

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomique, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologie végétale

**ETUDE D'UNE PLANTE MEDICINALE *CUPRESSUS*
SEMPERVIRENS var *HORIZONTALIS***

Par

Fatiha BOUALOUANA

Devant le jury composé de :

F. SAIDI	Professeur, USD de Blida	Présidente
S. MEGATLI	Maître de Conférences B, USD de Blida	Examineur
N. BOUCHENAF	Maître de Conférences A, USD de Blida	Examineur
M.HAMAIDI	Maître de Conférences A, USD de Blida	Promoteur
F. HAMAIDI	Maître assistant A, USD de Blida	Co-Promoteur

Blida, Février 2013.

CHAEPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Description botanique

3.1.1. Etude morphologique

Appareil végétatif : C'est un grand arbre qui se caractérise par un tronc très élevé et très ramifié, excepté dans sa partie inférieure, et par un écorce de couleur brune –grisâtre

Nous différencions la variété *horizontalis* (la variété étudiée) à celle *pyramidalis* par la forme du port. Le cyprès *horizontalis* se caractérise par ses branches étalées qui sont disposées en couronne irrégulière, ce qui lui différencie du cyprès *pyramidalis* qui possède des branches dressées formant une couronne effilée (Figure3.1).



Figure3.1 : A) *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* ; B) *Cupressus sempervirens* var *pyramidalis* (original).

Le cyprès horizontalis présente un feuillage dense (Figure 3.2), dont les feuilles sont très petites sous forme des écailles, triangulaires, d'un vert vif, imbriqués sur 4 rangs, recouvrant des ramules irrégulières, appliqués contre le rameau. Les ramules sont courts, terminés en pointe émoussée (Figure 3.3, Figure 3.4).



Figure 3.2 : Vue d'ensemble dun feuillage dense de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* (original).

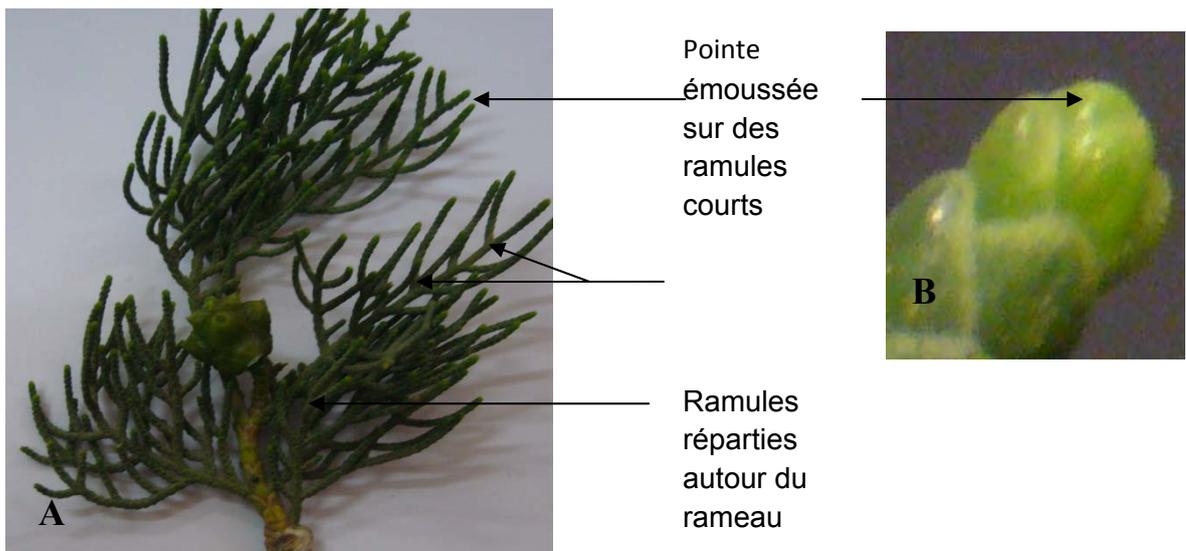


Figure 3.3 : A) Différents types de rameaux de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* ; B) Partie terminale du ramule observé sous loupe (originals).

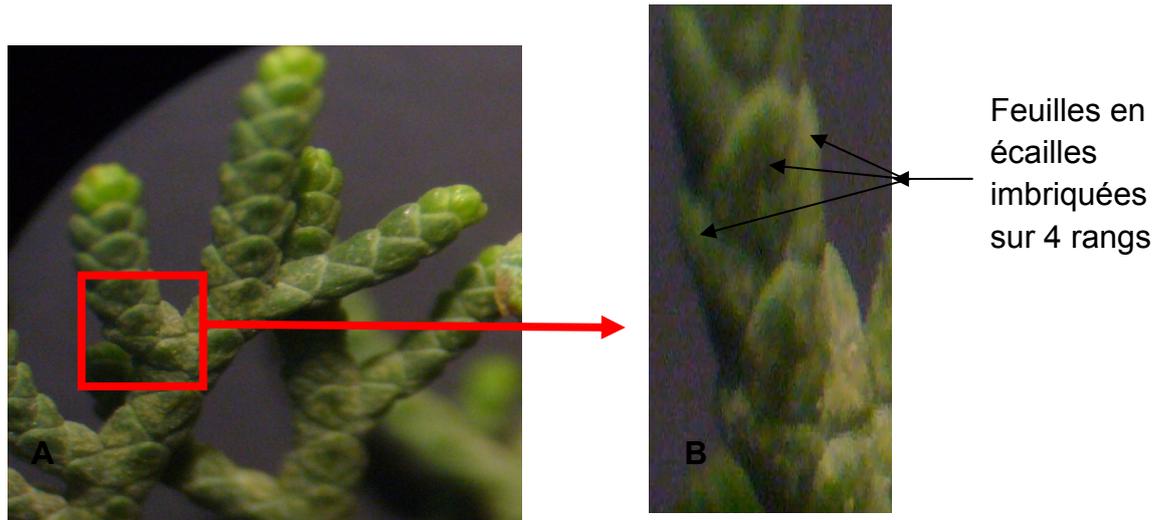


Figure 3.4 : A) et B) Feuilles de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* observées sous loupe (originals).

Appareil reproducteur : Nous retrouvons deux types d'organes reproducteurs qui ne sont pas portés par des fleurs, mais par des cônes. Cette espèce est monoïque : les organes mâles et femelles sont séparés, mais s'épanouissent sur le même pied (Figure 3.5).

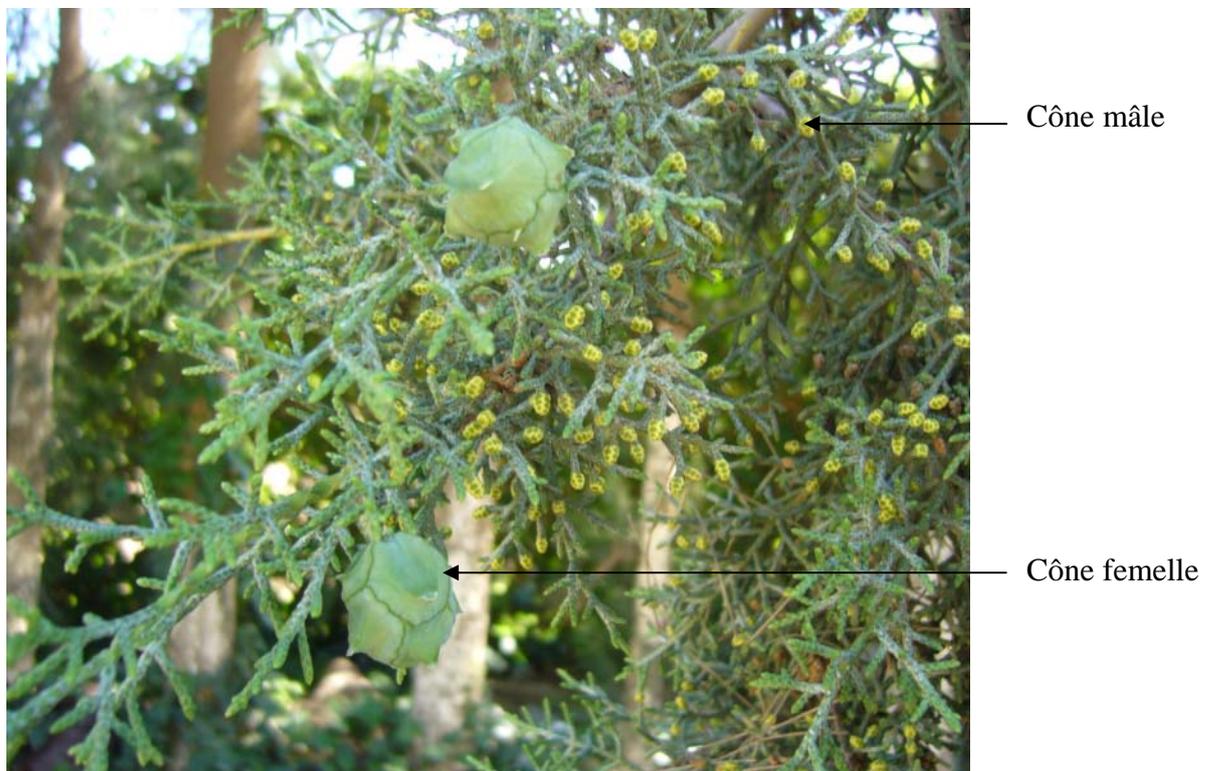


Figure 3.5 : Organes reproducteurs de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (original).

les organes reproducteurs mâles forment de petits cônes. Ce sont considérés comme des structures composés. Ce sont de petits cônes jaunâtres , avec une forme cylindrique, sont constitué uniquement d'étamines insérées en spirale sur un petit axe court. Elles portent sur leur face inférieure des grains de pollen (Figure 3.6, Figure3.7).



Figure 3.6 : Cônes mâles de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (original).

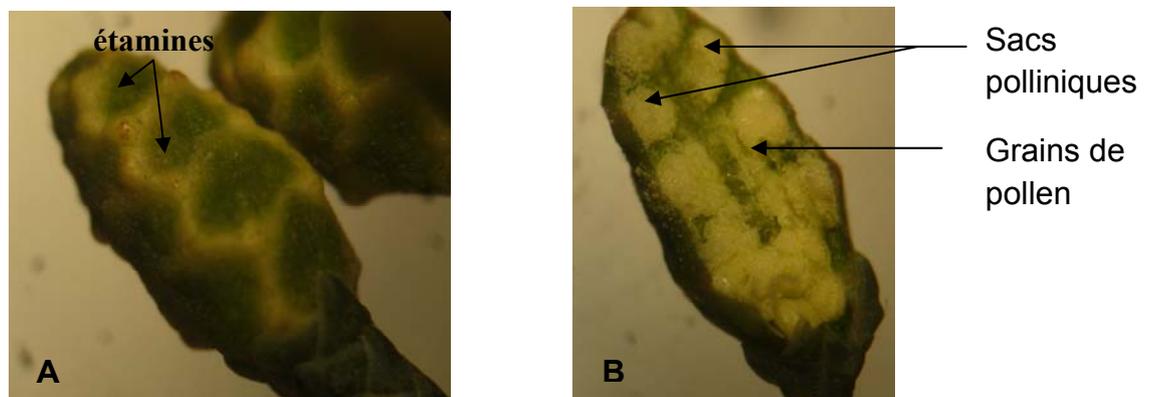


Figure 3.7: A) Cône mâle de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* ; B) Coupe longitudinale au niveau du cône mâle, observés sous loupe (originals).

Les organes reproducteurs femelles sont des petits cônes fructifères. Le cône femelle est un ensembles d'écailles dont chacune correspond à une fleur, ce qui nous a laissé dire que chaque cône femelle est une inflorescence. Ces cônes sont

subglobuleux, verts, brun à maturité, à 12 écailles polygonales jointives au tour d'un axe central, compte-tenu de leurs caractère clos (Figure 3.8).

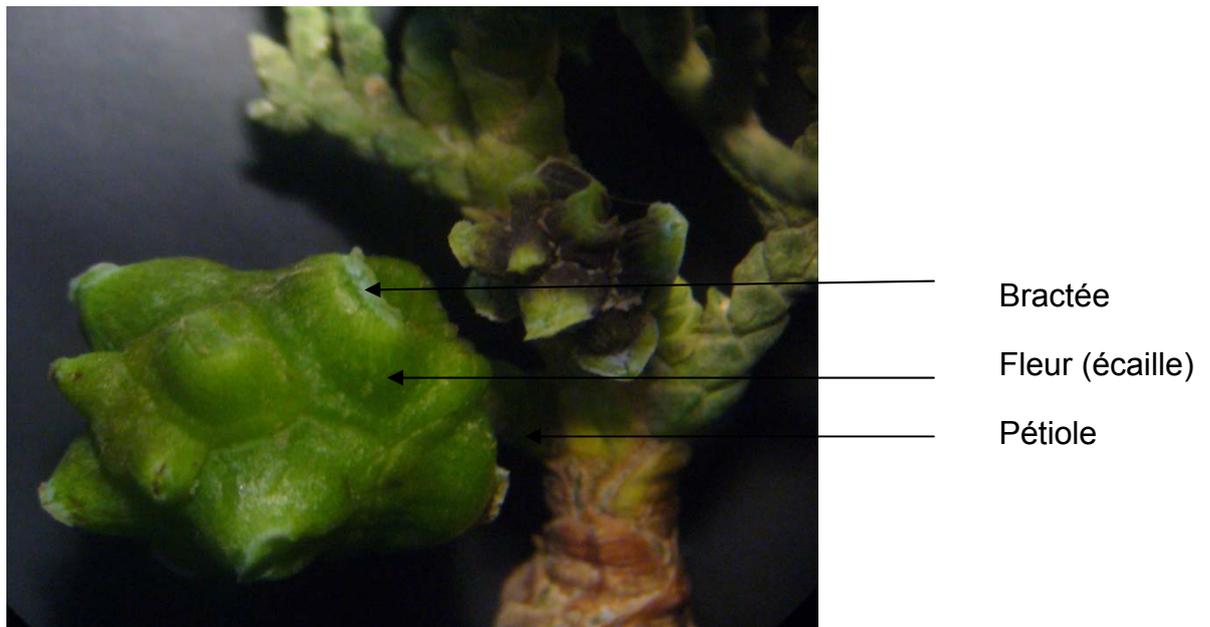


Figure 3.8 : Cône femelle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* observé sous loupe (original).

Les écailles s'insèrent en spirale sur l'axe du cône et chacune est constituée d'une bractée qui est en conrescente avec elle, à l'aisseille de la quelle se trouvent des ovules (Figure 3.9).

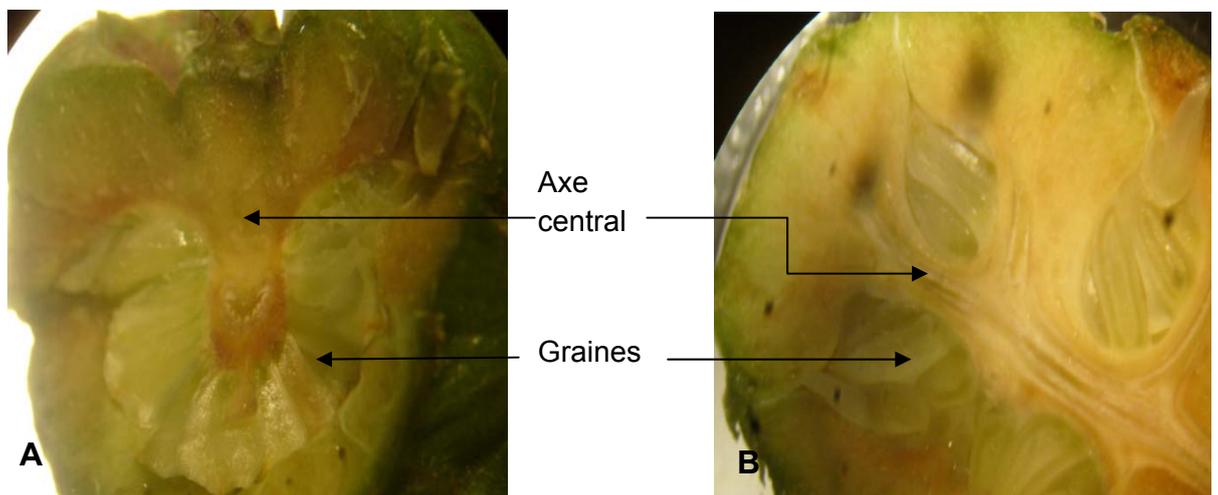


Figure 3.9 : A) Coupe transversale au niveau du cone femelle, B) Coupe transversale de ce cone observé sous loupe (originals).

