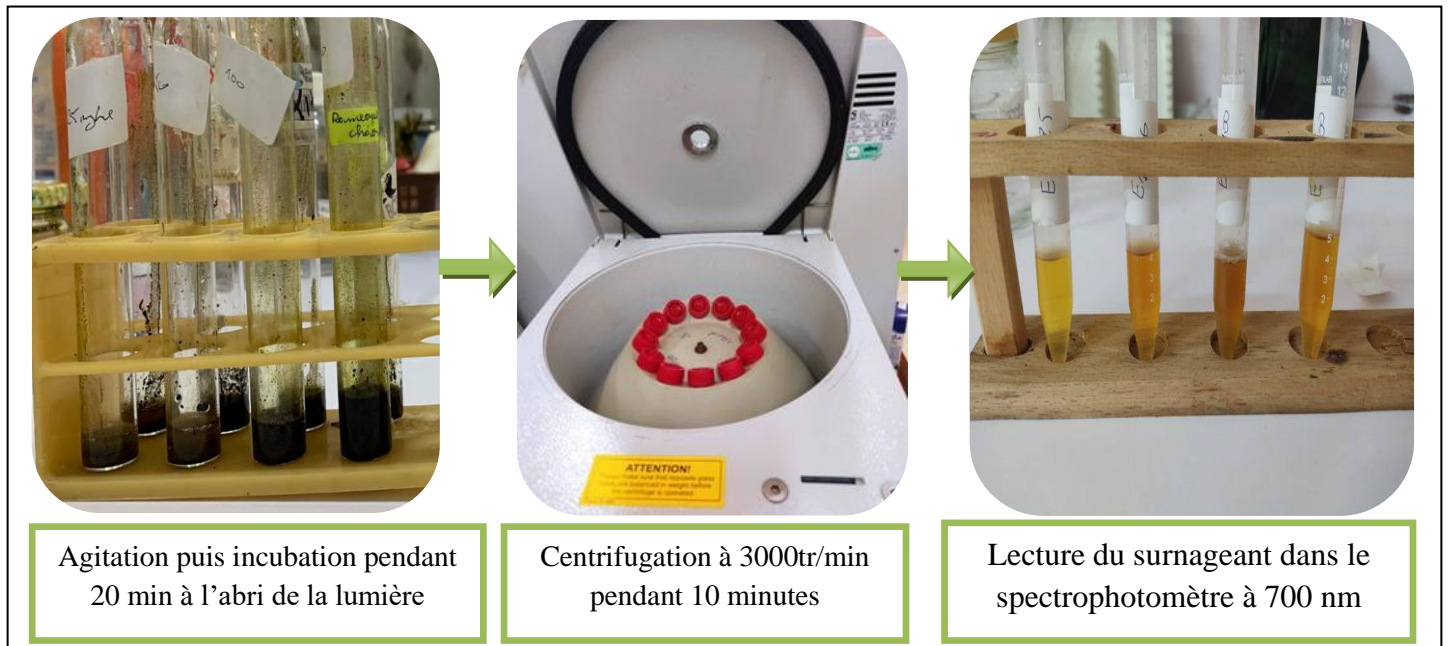


Figure 21 : Teste de pouvoir réducteur du fer par la méthode de FRAP (Ferricreducing antioxydant power)

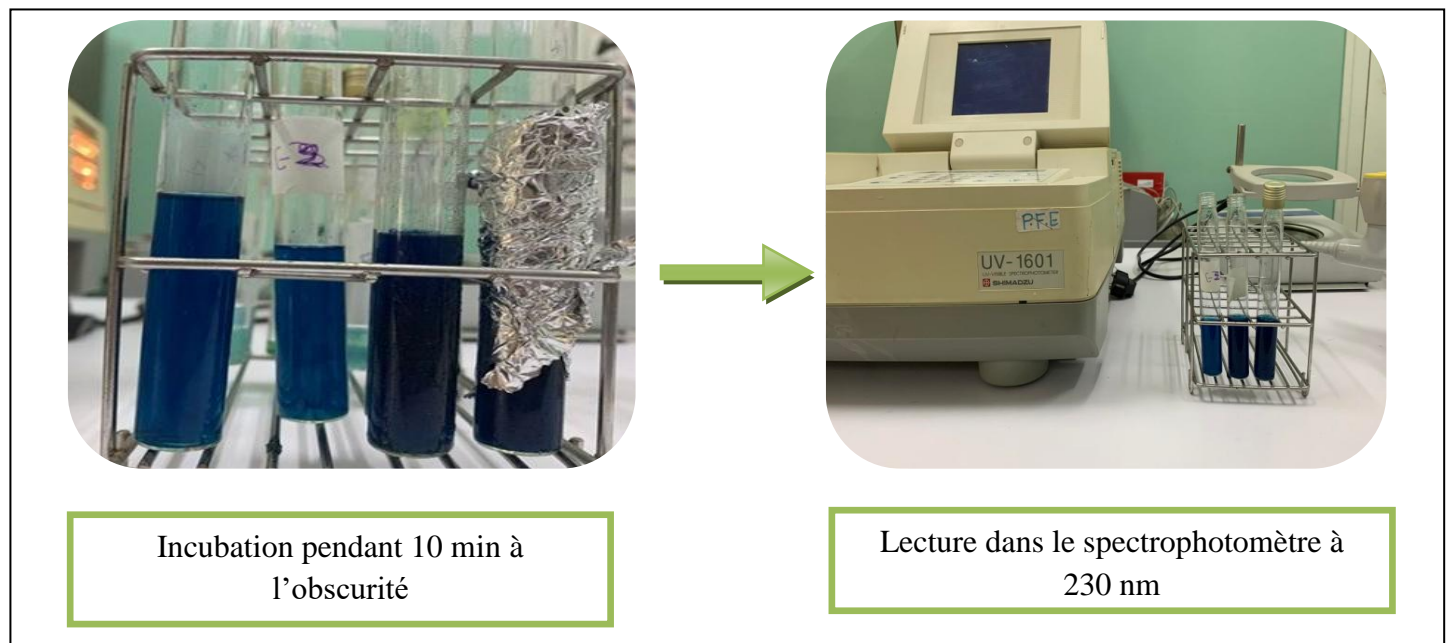


Figure 23 : Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

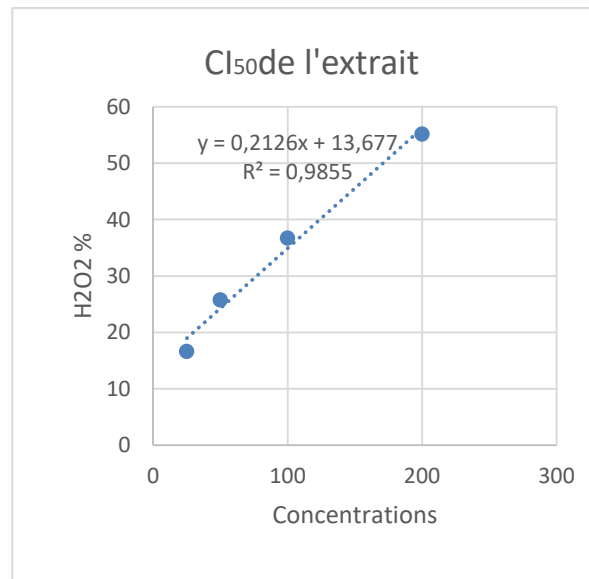
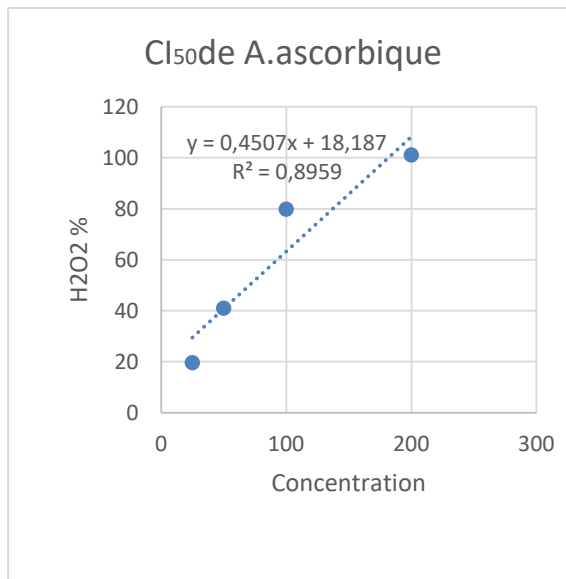
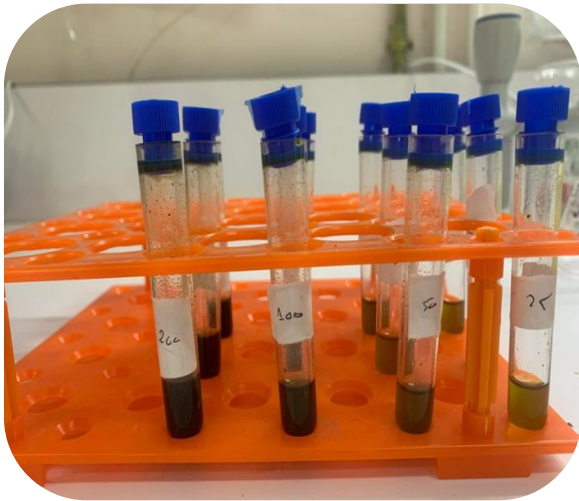