- le volume de ces cônes accroît durant la maturation (figure 3.10).



Figure 3.10 : Fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* à différentes tailles (original).

Les graines :

Quand les fruits deviennent mûrs, libèrent de très petites graines, de couleur brun clair, et de forme irrégulière.



Figure 3.11: Graines obtenues à partir des cônes mûrs ligneux de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (original).

3.1.2. Etudes histologiques et localisation des sites sécréteurs

➤ A l'état vital :

L'observation morphologique des coupes histologiques des cônes femelles à l'état vital (sans double coloration), nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Notre plante présente au niveau des fruits des structures de conductions : faisceaux cribrovasculaires, de soutien : des fibres de sclérenchymes, et de sécrétion de type canaux excréteurs (Figure 3.12) . Ces canaux sont bien

observés dans les coupes longitudinales sous forme de cavités allongées, et ceci confirme la structure des ces éléments de sécrétion (Figure 3.13).

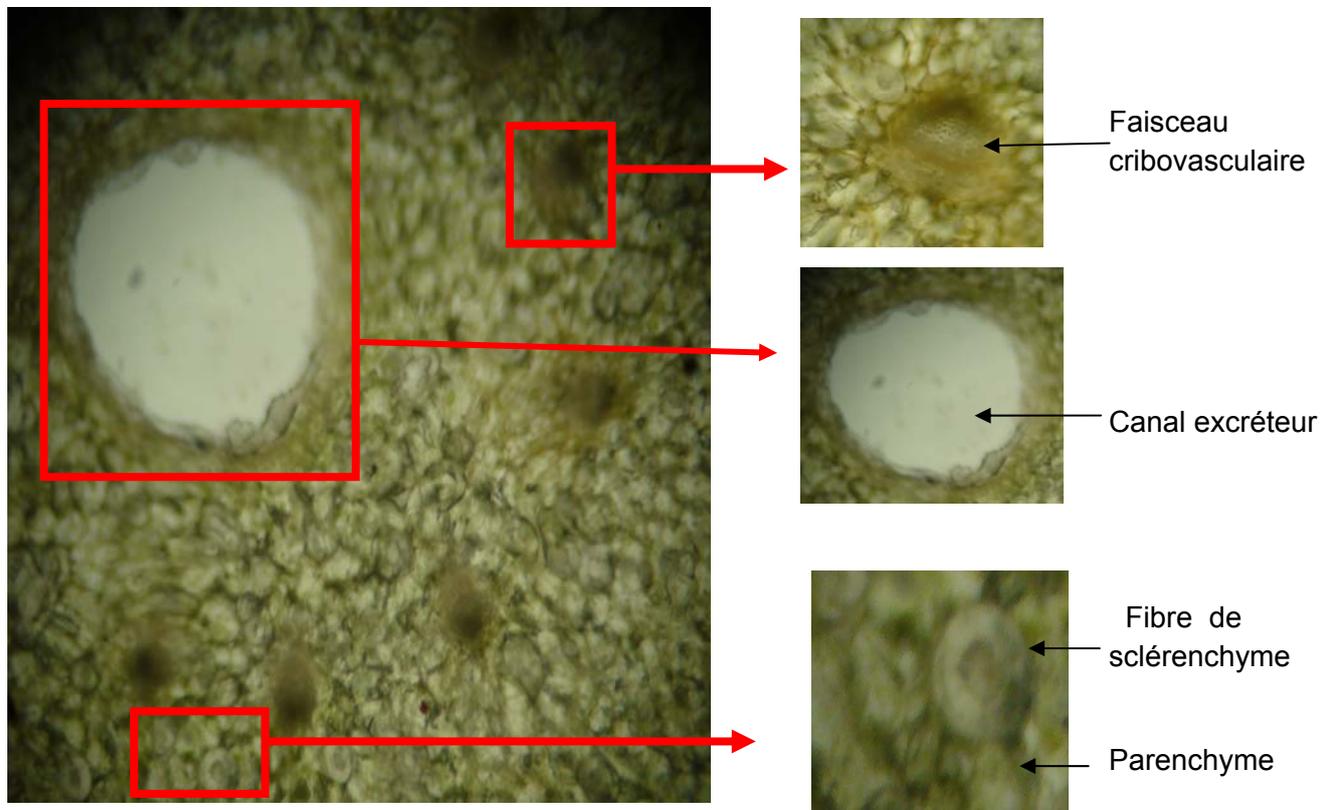


Figure 3.12: Coupe transversale au niveau du cône femelle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (état vital) (original).



Figure 3.13 : Coupe longitudinale au niveau du canal sécréteur au niveau du cône femelle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* observé sous MP×100 (original).

-Dans nos coupes qui ont été faites entre deux écailles, nous remarquons l'existence d'une structure spécifique qui relie les écailles entre elles (Figure 3.14).



Figure 3.14 : A) Deux écaillées observées sous loupe ; B) Observées au MP×40 (originals).

➤ **Avec double coloration :**

Pour une meilleure localisation des structures particulières (de soutien, de sécrétion), des coupes histologiques minces ont été accomplies par la technique de double coloration et ce en parallèle avec des observations microscopiques au niveau non seulement des fruits objet d'étude, mais aussi au niveau des feuilles et des tiges, c'est pour un bon savoir pour cette plante.

Le Cône femelle qui joue le rôle de fruit de cyprès, présente de la périphérie vers le centre (figure 3.15):

- **Un épiderme** qui contient de nombreux stomates. Ces stomates possèdent deux cellules stomatiques qui entourent un ostiole (figure 3.16).

- **Un parenchyme** qui est tapissé par des **fibres de sclérenchymes**. Ces fibres se caractérisent par des parois secondaires et une lumière cellulaire au centre. Les ponctuations qui se trouvent dans le plan des coupes se présentent comme minces canaux traversant la paroi secondaire (figure 3.19).

- **Des canaux excréteurs** situés proches de l'épiderme et sont distribués irrégulièrement dans le parenchyme. Elles sont constitués par des cellules sécrétrices tapissant la paroi interne d'un canal cylindrique dans lequel s'écoule et s'accumule l'oléorésine. (figure 3.17)

-**tissu conducteur** qui se caractérise par la structure secondaire : dont le bois est de type homoxylé composé d'une seule sorte d'éléments, des **trachéides**. Les tracheides sont des cellules allongées dans le sens de l'axe de l'arbre, de section quadrangulaire. Elles présentent des ponctuations aréolées pour assurer la communication entre les trachéides. malheureusement, nous n'avons pas pu observés les ponctuations dans non coupes. Cependant, nous observons l'apparition parmi les fibres de trachéides des cellules de **parenchyme ligneux** (figure 3.18).

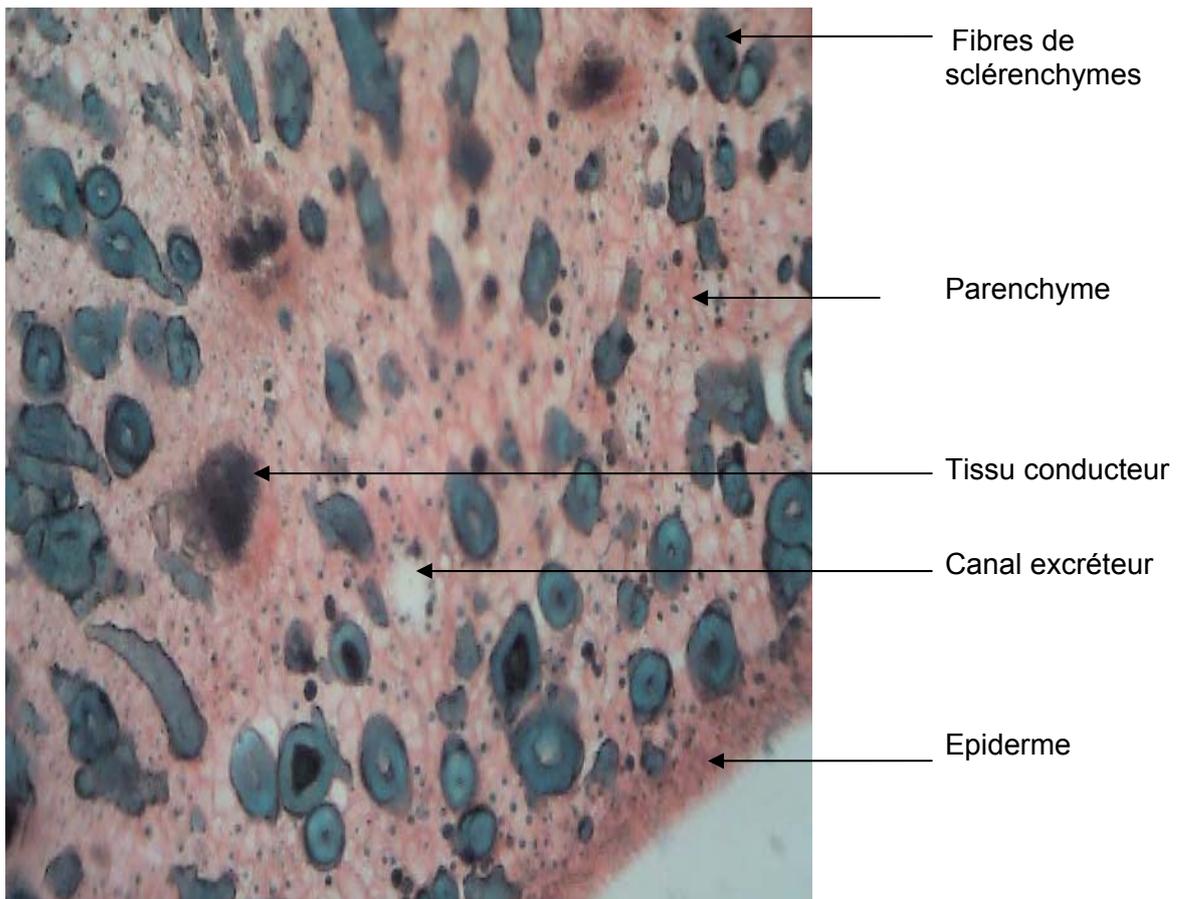


Figure 3.15: Coupe transversale au niveau d'un cône femelle avec double coloration MP×40 (original).

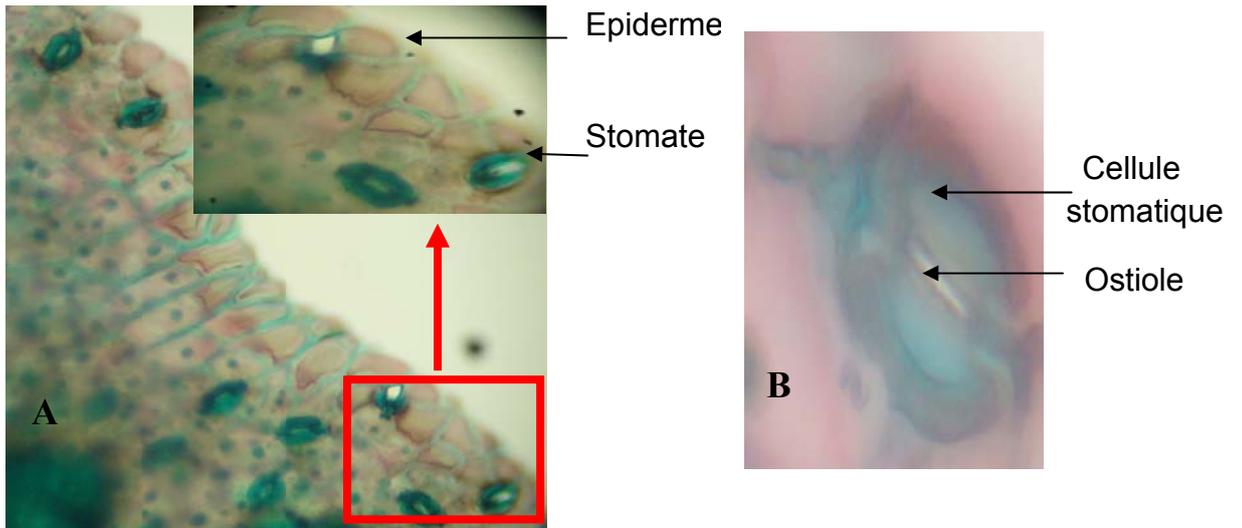


Figure 3.16 : A) Epiderme du cône femelle ; B) Structure d'une stomate au MP×400 avec double coloration (original).

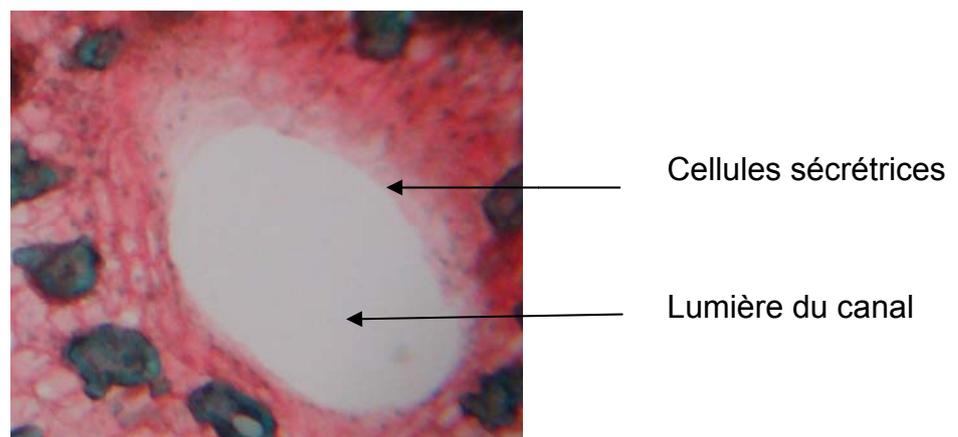


Figure 3.17: Canal excréteur observé au MP×40 (original).

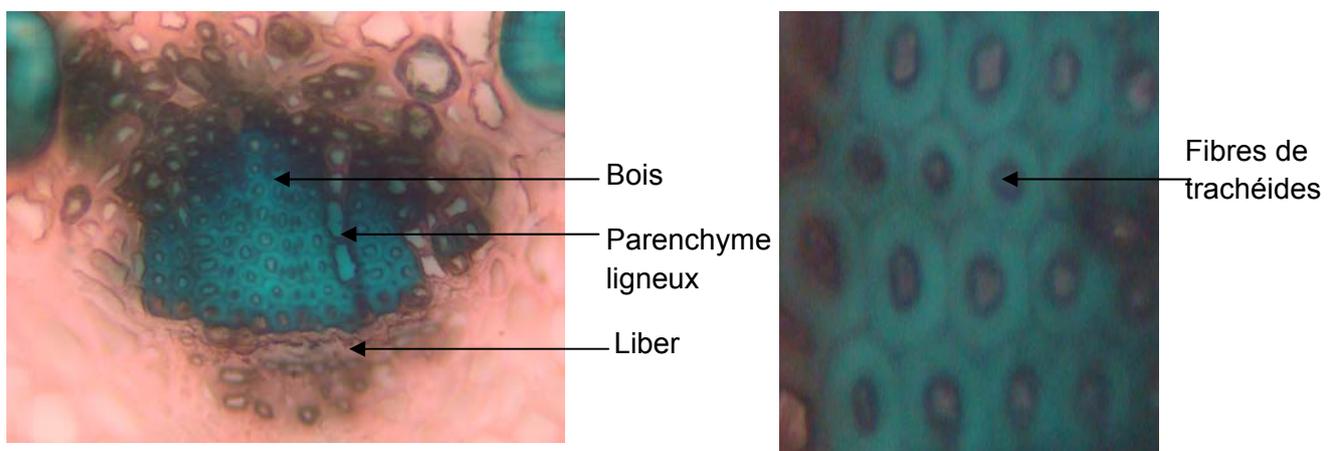


Figure 3.18 : A) Tissu conducteur au niveau d'une coupe transversale d'un cône femelle MP×100; B) fibres de trachéides au MP×400 (originals).

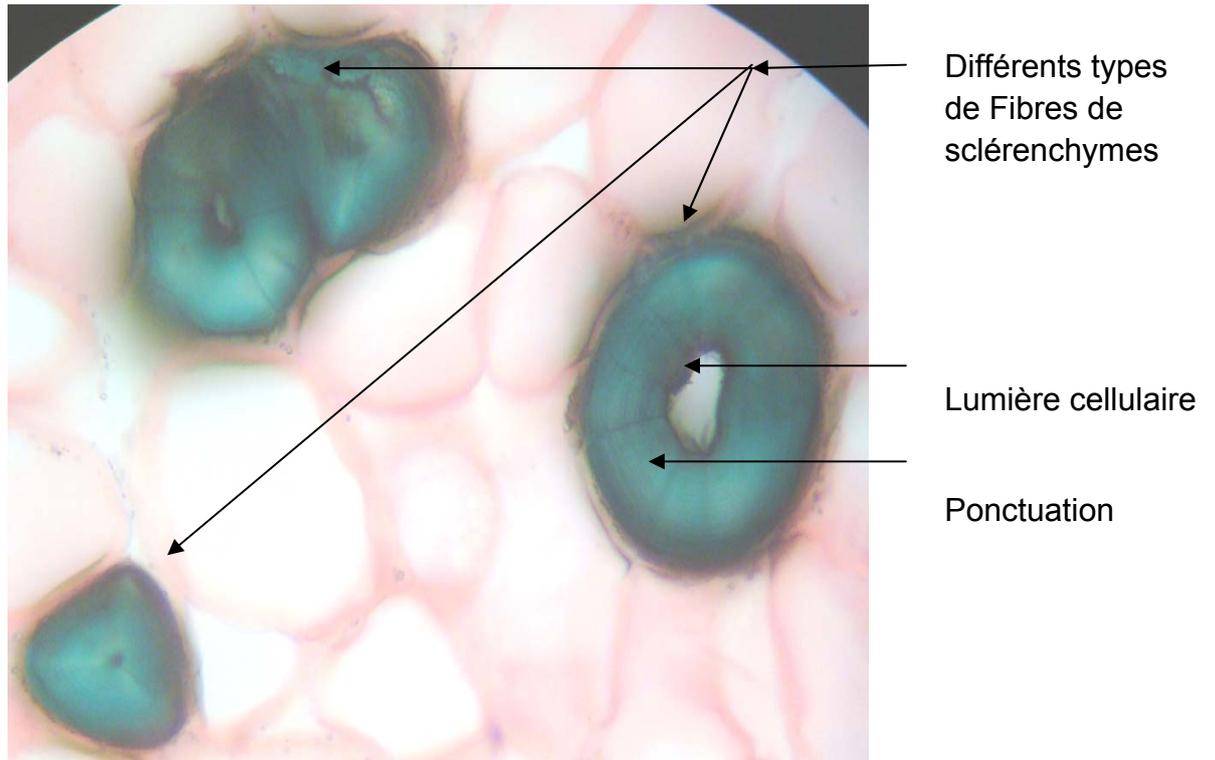


Figure 3.19: Fibres de sclérenchymes au niveau d'une coupe transversale d'un cône femelle au MP×100 avec double coloration (original).

Les feuilles :

La coupe transversale dans une écaille montre qu'elle est constituée de tissus différenciés :

- Une cuticule qui protège et imperméabilise la surface des écailles ;
- Un épiderme protecteur en périphérie, est muni de stomates qui assure les échanges ;
- Un seul canal excréteur existant au sommet du faisceau cribro-vasculaire ;
- Un parenchyme pallissadique vers la face inférieure, et un parenchyme médullaire vers la face supérieure;
- Un sclérenchyme qui se situe de part et d'autre d'un tissu conducteur (il existe un seule tissu conducteur au milieu de la feuille).

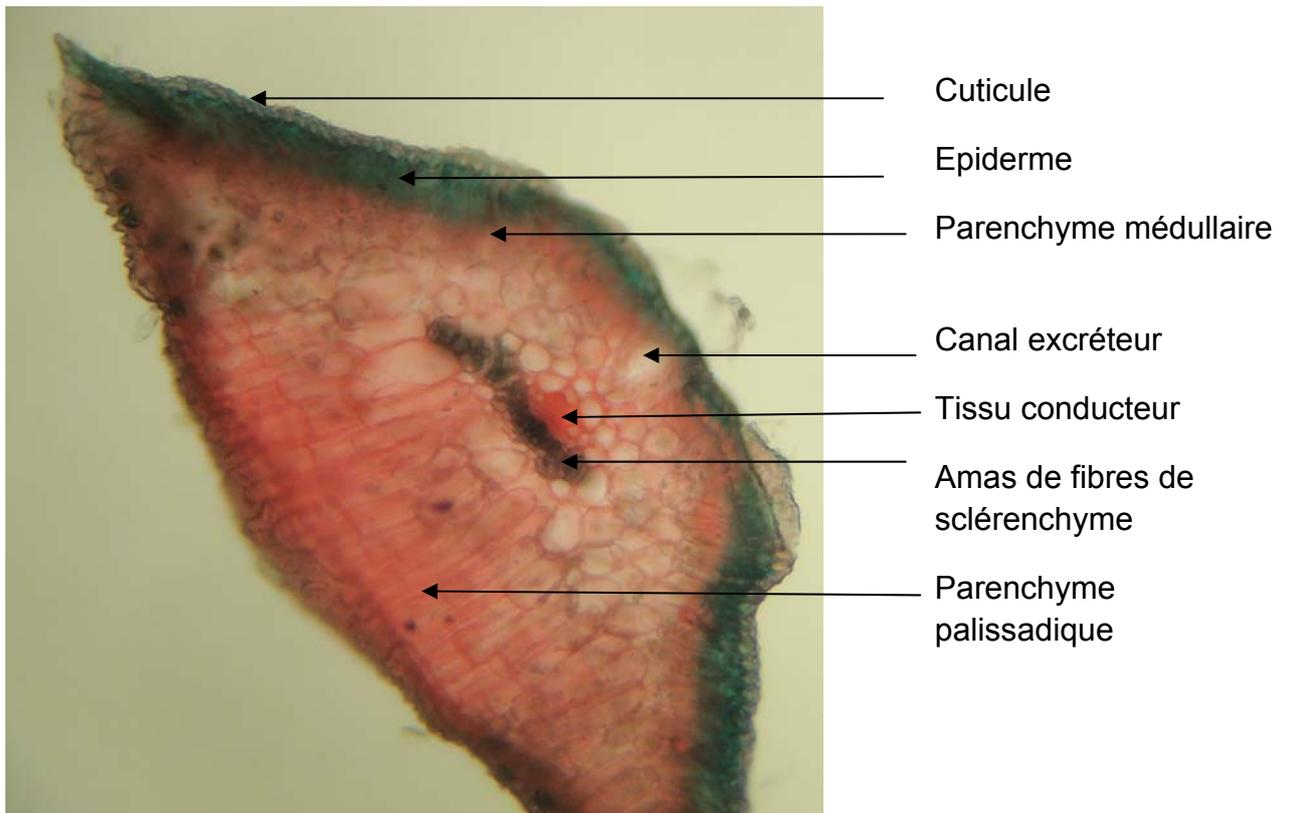


Figure 3.20: Coupe transversale d'une feuille de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* au MP×40 avec double coloration (original).

les tiges : La coupe transversale d'une tige montre de l'extérieur vers l'intérieur :

-Une couche subéreuse, sous la quelle se trouve des canaux excréteurs de différentes tailles.

Parenchyme corticale.

-Tissu conducteur, constitué vers l'extérieur par le liber qui contient des fibres extra-xylémiennes qui sont présentés en minces bandes alternant régulièrement avec d'autres éléments du liber ; en coupe, elles apparaissent de forme rectangulaires, avec une lumière cellulaire très réduites. Et vers l'intérieur le bois homoxylé qui constitue essentiellement des trachéide, en plus des rayons ligneux appelé souvent rayon médullaire, dont l'épaisseur en section tangentielle est ordinairement d'une seule cellule(rayons unisérie).

-Au centre se trouve le parenchyme médullaire où se trouve le xylème primaire.

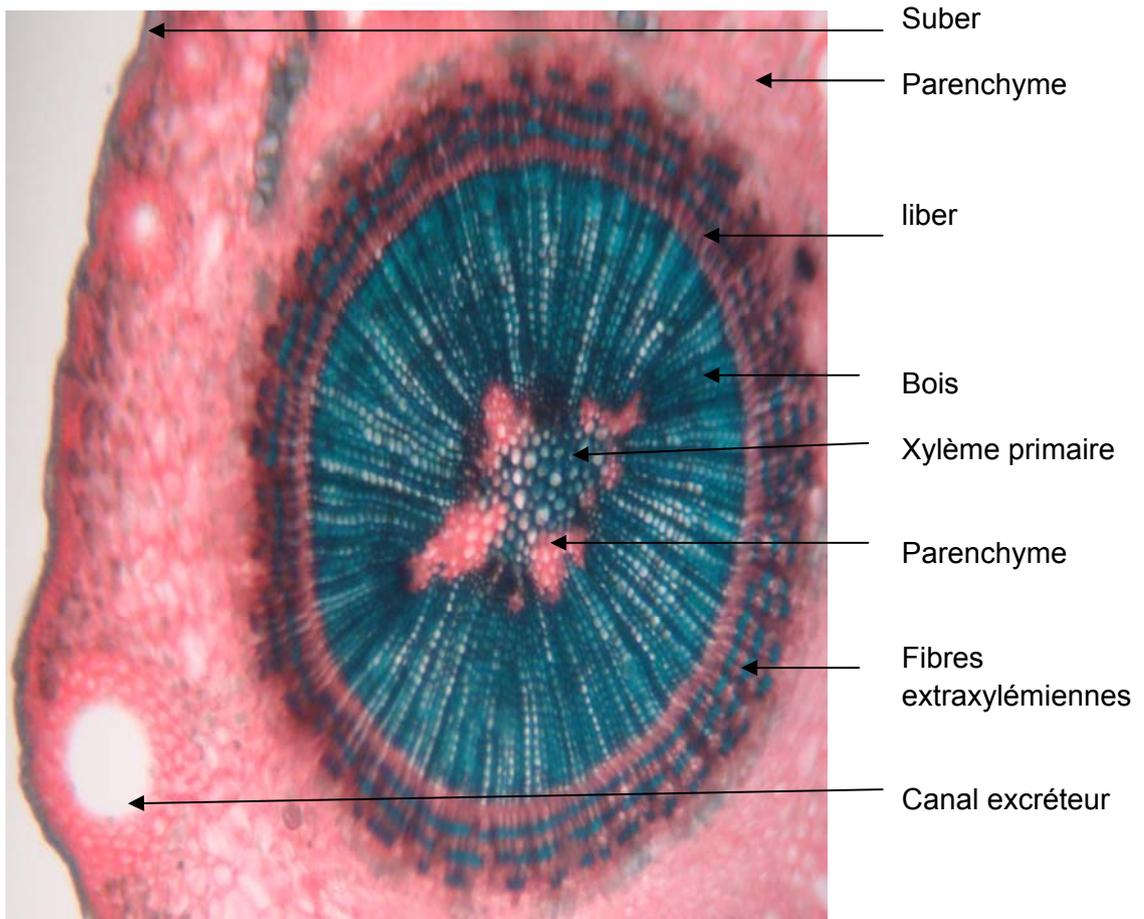


Figure 3.21: Coupe transversale d'une tige de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* au MP×40 avec double coloration (original).

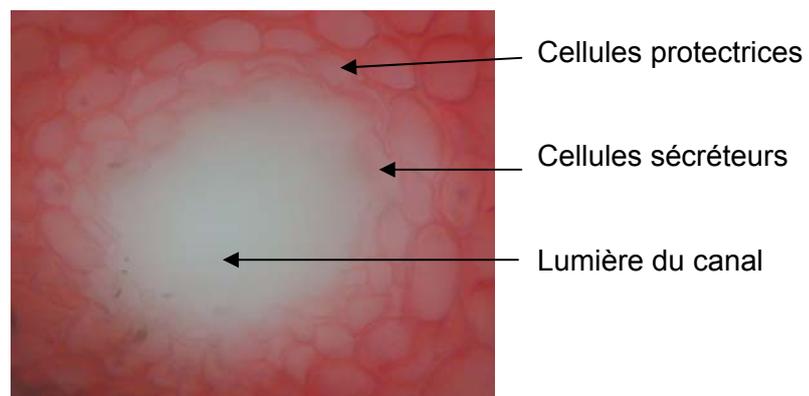


Figure 3.22: Structure du canal excréteur au MP×400 avec double coloration (original).

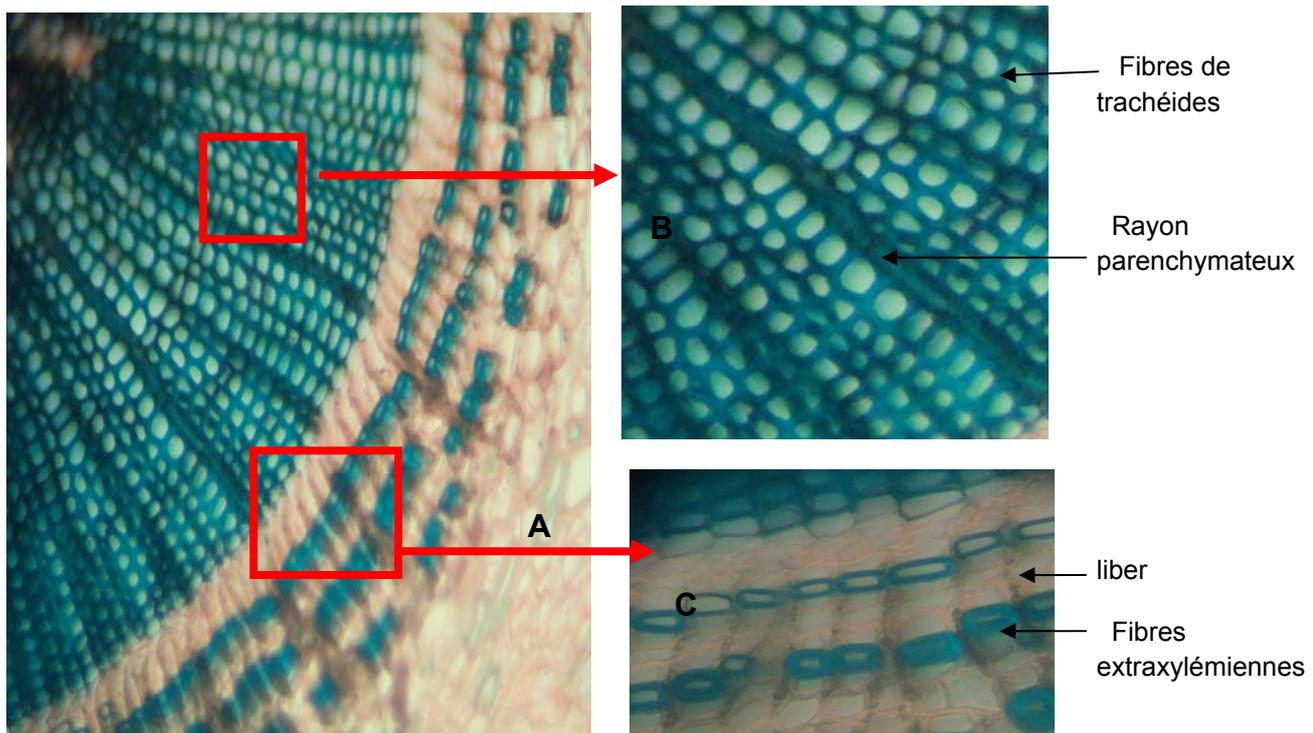


Figure 3.23 : A) Coupes transversales au niveau des tissus conducteurs au MP×100, B) Bois au MP×400 ; C) liber au MP×400 (avec double coloration) (original).