Figure 24 : Détermination CI₅₀ de l'acide ascorbique et de l'extrait éthanolique (H₂O₂)



Dilution avec des concentrations croissantes



Perte de la couleur rapidement

Figure 26 : Teste de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

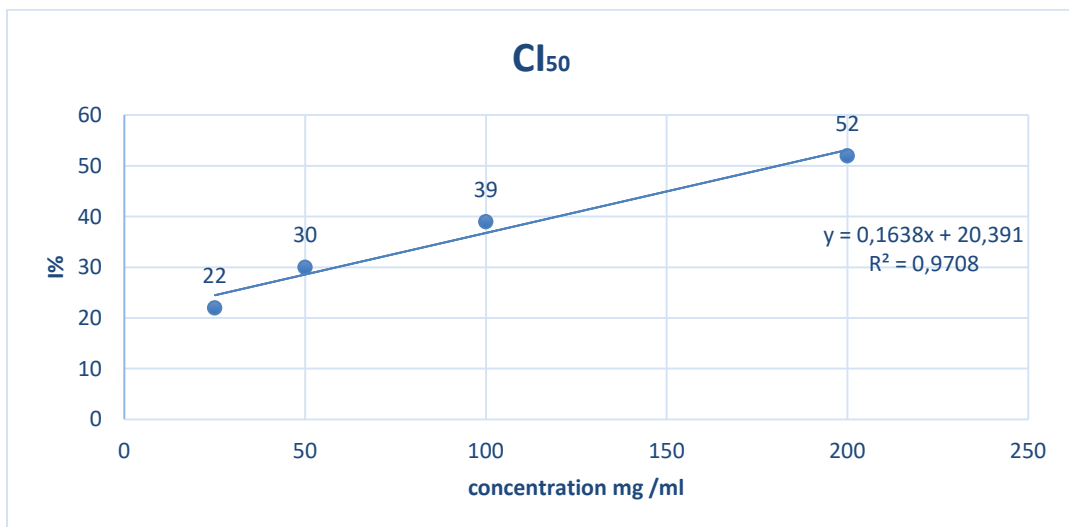


Figure 27: Détermination CI_{50} de DPPH

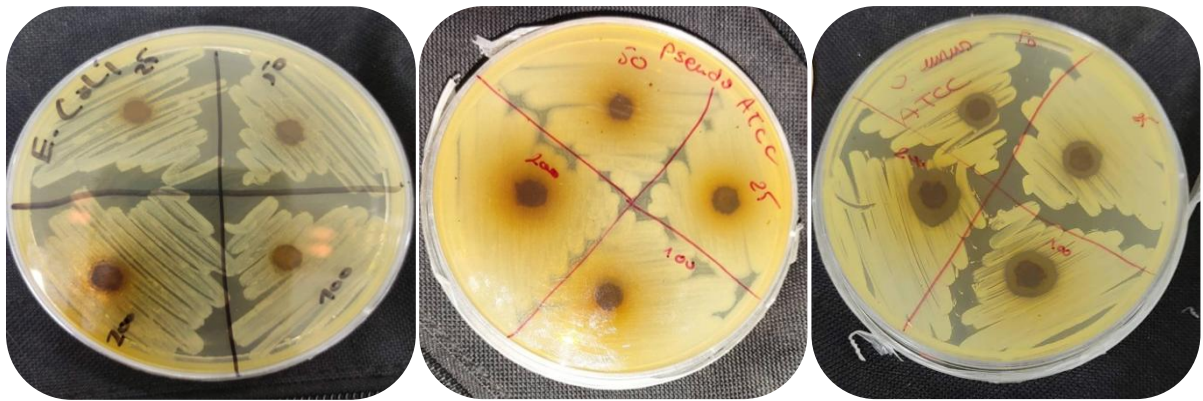
❖ Activité antimicrobienne

Etape I : Préparation des milieux de culture



Figure 28 : Préparation des souches bactériennes