- Des coupes longitudinales montrent la structure des trachéides qui sont de type aréolés

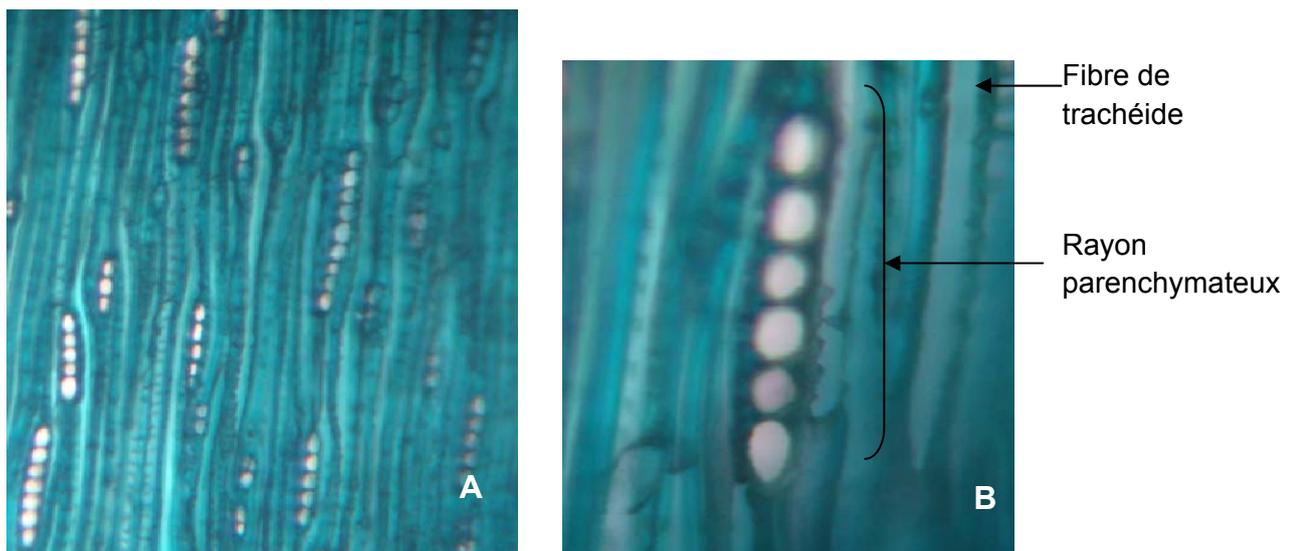


Figure 3.24: Bois en coupes tangentiels des tiges de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* dont A) observé au MP× 100 et dans B) observé au MP×400(original).

3.2. Détermination de la teneur en matière sèche

De par leur richesse en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau [191]. La détermination de la matière sèche et la teneur en eau sont mesurées par séchage jusqu'à obtention une masse constante dans une étuve à 60°C. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1: Résultats des pesées de *Cupressus sempervirens L. var horizontalis* après dessiccation pendant 96h.

Prise d'essai (g) (j_0) plante fraiche	Pesée j_1 (24h)	Pesée j_2 (48h)	Pesée j_3 (72h)	Pesée j_4 (96h)	Teneur en eau en % de poids frais
12,9185	4.8110	4,811	4,6871	4,6387	64.0925
14,9003	5.6117	5,4554	5,4098	5,3901	63.8255
13,5389	5.0169	4,8843	4,8438	4,823	64.3767
14,3597	5.4970	5.3387	5.2953	5,2748	63.2666
13,358	5,2593	5.1148	5.0708	5,0438	62.2413

Les résultats ont révélé une teneur moyenne en eau de $63.56\% \pm 0,84352$, ce qui correspond à plus de la moitié du poids des cônes frais (Figure 3.25), le reste représente la matière sèche ($36.47\% \pm 0,7582$).

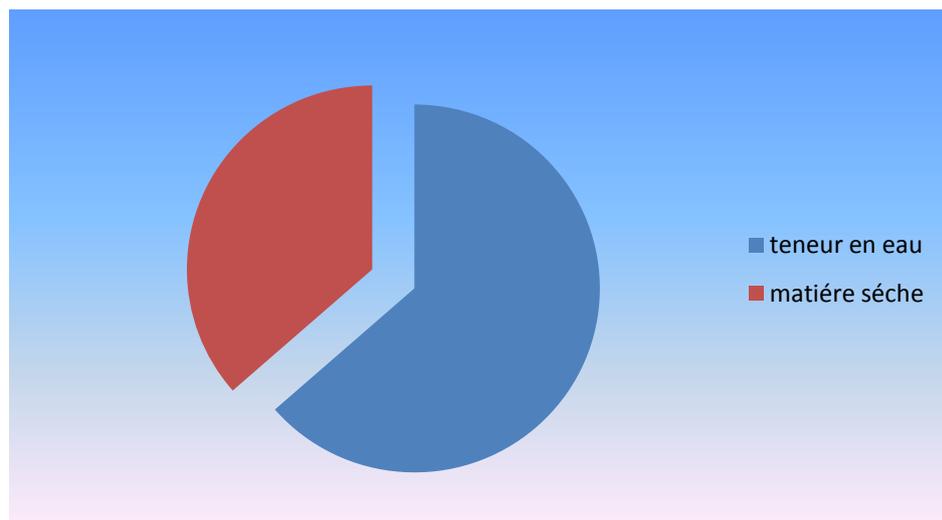


Figure 3.25 : Teneur en eau et en matière sèche des fruits frais de *Cupressus sempervirens var horizontalis*.

3.3. Détermination de la teneur en cendres

Le taux des cendres nous renseigne sur la quantité totale en sels minéraux présents dans les fruits de cyprès horizontalis. Le reste est constitué de matières volatiles et combustibles à cette température.

La calcination totale d'une prise d'essai de 2 g de poudre végétale nous a permis d'obtenir les résultats consignés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Teneur en cendres totales de la poudre des fruits de cyprès *horizontalis*.

Poids de la capsule d'incinération (g)	Poids de la prise d'essai (g)	Poids de la capsule + cendres (g)	Taux des cendres %
16.4436	2.0017	16.5532	5.47
52.1535	2.0006	52.2613	5.38
66.4321	2.0011	66.5461	5.69

Les résultats font ressortir un taux moyen de cendres de $5.51\% \pm 0.1594$, ce qui représente la fraction minérale du fruit. Ces valeurs indiquent que les fruits de cyprès *horizontalis* sont riches en matières organiques ($94.49\% \pm 0.1594$).

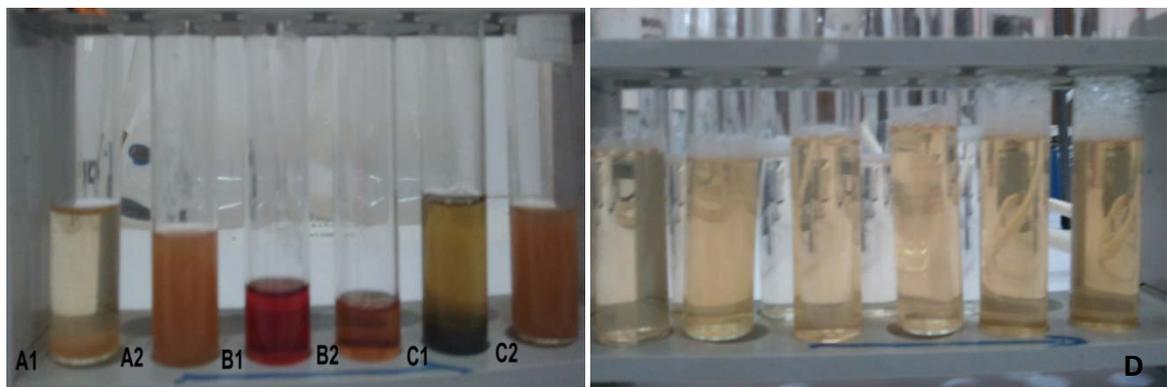
3.4-Etudes des principes actifs

3.4.1. Réactions de caractérisation de la plante

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* nous a permis d'obtenir des résultats consignés dans le tableau 3.3 et la figure 3.26.

Tableau 3.3: Résultats des réactions en tubes sur la poudre des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*.

Familles chimiques	Observations	Résultats
Tanins	Coloration verdâtre	Présence de tanins cathéchiques
flavonoïdes	Coloration orange	Présence de flavonoïdes
saponosides	Im= 166.66	Im=166.66
mucilages	Précipité floconneux	Présence de mucilage



Légende :

Test de mousse: A1: tube de tests

A2 : témoin

Test des flavonoïdes: B1: tube de test

B2 : témoin

Test des tanins: C1: tube de test

C2: témoin

Test des saponosides: D

Figure 3.26: Réactions de caractérisation de la poudre des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (photo).

L'ensemble des réactions en tubes montre que celle relative aux tanins a été la plus franche avec une prédominance des tanins cathéchiques. Ces réactions ont mis en évidence également la présence des saponines en abondance, et des flavonoïdes dans les fruits. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par

Emmami et al., (2006) [192] et **Emammi et al ., (2007)** [193] sur les fruits de la même variété.

3.4.2. Etudes des composés volatiles

3.4.2.1. Rendement de l'extraction

L'huile essentielle extraite à partir de la matière végétale fraîche par hydrodistillation, se caractérise par une faible teneur de l'ordre de 0.4%. Ce rendement est le même que celui rencontré par **Emmami et al., (2006)** sur une même variété d' Iran (192) et il est voisin de ceux trouvée par **Emmami et al., (2007)** (0.38%) [193] et **Maldan et al., (1997)** (0.45%) [161].

3.4.2.2. Caractérisation de l'huile essentielle

a)-Caractéristiques organoleptiques :

Les caractères organoleptiques d'une huile essentielle sont liés à la composition de l'huile, étant donné que la plupart des constituants volatils de cette dernière sont odoriférants (tableau 3.4).

Tableau 3.4. : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis*.

Caractéristiques	Description de l'huile essentielle étudiée	Description selon la littérature [197,198]
Aspect	liquide	Liquide
Couleur	Incolore	Incolore ou faiblement jaunâtre
Odeur	Boisée, puissante de résine	Balsamique et boisée
Saveur	Piquante, amère	Acerbe, amère, très prononcé

b)-Caractéristiques physico-chimique :

Les propriétés physico-chimiques constituent des données utiles pour son appréciation tant sur le plan économique et scientifique. Ainsi, elles sont considérées comme un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Nos essais sont réalisés selon un protocole précis et déterminés par des méthodes normalisées **AFNOR** (Tableau 3.5).

Tableau 3.5: Les indices physicochimiques de l'huile essentielle étudiée.

Paramètres	Résultats	Méthodes
L'indice d'acide	1.68	Titrimétrie
L'indice de saponification	262.12	Titrimétrie
L'indice d'ester	15.73	Titrimétrie
L'indice de réfraction	1.46	Réfractométrie
Densité	0.86	Pycnomètre

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide indique le taux d'acides libres, il permet de d'évaluer l'état de détérioration d'une huile essentielle. Un indice d'acide inférieur à 2 (faible quantité d'acides libres) correspond à une bonne conservation de l'essence [194]. Nos résultats ont montré que cet indice est relativement faible, prouvant ainsi que l'huile essentielle est stable et ne provoque pas d'oxydation. En effet, l'huile en s'oxydant se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acide. L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes entraîne un indice élevé. Selon **Kanko et al., (2004)**[194] le faible indice de réfraction de l'huile essentielle

indique sa faible réfraction de la lumière ce qui favorise son utilisation dans les produits cosmétiques. L'huile essentielle de notre plante présente un faible indice de réfraction, ce qui s'explique probablement par sa faible teneur en monoterpènes oxygénés.

La valeur du taux de saponification indique le poids moléculaire moyen, plus l'indice de saponification est élevé plus la masse molaire est faible [195]. Nos résultats ont montré que l'huile essentielle étudiée présente un indice très élevé.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire cependant insuffisante pour caractériser une 'huile essentielle. Il est donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

3.4.2.3. Analyse qualitative et semi quantitative de l'huile essentielle par CG/MS

L'analyse par CG/MS de l'huile essentielle des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* selon les conditions opératoires citées précédemment a fourni 50 pics dont 46 ont été identifiés (84%) (Figure 3.27).

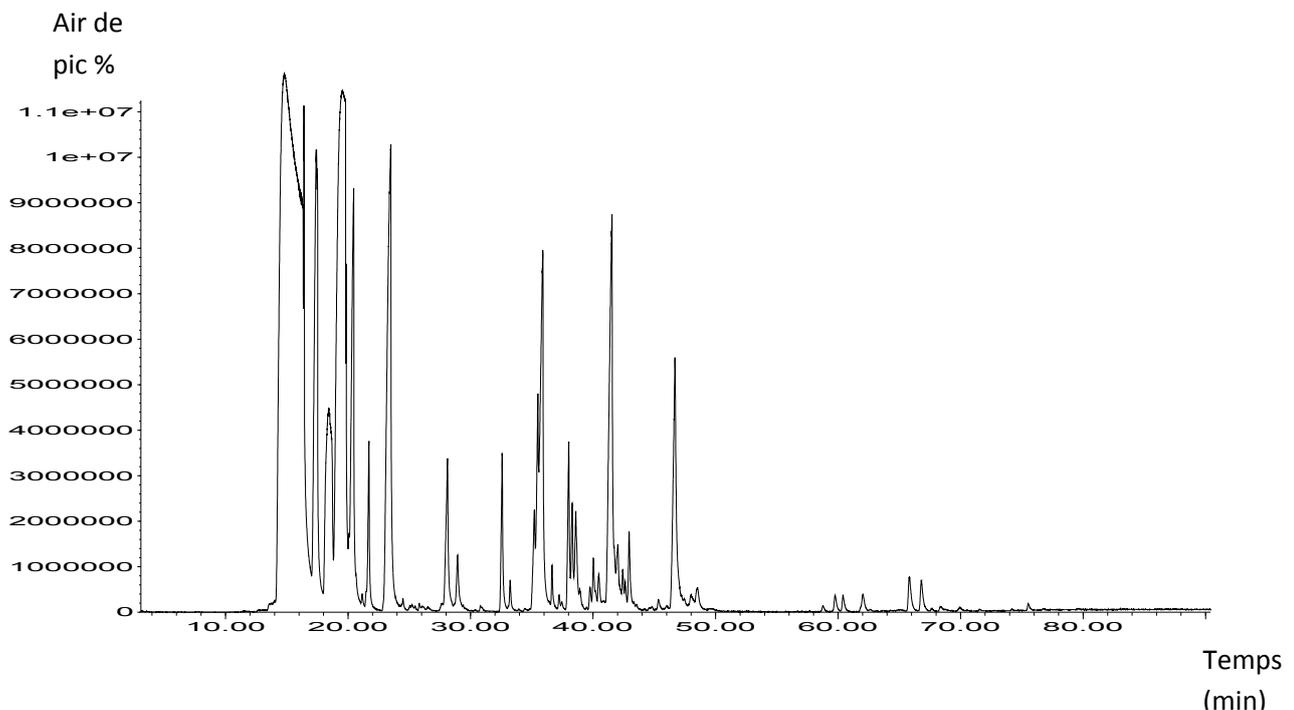


Figure 3.27 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*.

L'identification des composés de l'huile essentielle par CG/MS s'est basée essentiellement sur la comparaison du spectre de masse de la molécule inconnue et par leur IK calculé avec le type de colonne capillaire HP5-MS à celui d'un composé pur fourni par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse (Tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens var horizontalis*.

N°	Composé	TR(min)	%	IK	Qual
1	α-Pinène	14.8	36.05	931	96
2	β-Phellandrène	17.42	5.92	977	91
3	β-Myrcène	18.43	4.51	995,	80
4	3-Carène	19.55	15.90	1016	96
5	Limonène	20.41	4.36	1032	96
6	4-Carène	21.16	0.12	1046	97
7	δ -terpinène	21.69	1.05	1055	94
8	α-terpinolène	23.44	6.63	1088	97
9	Non identifié	24.48	0.09	1107	50
10	Trans-p-menth-2-en-1ol	25.22	0.07	1122	95
11	Non identifié	25.47	0.02	1127	60
12	Camphor	25.83	0.04	1134	97
13	Non identifié	26.09	0.03	1139	25
14	terpinen-4-ol	28.10	1.44	1179	95
15	α -terpinèol	28.94	0.58	1195	94
16	Thymol methyl ether	30.82	0.05	1239	90
17	Bornyl acétate	32.57	0.94	1281	98
18	Tricyclène	33.23	0.21	1297	87
19	Tricyclène	35.21	0.75	1337	87
20	α- Cubebène	35.49	1.47	1343	98
21	Terpinyl acétate	35.86	3.95	1350	91
22	Copaène	36.66	0.28	1366	99
23	Gamma-murolène	37.23	0.09	1377	96
24	B-Elemène	37.45	0.07	1382	97
25	(+)-Longifolène	38.01	1.01	1393	99
26	Cedrène	38.29	0.68	1398	95
27	B-Caryophyllène	38.59	1.00	1405	99
28	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrène	39.76	0.15	1432	72
29	α -caryophyllène	40.03	0.41	1438	98
30	B-cubebène	40.47	0.29	1449	94
31	Germacrène D	40.82	0.10	1457	97
32	Germacrène D	41.51	4.89	1473	96

33	Isoledène	42.01	0.67	1484	97
34	α -Terpinène	42.43	0.41	1494	81
35	(+)- Δ -Cadinène	42.95	0.66	1507	97
36	Nerolidol	44.81	0.05	1556	90
37	Caryophyllène oxide	45.35	0.10	1571	72
38	Epiglobulol	46.01	0.05	1588	47
39	Cédrol	46.68	3.06	1606	94
40	Tau.-cadinol	48.00	0.21	1641	99
41	α -cadinol	48.51	0.28	1655	93
42	Non identifié	58.77	0.05		35
43	Manoyl oxide	59.76	0.15		91
44	Non identifié	60.41	0.14		72
45	Epi-manool	62.03	0.18		86
46	Non identifié	65.82	0.35		30
47	Non identifié	66.81	0.31		83
48	Non identifié	68.38	0.06		46
49	Totarol	69.94	0.04		99
50	fleximel	75.54	0,05		90
	Total identifié		84		
	Monoterpènes hydrocarbonés		24		
	Monoterpènes oxygénés		14		
	Sesquiterpènes hydrocarboné		26		
	Sesquiterpènes oxygéné		12		
	Diterpènes oxygéné		8		
	Non identifié		8		

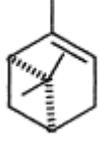
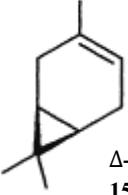
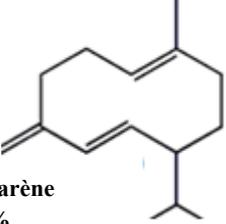
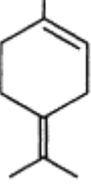
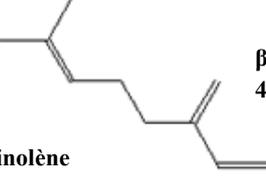
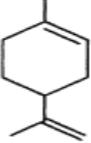
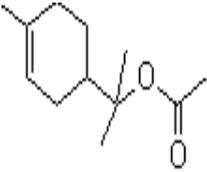
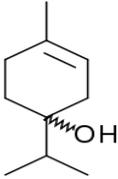
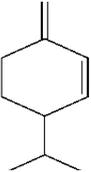
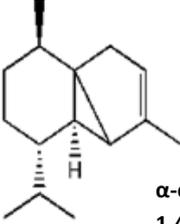
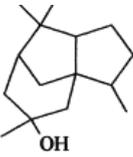
Les composés sont classés en ordre de leur élution sur la colonne HP5-MS en utilisant des homologues des séries de n-alcanes.

TR : temps de rétention.

IK : indice de Kovats relatifs aux n-alcanes - sur la colonne HP5-MS.

Le tableau suivant présente les 11 composés majoritaires, il s'agit du α -pinène (N°1; 36.05%) qui est le premier composé majoritaire, suivi de Δ -3-carène (N° 4; 15.90%) qui représente le deuxième composé important. Les autres composés majoritaires sont α -terpinolène (N°8 ; 6.63%), B-phellandrène (N°2; 5.92%), germacrène-D (N° 32; 4.89%), β -myrcène (N° 3; 4.51%), limonène (N°5 ; 4.36%), terpinyl acétate (N°21, 3.95%), et cédrol (N°39 ; 3.06%), α -cubebène (N°20 ; 1.47%) et terpinène-4-ol (N°14 ; 1.44%).

Tableau 3.7: Composés majoritaires, proportions et familles.

Composés	Proportions	Familles
	α-pinène 36.05%	Hydrocarbures monoterpéniques
	Δ-3-carène 15.9%	
	Germacrène-D 4.89%	
	α-terpinolène 6.63%	
	β-myrcène 4.51%	
	Limonène 4.36%	Monoterpènes Oxygénés
	Terpinyl-acétate 3.95%	
	Terpinen-4-ol 1.44%	
	B-phellandréne 5.92%	
	α-cubébène 1.47%	Hydrocarbures sésquiterpéniques
	Cédrol 3.06%	Alcool sésquiterpénique

D'après ces résultats, il apparaît que l'huile essentielle des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* se caractérise par un équilibre entre les composés monoterpéniques et sésquiterpéniques, avec existence de quelques composés diterpéniques.

Nous remarquons que parmi les 38% des composés monoterpéniques et 63.16% de ces composés sont des hydrocarbures en particulier : α -pinène, Δ -3-carène, α -terpinolène, Germacrène-D, B-myrcène, Limonène et qui sont considérés comme produits majoritaires. Ils représentent 24% de la totalité des constituants de cette huile essentielle. Le reste, représenté par les monoterpènes oxygénés représentent 36.84% et que sont constitués majoritairement par : Terpényl-acétate et cédrol (8.35 % de la totalité des constituants identifiés) (tableau3.6).

Nous constatons l'existence aussi de 38% des sesquiterpènes parmi les 46 constituants identifiés, les hydrocarbures constituent 68.42%. Parmi les alcools sesquiterpéniques mis en évidence, le cédrol qui s'avère majoritaire avec 3.06% de la totalité des constituants de cette huile essentielle (tableau3.6). Nous avons également observé la présence de quatre diterpènes faiblement représentés (8%).

Les résultats obtenus relatifs aux composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens var horizontalis* sont comparés avec ceux des autres huiles essentielles de la même variété et également avec celles de la variété *pyramidalis* dans certains pays (tableau3.8).

Comparés à certains travaux [192,196] rapportés dans le tableau 3.8, nos résultats montrent que nous avons identifié plus de constituants dans l'huile essentielle de cette variété. Nous avons noté certaines compatibilités notables de proportions de certains constituants dans l'huile par rapport à celles extraites de la même variété du Mexique. Cependant, il existe des différences par rapport à celle de la variété d'Iran.

Que ce soit pour la variété *horizontalis* ou *pyramidalis* la présence de α -pinène a été révélé comme composé majoritaire dans l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L. présente dans différents pays cités dans le tableau 3.8. Cependant, leur pourcentage dans l'huile essentielle étudiée (36.05%), ainsi que celle du Mexique (49.81%), et de l'Egypte (48.2%) est inférieur à ceux des huiles essentielles des variétés iranienne (59.2%), tunisienne (64.1%), et croatienne (69.9%).

Tableau 3.8: Principaux constituants de l'huile essentielle des cônes femelles de *Cupressus sempervirens* L. selon l'origine.

Composés majoritaires	<i>C.semper var horiz</i> [présente étude]	<i>C.semper var horiz</i> (Mexique) [196]	<i>C.semper var horiz</i> (Iran) [192]	<i>C.semper var pyram</i> (Croatia) [161]	<i>C.sempers var pyramid</i> (Egypte) [197]	<i>C.semperviren var pyrami</i> (Tunisie) [198]
α -pinène	36.05%	49.81%	59.2%	69.9%	48.2%	64.1%
Δ -3-carène	15.90%	17.94%	-	11.7%	19.1%	7.8%
α -terpinolène	6.63%	3.44%	-	3.6%		2.6%
β -phellandrène	5.92%	6.21%	-			-
Germacrène-D	4.89%	-	2.1%			2.5%
B-myrcène	4.51%	6.185%	3.4%			2.6%
Limonène	4.36%	5.55%	2.4%			1.5%
Terpényl-acétate	3.95%	-	3.2%			2.4%
cédrol	3.06%	-	-			3.1%
α -cubebène	1.47%	0.04%	-	1.9%		-
Terpinène-4-ol	1.44%	0.32%	-			
N° de composés identifiés	46	20	9	16	49	47

Le Δ -3-carène s'est révélé comme le deuxième composé le plus important de toutes les huiles essentielles extraites des variétés de différents pays avec des taux assez comparables. Cependant, la variété *horizontalis* d'Iran ne renferme pas ce composé, mais contient comme second composé majoritaire le Δ -2-carène (14.9%).

Pour les variétés *horizontalis*, on constate que notre plante présente la particularité d'être la seule parmi les variétés étudiées de différentes origines qui possède des composés ditéropéniques.

Selon **Senatore et al.**, les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs tels que le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante, et la présence de chémotypes [199].

3.4.3 Etude des composés non volatiles

3.4 3.1. Rendement de l'extraction de la fraction non volatile

La teneur en substances non volatiles miscibles dans les solvants apolaires (éther de pétrole) est de 8.279% ce qui correspond à 1.66 g /20 g de la poudre des fruits étudiés. En ce qui concerne les substances non volatiles miscibles dans les solvants polaires, la teneur est de 16.43% correspondant à un résidu de 3.28 g pour 20 g de la même poudre comme illustré dans la figure 3.28.

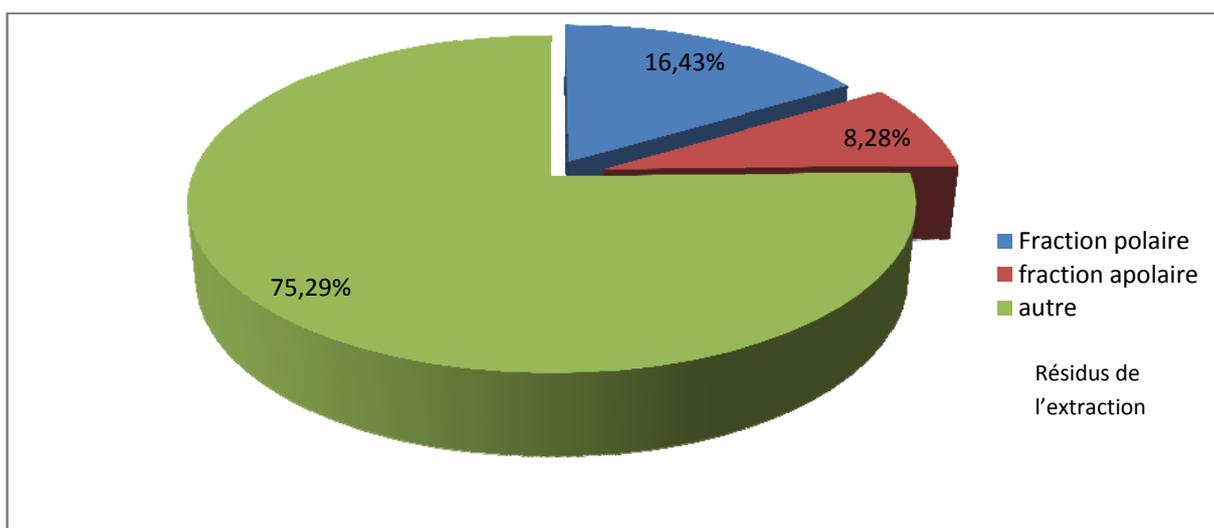


Figure 3.28: Teneur des cônes femelles de *Cupressus sempervirens.L. var horizontalis* en substances polaires et apolaires.

Le rendement de l'extrait méthanolique obtenu est très proche de celui obtenu par Cariel et Jean [200]. Ces derniers ont obtenu un résidu de 33g pour 200g de la plante (cônes) soit un rendement de 16,5%.

3.5. Activités biologiques

Nous avons étudié les activités antimicrobiennes et anti-oxydantes des extraits préparés. Les résultats observés lors de l'évaluation d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque du produit, d'une part, et d'autre part, sa quantité relative dans l'extrait. Ainsi, l'activité marquée d'un extrait peut tout aussi bien provenir d'une faible quantité de constituants très actifs, que d'une grande quantité de constituants peu actifs. De plus, il se peut qu'une activité observée résulte de la somme d'activités de plusieurs constituants [201,202].

3.5.1. Activité antimicrobienne

Nous avons intéressé à étudier l'effet antimicrobien de notre plante, car dans les dernières années, les scientifiques ont mis l'accent sur l'augmentation des infections humaines causées par des bactéries pathogènes et des champignons. Malheureusement, les micro-organismes développent une résistance à de nombreux antibiotiques en raison de l'utilisation indiscriminée des antibiotiques commerciaux [203,204]. Actuellement, les gens se tournent vers des produits naturels. Par conséquent, l'utilisation des huiles essentielles est moins dommageable pour la santé humaine [205,206].

La détermination du pouvoir antimicrobien des fruits de la plante étudiée, s'est réalisée en appliquant la méthode de diffusion par des disques sur gélose. Cette méthode nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle ainsi que de celui de l'extrait méthanolique des fruits.

L'estimation de l'activité antimicrobienne des extraits est basée sur une échelle de mesure donnée par **Mutai et al., (2009)** [207]. Ils ont classé le pouvoir

antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 5 classes :

Très fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone est **supérieur à 30mm** ;

Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone **varie entre 21 et 28mm** ;

Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone **varie entre 16 et 20mm** ;

Intermédiairement inhibitrice lorsque le diamètre **varie entre 10 et 16mm** ;

Non inhibitrice lorsque le diamètre est **inférieur à 10 mm**.

Pour le control; Nous avons réalisé un antibiogramme pour estimer la sensibilité des souches testées à un ou plusieurs antibiotiques tableau 3.9.

Pour les extraits testés ; les diamètres des zones d'inhibition observés autour des disques imprégnés d'huile essentielle pure et d'extrait méthanolique (1mg/1ml dilué dans le méthanol) après 24 heures d'incubation à 37°C pour les bactéries et après 48 heures à 25°C pour les levures sont reportés dans le tableau 3.10.

Tableau 3.9. Résultats de l'antibiogramme (Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne en mm).

	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
Gentamicine	40	40	21	34	21	30	-
Ampicilline	32	13	42	26	42	12	-
Penicilline G	28	R	34	R	32	R	-
Cefazoline	44	R	40	26	40	30	-
Norfloxacine	30	17	30	40	30	26	-

Tableau 3.10 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).

souches		Huile essentielle	Extrait méthanolique
Gram+	<i>B.subtilis</i>	14	10
	<i>B.cereus</i>	18.5	14
	<i>S.aureus</i>	20	15
Gram-	<i>E. coli</i>	R	R
	<i>P. aeruginosa</i>	13,5	20
	<i>K. pneumonie</i>	R	R
Levure	<i>C.albicans</i>	R	R

Nos résultats ont montré la présence des zones d'inhibition obtenues par l'huile essentielle et même par l'extrait méthanolique sur trois souches de Gram positif testées. Ces résultats montrent l'efficacité de ces deux extraits naturels des fruits de *Cupressus sempervirens L. var horizontalis* (Figure3.29, Figure3.30, Figure3.31, Figure3.32).

L'huile essentielle s'est caractérisée par une activité modérément inhibitrice sur les souches *B.cereus* (18.5mm) et *S.aureus* (20mm), et par une activité légèrement inhibitrice sur les souches *B.subtilis* (14mm).

En ce qui concerne l'extrait méthanolique, son pouvoir inhibiteur vis-à-vis les trois souches de Gram positif testées est léger (*B.subtilis*=10mm ; *B.cereus*=14mm ; *S.aureus*=15mm).

En ce qui concerne l'action antimicrobienne de nos deux extraits sur les souches de Gram négatif, il en ressort que seule la souche *P. aeruginosa* qui s'est montrée globalement sensible. Cette espèce, selon nos résultats est considérée intermédiairement sensible et vis-à-vis de l'huile essentielle (13.5mm) et sensible à l'extrait méthanolique(20mm). Dans cette optique , on considère que l'huile essentielle présente un pouvoir modéré sur cette souche, tandis que l'extrait méthanolique se caractérise par un léger pouvoir.