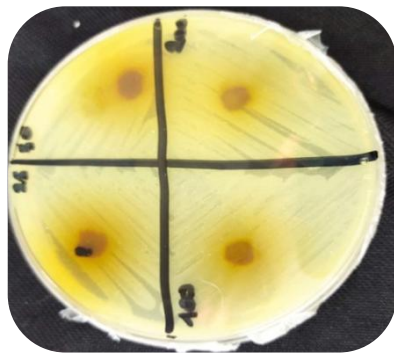
❖ **Technique Aromatogramme**



Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus



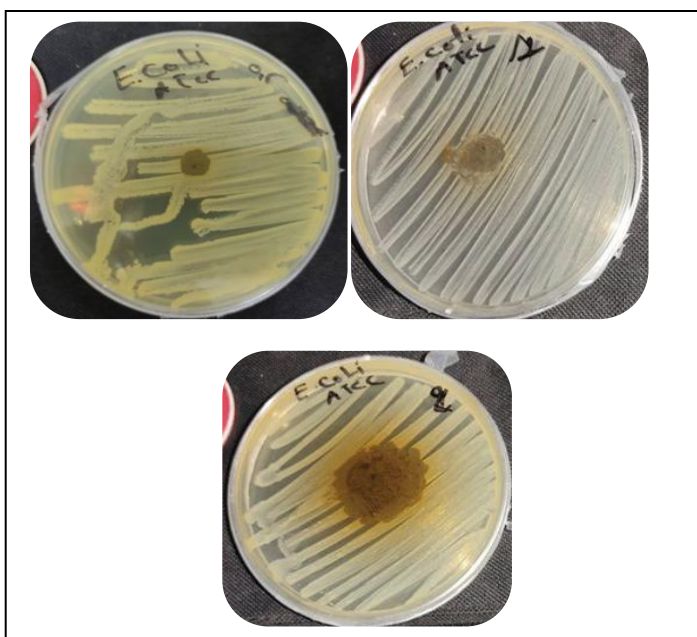
Bacillus subtilis



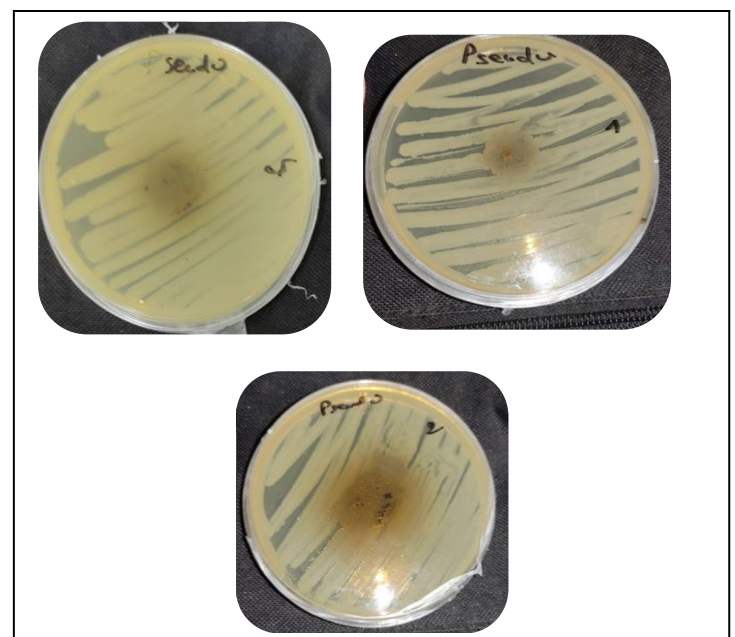
Candida albicans

Figure 29: Résultats de la méthode de diffusion sur disque

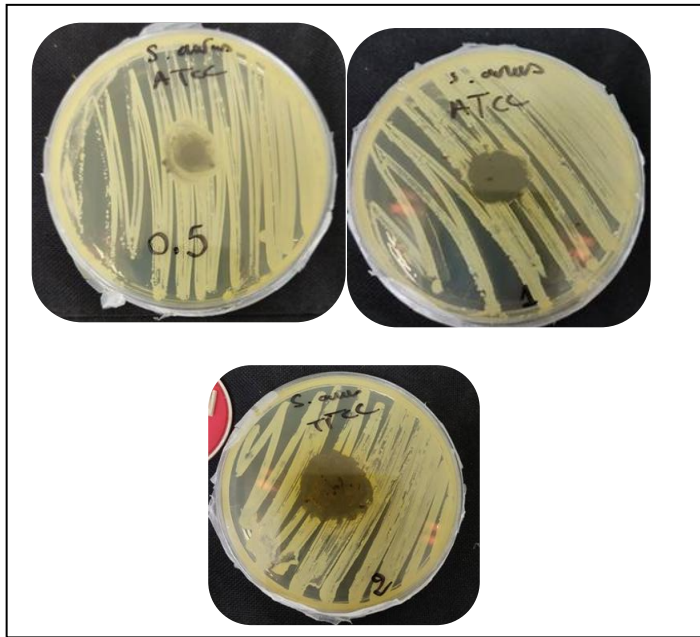
❖ **Technique de contact direct**



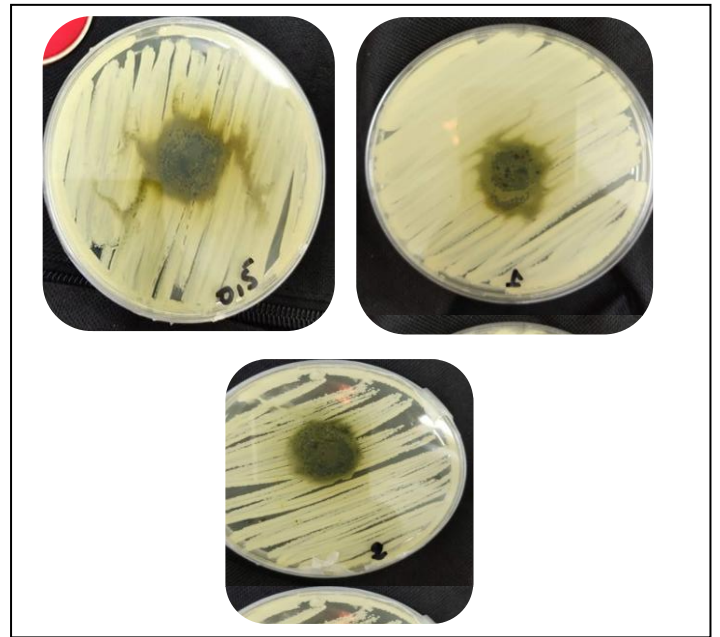
Escherichia coli