Pour les autres espèces telles que *K.pneumonie* et *E.coli*, et de la levure *C.albicans* aucune zone d'inhibition n'a été observé autour des disques chargés que ce soit par l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique. Ces souches possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antimicrobienne de nos extraits.

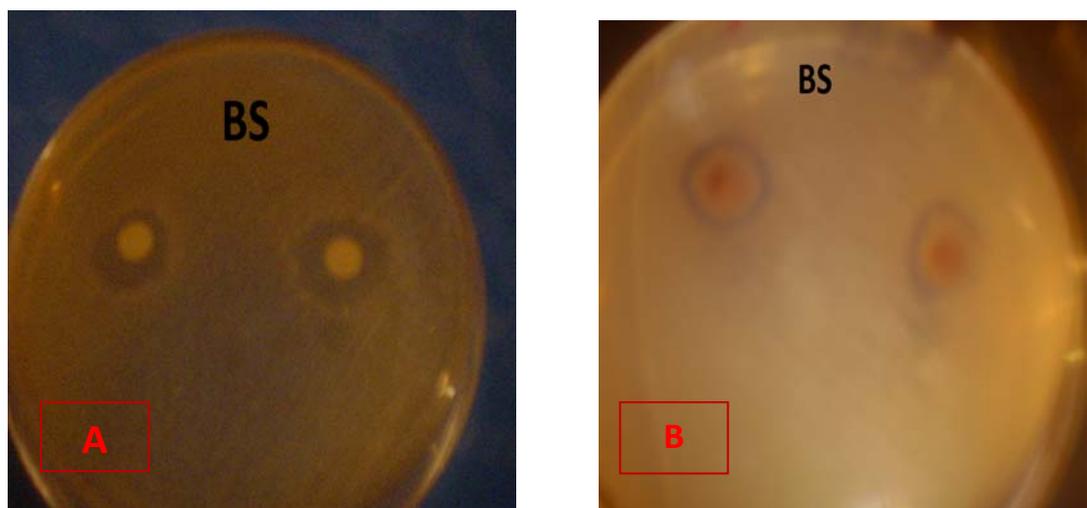


Figure 3.29: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique testés sur *Bacillus subtilis*.

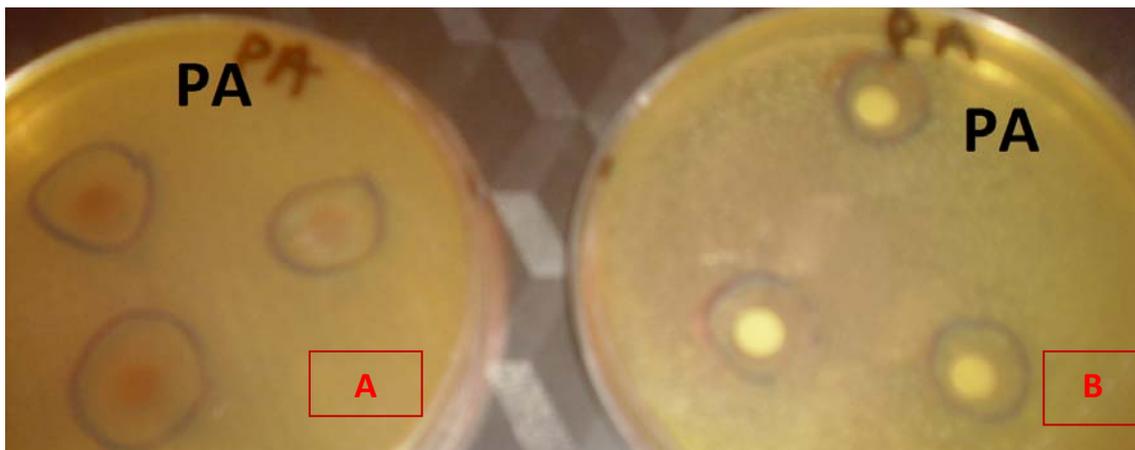


Figure 3.30: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique testés sur *Pseudomonas aeruginosa*.

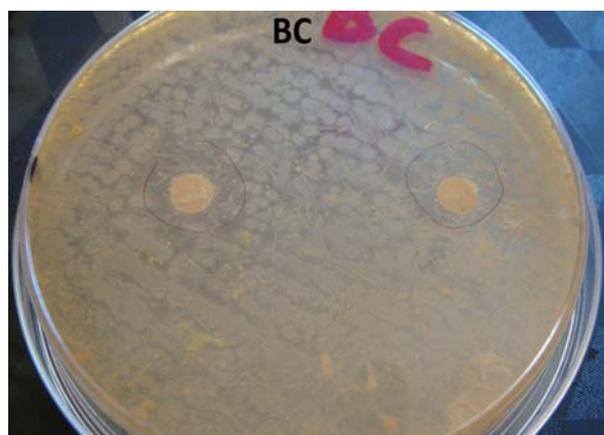


Figure 3.31: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Bacillus cereus*.



Figure 3.32: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique testés sur *Staphylococcus aureus*.

L'activité inhibitrice des extraits vis-à-vis la majorité des souches est très faible par rapport à celle des antibiotiques. Cependant, l'activité de l'huile essentielle vis-à-vis *B.cereus* avec une zone d'inhibition de 18.5mm s'est révélée plus élevée de celle exercé par Ampécilline (13mm) et par Norfloquine (17mm). Le même effet est observé vis-à-vis *P.aeroginosa* avec une zone d'inhibition de 20mm, valeur proche de la zone exercé par Gentamicine (21mm). L'extrait méthanolique, avec sa zone d'inhibition de 20mm a un effet voisin de celui de la Gentamicine (21mm). Il est à noter que le solvant utilisé pour dissoudre le résidu sec de l'extrait organique (méthanol) n'a donné aucune zone d'inhibition. Selon **Valero et Salmeron (2003)** [208], il est difficile de faire une comparaison entre les résultats obtenus avec ceux rapportés par la littérature en raison des problèmes suivants :

- .Nature du matériel végétal (l'espèce, extrait ou l'HE, origine géographique, saison de cueillette) ;
- .Procédé d'extraction ;
- .Niveau de pureté du produit final et sa conservation ;
- .Nature des souches testées ;
- .Méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne ;
- .Milieux de culture employés (milieu synthétique ou nature).

Les bactéries à Gram (-) possèdent une forte résistance, cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides ce qui rend cette membrane imperméable à la plupart des agents biocides [209,210].

Cependant, **Deans et Ritchie (1987)** [211] n'ont pas trouvé de différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram(-) et celle des bactéries (Gram+), tel que rapportés dans nos résultats. Les différentes bactéries Gram- et Gram⁺ testées présentent une activité variable à l'égard de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique employés puisque *Bacillus cereus*; bactérie à Gram(+) a été plus sensible que *Pseudomonas aeroginosa*; une bactérie Gram (-) vis-à-vis l'extrait méthanolique.

La qualité des souches tests est déterminante pour la valeur de l'essai, car celles-ci sont l'instrument de mesure dans la méthode de détermination de l'activité d'un produit antimicrobien [212].

Dans nos conditions expérimentales, l'huile essentielle et l'extrait méthanolique n'ont donné aucune activité inhibitrice sur la souche *Candida albicans*. Ceci pourrait être expliqué par l'absence de substances à activité antifongique comme les alcaloïdes [111]. Les études réalisées par **Emmami et al., (2006)**, confirment l'absence des alcaloïdes au niveau des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis*, ils ont également signalé la résistance de *C. albicans* à l'égard de l'huile essentielle de cette variété [192].

Pseudomonas aeruginosa qui a la réputation d'être très résistante à toute sorte d'agents antimicrobiens et antibiotiques [213], a montré dans cette étude une sensibilisation modérée vis-à-vis l'extrait méthanolique et légère à l'action de l'huile essentielle.

Budhiraja et al., (1999) ont montré que le composé terpinen-4-ol possède un effet inhibiteur contre *P. aeruginosa* [214], et l'huile essentielle testée contient 1.44% de ce composé. Donc nous pouvons en déduire que probablement ce composé a contribué à l'inhibition de cette souche.

Une étude réalisé par **Carlos Ramón et al.,(2012)** [196] ont montré que l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens var horizontalis* exerce un pouvoir antibactérien léger sur *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition légèrement inférieure de celle que nous avons trouvé, et même sur la souche *Staphylococcus aureus*.

L'activité antibactérienne sur *C. sempervirens var horizontalis* de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants selon les résultats de screening phytochimique de la plante et CG/MS de l'huile essentielle, notamment les flavonoïdes, les tanins, les terpènes [111, 215, 216, 217, 218, 219].

Ces résultats suggèrent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est en relation avec l'activité de ces composants. Le terpène cyclique, l' α -pinène qui agit probablement sur la membrane en modifiant la liaison des phospholipides dans la bicouche lipidique des bactéries Gram positif. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus dans ce travail. Nous pouvons donc en déduire que le composé terpénique peut être le majoritaire en agissant sur les bactéries Gram (+) comme *S.aureus*.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C sempervirens var horizontalis* en plus de l' α -pinène pourrait, en partie, être associés aussi d'autres constituants majeurs tels que α - phellandrène, α -terpinyl acétate et cédrol. Ces composés ont été signalés par leurs effets antimicrobiens [219, 220, 221, 222]. Dans notre présente étude, ces constituants ont été révélés parmi les composés majoritaires. Ce que nous a laissé pensé que probablement ils participent à l'effet antimicrobien de cette huile essentielle testée.

Selon **Marino et al., (2001)**, les composants minoritaires peuvent également contribuer à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, impliquant probablement un certain type de synergie avec d'autres composés actifs [223].

3.5.2 Activité antioxydante

Il y a un besoin important en antioxydants efficaces à partir de sources naturelles comme alternatives aux additifs alimentaires de synthèse afin de prévenir la détérioration des aliments, médicaments et cosmétiques. Les extraits et les huiles essentielles de nombreuses plantes ont été étudiés pour leur activité antioxydante [224, 225, 226].

L'activité antiradicalaire de nos produits a été évaluée par la méthode de DPPH. Une solution méthanolique de DPPH• (2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl) présente une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant, la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance [227].

Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence de chacun des produits à tester a été mesuré à 517 nm, les résultats figurant dans les tableaux et les figures ci-après illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique isolés à partir des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* et vis-à-vis du radical libre DPPH. Ces résultats sont comparés entre eux et avec celle d'un antioxydant standard (α -tocophérol) (Tableau 3.11, Figure 3.33, Figure 3.34, Figure 3.35 et Appendice C).

Tableau 3.11: Pourcentages de l'activité antiradicalaire moyenne de l'huile essentielle (A) et l'extrait méthanolique; (B) des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* et du standard α -tocophérol (C) vis-à-vis du radical libre DPPH.

(A) Concentrations (mg/ml)	activité de piégeur du radical DPPH (%)	(B) Concentrations (mg/ml)	activité de piégeur du radical DPPH (%)	(C) Concentrations (mg/ml)	activité de piégeur du radical DPPH (%)
15	6,1336	0,0001	8,62	0,005	36,2552
20	11,5036	0,001	25,0533	0,01	68,7462
30	16,4429	0,005	35,52266	0,02	76,0406
50	68,2519	0,01	59,9866	0,03	77,3665
75	70,569	0,05	73,03	0,04	77,6532
		0,2	88,5266	0,05	78,411

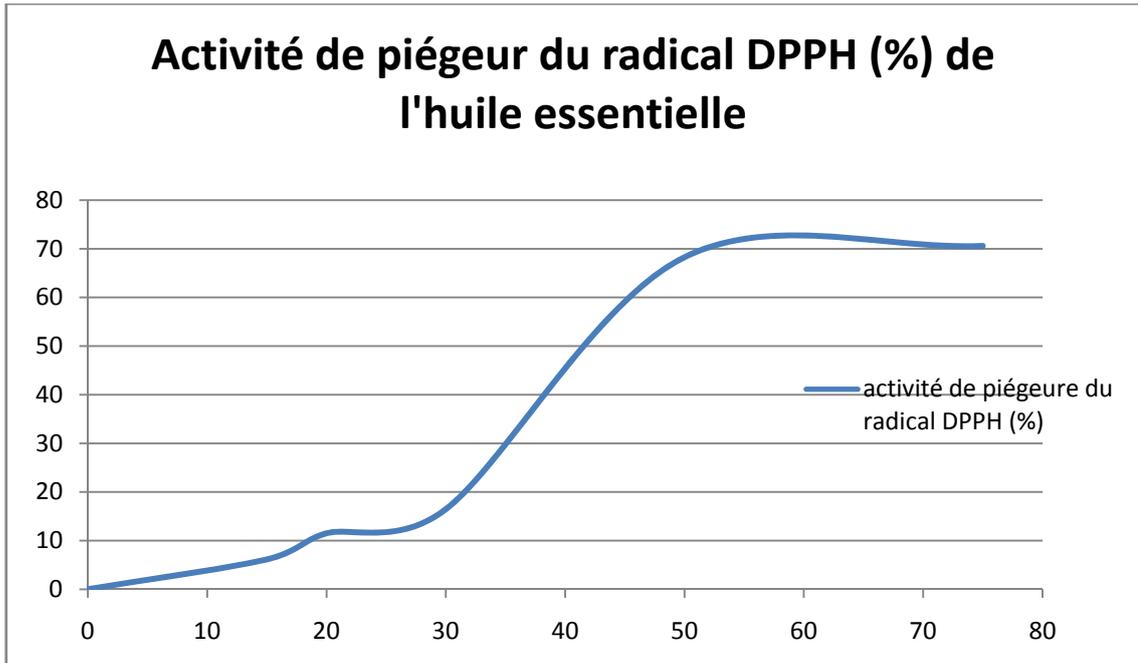


Figure 3.33: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

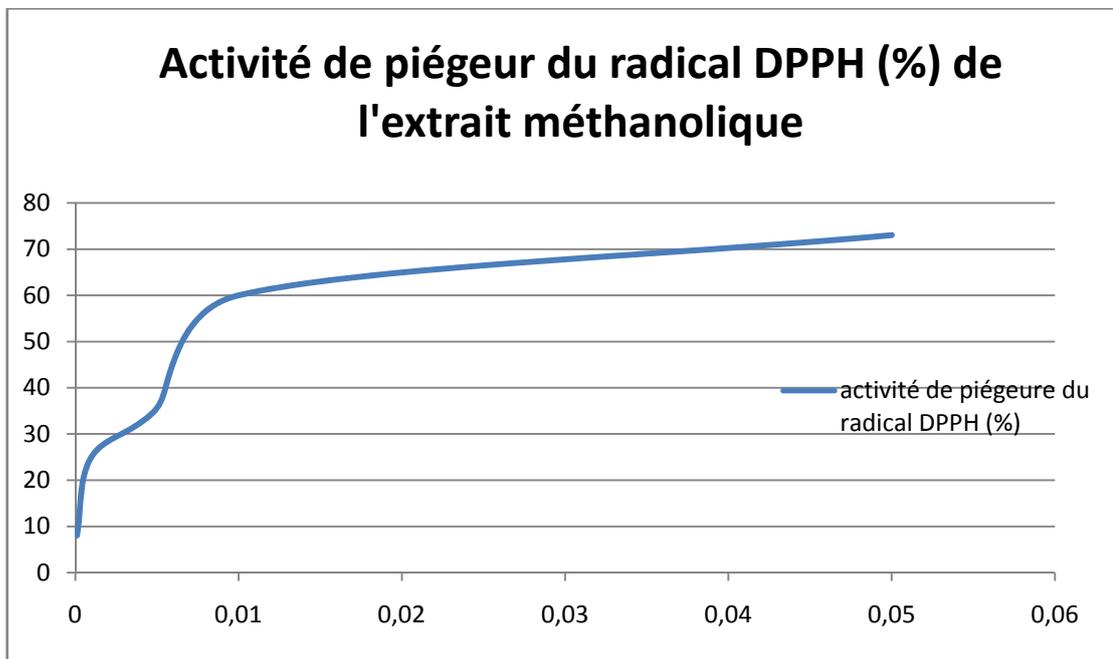


Figure 3.34: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

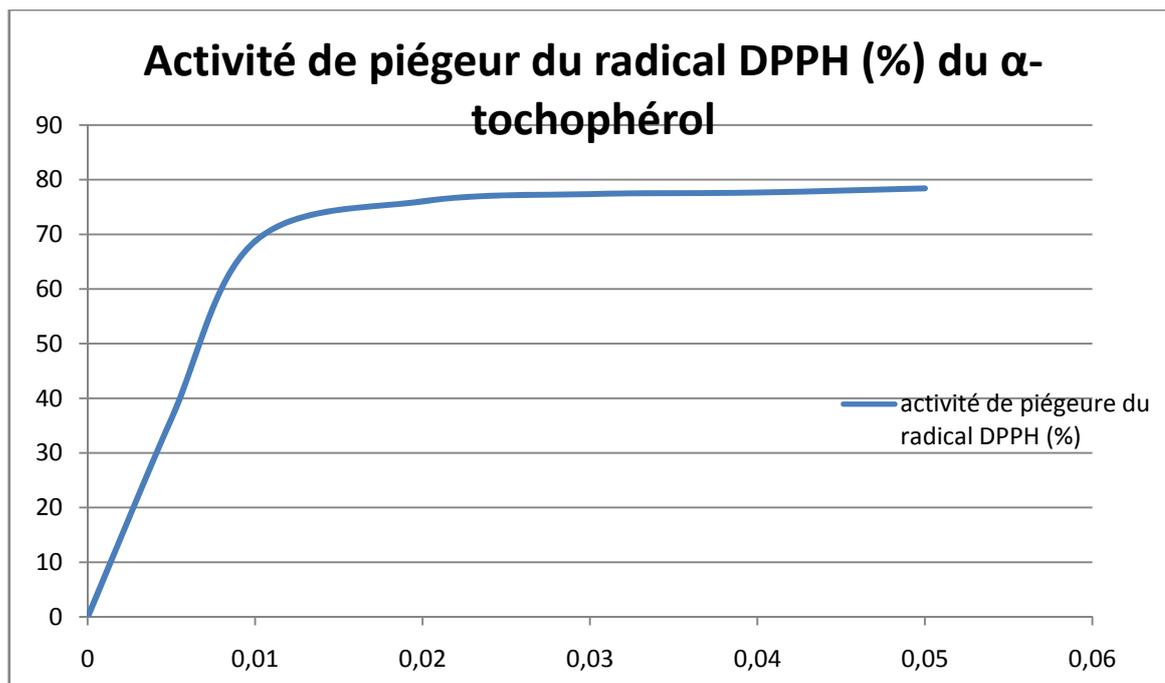


Figure 3.35: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de standard α -tocophérol des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

L'analyse de ces résultats montre que le pouvoir réducteur se différencie selon la nature de l'extrait isolé du même organe. On remarque que nos extraits présentent une activité antioxydante et que la faculté de piéger le radical libre DPPH est très importante avec l'extrait méthanolique qu'avec celle de l'huile essentielle.

Afin d'établir une comparaison entre les échantillons, nous avons déterminé l'IC50 de nos extraits (tableau 3.15), ce paramètre introduit par Brand-Williams et al., et utilisé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats. Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte 50% de l'activité de DPPH (couleur) [228].

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits :

- **Calcul de l'EC50** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, $EC50 = (IC50/mg \text{ de DPPH/ml})$].
- **Calcul du pouvoir antiradicalaire (APR)** qui est inversement proportionnel à l'EC50 ($APR = 1/EC50$) [229]. Plus ces valeurs ne tendent pas et s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente.

Tableau 3.12: Activité antiradicalaire des extraits des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* et du standard.

échantillons	IC50 mg/ml	EC50(mg/mg DPPH)	APR
Huile essentielle	43.370±0.9184	1084.3± 22.9608	0.0009±1.95.10 ⁵
Extrait méthanolique	0,0081±0.00085	0.2013±0.02125	5.0063±0.5315
α-tocophérol	0,0071±0.00023	0.1773±0.0056	5.645±0.1835

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique est un excellent antioxydant naturel. Il possède des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'il agit à faible dose, il inhibe l'oxydation de 50 % de DPPH avec seulement une concentration de 0.0081mg/ml et un APR de l'ordre de 5.0063.

En comparant le pouvoir de l'extrait méthanolique avec le standard α- tocophérol qui a inhibé 50% l'activité de DPPH à une dose de 0.0071 mg/ml et un APR de 5.645, se montre l'excellent pouvoir de l'extrait étudié.

En ce qui concerne l'huile essentielle, elle présente également une activité antiradicalaire, mais très faible (43.37mg/ml) par rapport l'extrait méthanolique ou au standard.

Ce résultat concorde avec celui trouvé par **Gianni et al., (2005)** [9], qui a montré que l'effet antioxydant de l'huile essentielle de cette plante est faible. Ce

chercheur [9] et **Ruberto & Baratta, (2000)** [230] ont noté que les huiles essentielles avec une plus grande abondance de monoterpènes hydrocarbonés sont presque inefficaces. Ainsi selon **Jukié et Miliš, (2005)** [231], l'activité antioxydante des huiles essentielles peut être liée au contenu phénolique. Et ont noté que l'étude comparative sur la faculté de réduction du radical DPPH par des chémotypes différents a prouvé que les chémotypes phénoliques montrent in vitro des capacités antioxydantes plus exprimées et plus fort que les chémotypes non phénoliques. Donc, nous pouvons expliquer ce faible pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de cette plante par leur richesse en composés monoterpéniques hydrocarbonés de l'ordre de (24%) et pauvreté en composés phénoliques (0.05%) qui ont été détectés par CG/MS.

En ce qui concerne l'extrait méthanolique, leur activité antiradicalaire pourrait s'expliquer par la présence des tanins et des flavonoïdes, qui sont détectés par les tests préliminaires réalisés dans cette étude. En effet les flavonoïdes et les tanins sont des piègeurs de radicaux libres [232]. Par ailleurs, **Uchida et ses collaborateurs** suggèrent que les tanins ont une action de piégeage radicalaire sur le radical 1-1 diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [233].

En rappel, cette même espèce s'est avérée riche en flavonoïdes tels que cupressuflavone, amenoflavone, rutine, quercitrine, myricitrine [234]. Certains de composés phénoliques (anthocyanidine, catechines flavones, flavonols and isoflavones) tannins (acide ellagique, acide gallique, isopropanoïds phenyl, acide caffeique, acide coumarique, acide ferulique) lignans, catéchol [235].

En comparaison avec les résultats de travail de **Emmami et al., (2007)** [193], Les extraits méthanoliques des feuilles et des fruits de toutes les variétés de *Cupressus sempervirens L.* ont également été prouvés posséder une activité antioxydante lorsqu'ils ont été testés en utilisant d'autres méthodes (FTC et TBA). Ils ont démontré que l'extrait méthanolique des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* a une forte activité antioxydante était même plus élevé que l' α -tocophérol.

Dans une autre étude réalisé par **Ibrahim., et al (2007)** [236], l'extrait méthanolique de cette plante à exercer une forte activité antiradicalaire contre le

radical 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) ainsi que certains des composés phénoliques isolés (par exemple, la quercitine, la rutine, l'acide caféique et l'acide p-coumarique) en comparaison avec α -tocophérol et butyle hydroxyle toluène (BHT) comme des antioxydants standards.

Compte tenu de ces résultats obtenus par rapport à la forte activité antioxydante des extraits méthanolique de cette plante et surtout de ces cônes femelles, nombreux chercheurs ont étudié le rôle important de cet effet dans la capacité hépatoprotecteur. Selon **Rizk et al., (2007)** et **Koriam et al., (2009)** [237,63] le prétraitement avec l'extrait de méthanol à partir des graines et des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* respectivement a donné un effet hépatoprotecteur contre des substances défavorables (CCL4, acétate de plomb), qui peuvent, à leur tour, conduisent à la formation des radicaux libres et donc d'augmenter la susceptibilité à des dommages hépatiques. Ils ont suggéré que l'utilisation de cette plante médicinale dans la thérapie est recommandée, cet effet liée à ses constituants et ce résultat a été soutenu par des examens histologiques.

CONCLUSION

L'évolution des esprits et le refus du « tout chimique » qui se manifeste de plus en plus ouvrant un peu plus la porte au « retour », c'est-à-dire au respect de l'essentiel, la vie.

Ce travail a été mené dans le cadre de la valorisation de la flore spontanée dans la région de Blida et nous avons concerné à une plante médicinale ; *Cupressus sempervirens* L. et précisément à la variété *horizontalis* qui est moins étudiée par rapport à la variété *pyramidalis*.

Une étude macroscopique des différents organes de la plante a permis de faire une description de la plante étudiée. En outre des observations microscopiques photoniques des coupes histologiques ont montré l'existence des structures de sécrétions de type canaux excréteurs.

Un screening chimique de la plante a rapporté que les cônes de *Cupressus sempervirens* L. var *horizontalis* sont riches en tanins et saponines et en plus ils possèdent des flavonoïdes.

L'huile essentielle a été extraite par la technique d'hydrodistillation avec un rendement de l'ordre 0.4%. L'analyse qualitative de l'huile essentielle par CG/MS, a permis d'identifier quarante six composés (46), dont onze (11) sont majoritaires parmi les quels : α -pinène, Δ -3-carène, l' α -terpinolène et β -phellandrène.

L'analyse semi-quantitative a mis en évidence l'équivalence entre les composés monoterpéniques et sesquiterpéniques, avec une dominance des composés hydrocarbonés par rapport aux dérivés oxygénés.

L'étude analytique de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* a présenté 11 composés majoritaires où l' α -pinène est le composé principal avec une teneur de 36.05%, suivie par le 3- Δ - caréne avec un teneur de 15,90%. Tandis que L'extrait méthanolique a présenté un rendement de 16.43%

L'effet antimicrobien des extraits naturels des *Cupressus sempervirens* L. var *horizontalis* est variable selon les souches microbiennes. D'après les résultats obtenus, la plus grande valeur d'inhibition enregistrée sur les souches est de l'ordre de 20mm, qui signifie une activité modéré de l'huile essentielle sur *S.aureus* et de l'extrait méthanolique sur *P.aeruginosa*. Tandis qu'aucune activité n'a été décelée vis-à-vis de *K.pneumonie* et *C.albicans*.

L'extrait méthanolique des fruits de la plante étudiée manifeste une forte activité antiradicalaire qui est très proche de celle du standard α -tocophérol. Cependant l'huile essentielle possède un faible pouvoir antiradicalaire.

Dans la perspective de poursuivre et approfondir ce travail, il serait nécessaire :

- De faire une étude phytohistologique.
 - De réaliser une identification à l'extrait méthanolique et tester les effets de ces composés.
 - De déterminer les Concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) pour chaque huile essentielle. -
- D'attacher une attention particulière pour l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de cette plante dans les études à venir, qui s'est avérée très importante.

APPENDICE A

PHOTOS DE L'APPAREILLAGE



Figure01 : Appareil de soxhlet (photo).



Figure 02 : Rotavapeur (photo).



Figure 03 : Four à moufle (photo).

APPENDICE B

TECHNIQUE DE LA DOUBLE COLORATION

Les phases de la coloration sont les suivantes :

- Un prétraitement dans l'éther est nécessaire pour vider les cellules de leurs contenus pendant 20 minutes.
- Un rinçage abondant à l'eau distillée.
- Les coupes ont été placées 10 à 15 min dans l'hypochlorite (destruction des structures cellulaires), suivie par un rinçage à l'eau pendant 15 à 20 min ;
- puis dans de l'acide acétique [0.1] (il a pour but d'augmenter l'affinité des colorants), toujours suivie par un rinçage à l'eau pendant 15 à 20 min.
- par la suite une coloration au vert de méthyle à 1 % durant 10 min; puis au rouge Congo à 2 % pendant 10 min ont été faites. Avec rinçage à l'eau pendant 15 à 20 min après chaque coloration.
- Un montage des coupes dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle. L'observation se fait immédiatement au microscope photonique doté d'un appareil photo et cela pour éviter le dessèchement des coupes.

APPENDICE C
TEST ANTIOXYDANT

(Capacité de réduction du radical libre mesuré à 517 nm)

Tableau 1: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

Concentrations (mg/ml)	Activité de piègeur du radical DPPH (%)		
	Abs1	Abs2	Abs3
5	2,1889	2,6565	/
10	/	4,1297	4,44
15	6,6141	6,478	5,349
20	/	11,5978	11,4094
30	17,078	17,6537	15,2093
50	69,0078	/	67,496
75	75,251	74,2894	62,1668

Tableau 2: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

Concentrations (mg/ml)	Activité de piègeur du radical DPPH (%)		
	Abs1	Abs2	Abs3
0,0001	/	10,34	6,9
0,001	23,4	21,81	29,95
0,005	36,39	37,9	32,29
0,01	53,53	65,12	61,31
0,05	75,12	72,31	71,66
0,2	87,5	89,13	88,95

Tableau 3 (suite Appendice C): Pourcentages de l'activité antiradicalaire de standard α -tocophérol des cônes femelles de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

Concentrations (mg/ml)	Activité de piègeur du radical DPPH (%)		
	Abs1	Abs2	Abs3
0,005	38,71	36,1668	33,889
0,01	69,536	66,8813	70,5358
0,02	76,1436	74,7005	77,2779
0,03	77,3872	76,5536	78,1587
0,04	77,8198	76,7192	78,4208
0,05	78,0656	/	78,7564

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Mogode, D.J., " Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad", Mémoire de l'université de Bamako, (2005).
- 2- Bérubé-Gagnon., "Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana* ",89 Mémoire de l'université de Québec, (2006).
- 3- Bernard, B., "Plantes médicinales du monde ", Croyances et réalités, (2001), 173 p.
- 4- Fabienne, F., "caractérisiques hydrauliques, régulation stomatiques et efficience d'utilisation de l'eau de quatre espèces de conifères méditerranéens (*Cupressus sempervirens*, *Cedrus atlantica*, *Pinus halepensis*, *Pinus nigra*)", mémoire de l'université de Henri Poincaré, (2002).
- 5- De Vilmorin, J.B., " Histoires d'arbres.", (2003), 56p.
- 6- Said, O., Khalil, K., Fulded, S and Azaizeh, H., "Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Israel, the Golan Heights and the West Bank region". J. Ethnopharmacol, (2002), 83: 251-265.
- 7- Madar, Z., E.Hugo, Miriam, C., Joseph,R., Zvi, S and Abraham, S., "Antifungal terpenoids produced by Cypress after infection by *Diplodia pinea* f. sp. *Cupressi*". J. Phytochem., (1995), 38: 351-354.

- 8- Karkabounas, S., D. Kiortsis, J., Zelovitis, P., Skafida and Demetzos, C., "Effects of *Cupressus sempervirens* cone extract on lipid profile in Wistar rats". *J. Atherosclerosis Supplements*, (2003), 3: 137-138.
- 9- Gianni, S., Silvia, M., Mariavittoria, M., Martina, S., Stefano, M., Matteo, R et Renato, B., "Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods", *Food Chemistry* 91, (2005), 621–632.
- 10- Giovannelli, A., De Carlo, A., "Micropropagation of mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L)", (2007), 93-105.
- 11- Gharbi, Z., "A Guide to medicinal plants in North Africa", 105p.
- 12- Yahiaoui, F., "Cypress. Projet Education et Conservation de la Biodiversité, Algérie".
- 13- Riou-Nivert, P., "Connaissance et reconnaissance", (2001), 215 p.
- 14- Dictionnaire encyclopédique Troussel, connu aussi sous le nom d'encyclopédie Troussel, Paris, (1886-1891).
- 15- Valmont-Bomare, M., "Dictionnaire raisonné universel de l'histoire naturelle", V.4, 179-430.
- 16- Panetsos, C.P., "Inherited differences between populations and individuals of *Cupressus sempervirens* L. (in Greek w. English summary)" . Ministry of Agriculture, Forest Research Institute", N° 17, (1967), 19 p.
- 17- Cornelissen, N., "Journal d'agriculture pratique, De Belgique", V.8, (1856), 529 p.
- 18- Jean-Claude, R., "Flore forestière française : région méditerranéenne" . Institut pour le développement forestier (France)", France, (2008), 299 p.