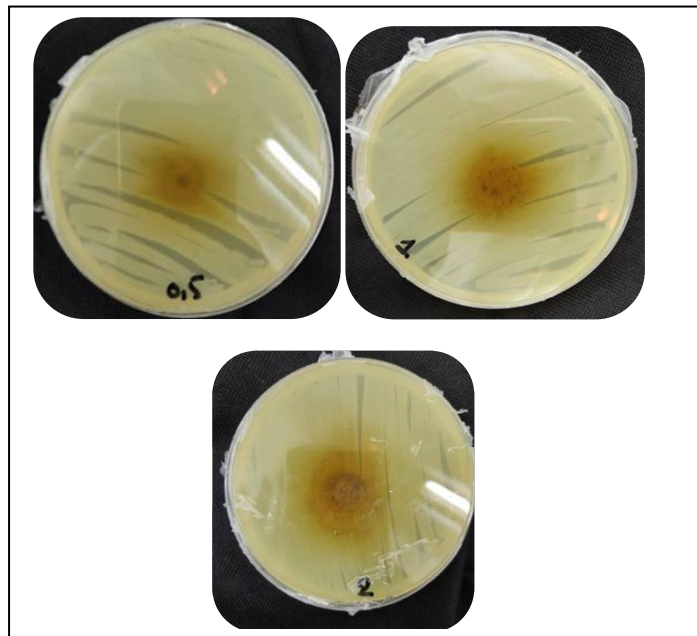
Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus



Candida albicans



Bacillus subtilis

Figure 30: Résultats de la méthode contact direct en milieu gélose

Annexe V

Tableau V : Teneur en eau des feuilles de *T.articuata*

Echantillon	La teneur en eau
E1	45.35%
E2	79.90%
E3	45.61%

Tableau VI : Rendement de l'extraction des trois échantillons

Echantillon	Rendement de l'extrait
E1	36.12%
E2	41.02%
E3	40.4%

Tableau VIII : Résultats du Pouvoir réducteur du fer : FRAP

Concentration (mg/ml)		25	50	100	200
Absorbance (ABS)	Acide ascorbique	0.773	0.827	0.770	1.200
	L'extrait	0.347	0.292	0.580	0.989

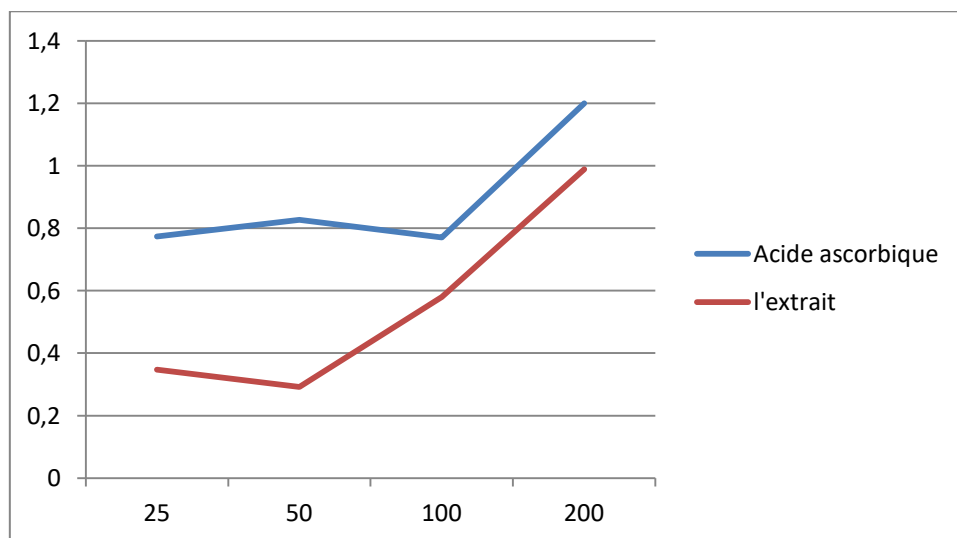


Figure 31 : Courbe représente résultats du pouvoir du fer, FRAP

Tableau IX : Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Concentration (mg/ml)		25	50	100	200
Absorbance (ABS)	AC	0.003	0.035	0.065	0.096
	L'extrait	0.0025	0.0016	0.045	0.067

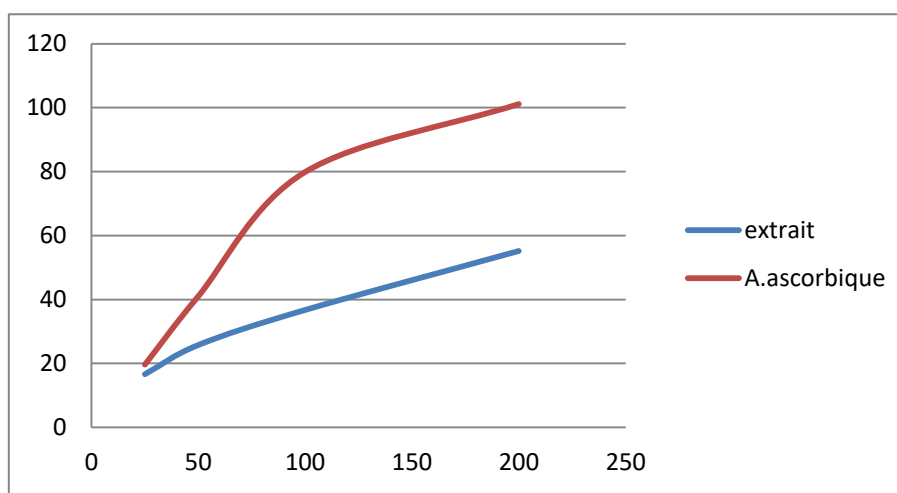


Figure 32 : Courbe représente l'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Tableau XI : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Concentration (mg/ml)		25	50	100	200
Absorbance (ABS)	Acide ascorbique	0.257	0.267	0.263	0.265
	L'extrait	0.379	0.333	0.437	0.345

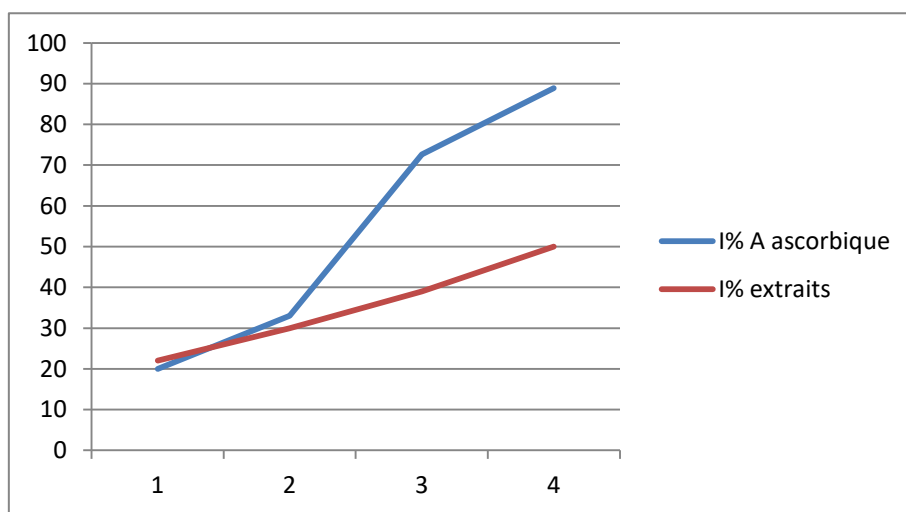


Figure 33 : Courbe représente Piégeage du radical libre DPPH