19- Désiré, C., "Nouveaux éléments d'histoire naturelle médicale", V.2, (1869), 75 p.

20- Copyright © 2005 Pharma-Sites.

21- Maurice, D., Jean-Marie, P., "Encyclopédie visuelle des arbres et arbustes", (2008), 118 p.

22- Maillard, C., Vaillant, J., Babadjamian, A., Diaz-Lanza, A.M., et Balansard, G., "Révision des structures des acides néocupressiques I, II et III des galbules vertes de *Cupressus sempervirens* L. Plantes médicinales et phytothérapie", V.26, n°1, (1993), 5-9.

23- Kherif, N.S., "Etude de la variabilité des températures extrêmes et pérennité des arbres urbains dans la région de Constantine", Mémoire de magister en écologie et environnement", (2006).

22- Dupont, F., "Guignard. J-L. Botanique: systématique moléculaire", (2007), 49 p.

23- Guibourt, N.J.B.G., "Histoire naturelle des drogues simples : au cours d'histoire naturelle professé à l'école de pharmacie de Paris", V. 2, (1869), 239 p.

24- Boullard, B., "Dictionnaire : Plantes et Champignons", (1997), 231 p.

25- Lanore, F., "Les huiles essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale", (2009), 134 p.

26- Stichmann.W., Stichmann-Marny.U., "Guide Vigot de la flore d'Europe". Editions Vigot, Paris, (2000),.447 p.

- 27- Moquin-Tandon, A., "Elements de botanique médicale : Contenant la description des végétaux utiles à la médecine et des espèces nuisibles à l'homme", (1861), 272 p.
- 28- Guibourt, N.J.B.G., "Histoire naturelle des drogues simples : au cours d'histoire naturelle professé à l'école de pharmacie de Paris", V. 2. (1869), 239 p.
- 29- Wikipédia l'encyclopédie libre.
- 30- Carrière, E.A., "traité général des conifères", (1855), 114 p.
- 31- Description de Coste (tome3, taxon n°3332) id, (1882), 9 p.
- 32- Farrar. J.L., "Les arbres du canada", (1996), 7 p.
- 33- Germain de Saint-Pierre, E., "Nouveau dictionnaire de botanique", (1870), 360 p.
- 34- Dupont. F., Guignard. J-L. Botanique: systématique moléculaire, (2007),49 p.
- 35- Boullard,B., "Plantes Médicinales Du Monde : Réalités et croyances", (2001),173 p.
- 36- Piotto B., Di Noi A, Seed propagation of Mediterranean trees and shrubs. © APAT. ISBN 88-448-0081-0, (2001).
- 37- Maurice, R., "Images de quelques arbres et arbustes communs en Lozère et ailleurs", (2010), 5 p.
- 38-CHAUMEIL, P., "Plasticité moléculaire de deux écotypes de pin maritime soumis à un stress osmotique. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I", (2006),12 p.
- 39- D'Orbign, C ., "Dictionnaire universel d'histoire naturelle", V.4. (1844), 550 p.

- 40- Dobr, J., " Cupressus dupreziana. Threatened Plants Newslett ", (1988), 8-20.
- 41- Henry Jhon Elwes, F.R.S.et Augustine Henry, M.A., "The tree of Great Britain and Ireland", V.5, (1844), 550 p.
- 42- Linnaeus, C., "Plantarum espèces 2", (1002), 1753.
- 43- Farjon, A., "Liste de vérification mondiale et Bibliographie des conifères", (1998).
- 44- Farjon, A., "A monograph of Cupressaceae and Sciadopitys". Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 1842460684", (2005).
- 45- Allemand, P., "Relations phyllogéniques dans le genre Cupressus (Cupressaceae)" . In : V. Grasso. E.P., Raddi (Eds), Il Cipresso Malattie e Difesa, Seminaire CEE du 23/24 novembre . Florence : Agrimed", (1979), 51-57.
- 46- Debazac, E.F., "Manuel des conifères. Gap: Imprimerie Louis-Jean", (1964),172 p.
- 47- Riou-Nivert, P., "Les résineux : Ecologie et pathologie", (2005), 36 p.
- 48- Axelrod, D.I., " Evolution of the Madro Tertiary geoflora. Botanical Review 24", (1958), 433-509.
- 49- Boscherini, G., Morgante, M., Rossi, P., Vendramin, G.G., "Allozyme and chloroplast DNA variation in Italian and Greek populations of *Pinus leucodermis*". Heredity 73, (1994), 284-290.
- 50- Vendramin ,G.G, Michelozzi ,M., Lelli ,L, Tognetti, R. " Genetic Variation in *Abies nebrodensis*: a case study for a highly endangered species. Forest Genetics 2", (1995), 171-175.

51- Larbi, H. et Belgherbi. B., " Les cyprès en Algérie : Historique, caractéristiques et valeurs". Institut de Biologie - Centre Universitaire de Mascara, Algérie. Projet MedCypre : le cyprès dans les pays Meda.Palermo", (2007),15 p.

52- Lemoine-Sebastian C., Rouane P., "La sexualité des Cupressacées: Observations sur la répartition des sexes chez *Actinostrobus pyramidalis* Miq. et chez *Cupressus sempervirens*. - 1978 - dendrologie, répartition sexe, *cupressus sempervirens*, *Actinostrobus pyramidalis*, localisation fleurs - 6 fig- Société Botanique de France", Bull. Soc. bot. Fr., Bull. Soc. Bot. Fr. (1904), 31-44.

53- Khatib. A., " Rôle des espèces ligneuses dans les systèmes agroforestiers (SAF) du nord de la syrie (Classification –Caractéristiques- Production)", Mémoire de Diplôme d'Etude Approfondie. Agriculture durable en milieu méditerranéen, (1999).

54- Danielle, R., " Conseil en aromathérapie. 2^e Édition", (2008), 105-106.

55- Danielle, R ., "Les nouvelles plantes qui soignent", (2005), 60 p.

56- Sarembaud, A et Poitevin, B., "Médicaments à usage homéopathique: dictionnaire pratique", (1996), 78 p.

57- Lelong, F., "Les belles et les bêtes : précis illustré de toxicologie botanique à usage vétérinaire. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes", (2008), 327 p.

58- Biaye, M., "Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de Docteur d'état en pharmacie", (2002), 38 p.

59- Quelques conseils et indications pratiques en aromathérapie.

60- Larousse, Encyclopédie des plantes médicinales "identifications, préparations, soins. 2nd Edition. Copyright © 1996, 2001 Dorling Kindersiey Limited, Londres".

- 61- Said, O.S., Khalil, M.et Fulder, H., "Ethno-pharmacological survey of medicinal plants in Israel, the Golan heights and the west Bank region. *Journal of Ethnopharmacology*", (2002), 83: 251-265.
- 62- Amouroux, P., Jean, D.et Lamaison, J.L., "Antiviral activity in vitro of *Cupressus sempervirens* on two human retroviruses HIV and HTLV". V.12, n°5, (1998), 367-368.
- 63- Koriem, K.M.M., "Lead toxicity and the protective role of *Cupressus sempervirens* seeds growing in Egypte", (2009).
- 64- Karkabounas, S., Kiortsis,D.N. , Zelovitis, J., Skafida, P., Demetzos,C., Malamas, M., Elisaf, M.et Evangelou,A., " Effects of *Cupressus sempervirens* cone extract on lipid parameters in Wistar rats. Laboratory of Physiology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina, Greece", (2003).
- 65- Emmami, S., Tayarani-Najaran,Z., Sabouri Ghannad,M., Khajeh Karamadini, P.et Khajeh Karamadini, M ., "Antiviral Activity of Obtained Extracts from Different Parts of *Cupressus sempervirens* against Herpes Simplex Virus Type 1. Iranian Journal of Basic Medical Sciences". Vol. 12, No. 3-4, Autumn , (2009), 133- 139.
- 66- Baudoux,D., "Guide Pratique d'Aromatherapie familiale et scientifique. Paris : Amyris ", (2008).
- 67- AFNOR, A., "Huiles essentielles, échantillonnage et méthode d'analyse. Ed. PARA Graphic ", T.1, (2000), 471 p.
- 68- AFNOR, B., "Huiles essentielles, Monographie relative aux huiles essentielles. Ed. PARA Graphic" , T.2, V. 1, (2000), 323 p.

69- AFNOR, C., "Huiles essentielles, Monographie relative aux huiles essentielles. Ed. PARA Graphic", T.2, V. 2,(2000), 663 p.

70- Funk and Wagnalls., " Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls. URL : <http://www.Funkandwagnalls.com>", (2004).

71- Reo, P.u., "Nutrient composition and biological evaluation of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds: Plant foods Hum. Nut" , (1996), 27-34.

72- SMITH, G.C et GRIVETTI L.E., " Cultural use of edible wild plants in Burkina Faso", West Africa. FASEB J., 8, (1994).

73- Loza-Tavera., "Herminia Monoterpenes in Essential oils: Biosynthesis and Properties". *Adv. Exp. Med. Biol "*. 464, (1999), 49-62.

74- Bruneton, J., "pharmacognosie. Phytochimie, Plantes médicinales", (3ème éd.). Paris : Editions médicales internationales. Editions Tec And Doc Lavoisier", (1999), 1120p.

75- Rasooli , L.et Mirmostafa , S.A., "Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*". 73, (2002), 244 – 250.

76- Cowan ,M.M., " Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*" 12, (1999), 564-582.

77- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*". 88, (2000), 308-316.

78- Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Abdelouahid D.E., "Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie- *Phytothérapie*" ; V.6, (2008), 160-164.

79- Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF., "Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne- *Phytothérapie*" ; V.6 ; (2008), 160-164.

- 80- Rota, M.C., Herrera,A., Martine,R.M., Sotomayor,J.A., Jordan,M.J., "Antimicrobial activity and chemical composition of *Tymus vulgaris*, *Tymus zygis* and *Tymus hyemalis* essential oils- Food Control"; V.19, (2008), 681-687.
- 81- Bekkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., "Review MI-Biological effects of essential oils- A review Food and Chimical Toxicology"; V. 46, (2008), 446-475.
- 82- Lahlou, M., "Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils- Phytotherapy research"; V.18,(2004), 435-448.
- 83- Anton, R., Lobstein, A., "Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles" ; TEC & Doc, Paris,(2005), 522 p.
- 84- Vandermoten, S., Cusson, M., Francis, F., Haubruge, E., "La biosynthèse des isoprénoides chez les pucerons : une cible potentielle de nouveaux bio-insecticides-Biotechnol "; Agron. Soc. Environ ; V.12 ; (2008), 451-460.
- 85- Bernad, M., "Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles, Editions Dangles". (2000).
- 86- Fleuriet, A., Jay-Allemand,C. et Macheix,J.J., "Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*", (2005),121-216.
- 87- Lugasi , A., Hovari , J.,Sagi, K.V.et BsL., "the role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*". 47(1-4), (2003), 119-125.
- 88- Urquiaga, L et Leighton, F., "Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*, 33 (2) : 55-64. Van Den Broucke C. O., Dommissse R. A., Esmans E. L. et Lemli J. A. 1982. Three methylated flavones from *Thymus vulgaris*. *Phytochemistry*", 21 (10) : (2000), 2581-2583.
- 89-Macheix, J.J., Fleuriet, A., et Jay–Allemand, C., " Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes", (2005), 4-5.

- 90- Fkih, S., " Etude de l'effet de l'irradiation ionisante sur certains polyphénols alimentaires et résidus pesticides". Diplôme Universitaire de Technologie (D.U.T) : Biologie Industrielle "(2007), 3-4.
- 91- Guignard, J.L., " Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris",(1996), 160 p.
- 92- Malagas,D., " Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT – Karthala", (1992), 232 p.
- 93- Chitindingu, K., Ndhlala, A.R., Chapano, C., Benhura. M.A.et Muchuweti, M., "Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus* (pigweed), *Brachiaria Brizantha* (*Upright Brachiaria*) and *Panicum maximum* (*guinea grass*), *Journal of food Biochemistry*", V.31, n°2, (2007), 206-216.
- 94- Stalikas, C.D., "Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*", (2007), 30:3268-3295.
- 95- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Tan, T.G., Ma,C., VanHung, N., Cuong, N.M., Bunyaphatsara, N., Soejarto, D.D et Fong, H.H.S.,. "Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*.*Phytochemistry* ", (2005), 66:2745-2751.
- 96- Kim, D.O., Chum, O.K., Kim, Y.J., Moone, H.Y.et Lee, C.Y., " Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums, *J-Agric Food Chem*",51, (2003), 6500-6515.
- 97- Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki ,F., Ogiwara ,T., Satoh ,K., Ito, H., Hatano ,T., Takashi ,Y. et Fujisawa ,S., "Molecular requirements of lignin–carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*" ,(2005),66: 2108 –2120.
- 98- Ampopo, O., " Plants that heal. *World Health*" ,(1977), 26 - 30.

- 99- Addy, M.E and Awumeye, M.K., "Effects of the extracts of *Desmodium adscendens* on anaphylaxis. *Journal of Ethno pharmacology*",(1984), 11: 283 - 292.
- 100- <http://www.rain-tree.com/ethnic.htm> [consulté le 12.10. (2009)].
- 101- Verhoeyen , M.E., Bovy ,A., Collins, G., Muir ,S., Robinson, S., De Vos C.H.R. et Colliver, S., "Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany*"., 53 (377) , (2002), 209 -210.
- 102- Perret, C., " Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*, *Article de thèse, université de Neuchatel*", (2001).
- 103- Karayana, R,. Spiral,R., Chaluvadi,M et Krichna,D., "Bioflavonoids classification pharmacological Biochemical effects and therapeutic potentiel, *Indian,J.,Pharm*". (2001).
- 104- Ghestem, A., Segun., Paris,M.et Orecchioni, A.M., "Le préparateur en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, Paris", (2001) ,273 p.
- 105-Atefeibu, E.S.I., " Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne d'*Acacia Nilotica* Var *Andesonii* .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop de Dakar" .,(2002),33 p.
- 106- Peronny, S., "La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie", (2005),151 p.
- 107- Gonzalez, A.G., Estevez-Braun,A., Coumarins." *Nat. Prod. Reprod*".14, (1997), 465-475.
- 108- Starvic, B., et Matula ,T.I., "Flavonoides in food. Their significance for nutrition and health. In : ONG ASH et Packer L eds. *Lipid soluble and antioxidants: Biochemistry and clinical applications*. Basel: Birkhauser Verlag", (1992), 274-294.

- 109- Das, H.C., Wang, J.H., et Lien, E.J., "Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoides: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. P. 133 – 136. In: Jucker E ed. Progress in Drug Research. Basel: Birkhauser Verlag. Das H. C. et Weaver G. M. 1972. Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. J. Chromatogr", (1994), 67:105-111.
- 110- Bidet D., Gagnault, J.C., Girard, P., et Trotin, F., "Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: les flavonoides. L'actualité chimique", (1987), 89-97.
- 111- Bruneton, J., "Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier", (1993), 278-279.
- 112- Aruoma, O.L., Spencer, J.P.E., Bulter, J. et Halliwell, B., "Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidant with trichloromethylperoxyl radicals. Free Rad. Res", (1995), 22: 187-190.
- 113- Middleton, E., Kadasnami, J.C., "The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London", (1993), 617-652.
- 114- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M. and Gazin, M., "Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation". *Arzneim Forsh / Drug Res*", (1996), 1-6.
- 115- De Oliveira, M.M., Sampaio, M.R.P., Simon, F., Gibert, B. et Mors, W.B., "Antitumor activity of condensed flavonols. *An. Acad. Brasil*", (1972), 44; 41-44.
- 116- Brownlee, H. E., Hedger, J. et Scott, L. M., "Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Phys. Mol. Plant Pathol*", (1992), 40; 227-232.
- 117- Kreofsky, T., Schlager, J. W., Vuk-Pavlovic, Z., Abraham, R.T. et Rohrbach, M.S., "Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. *Am.J., Resir. CELL. Mol. Biol*", (1992), 7;172-181.

118- Okuda ,T., Kimura,Y., Yoshida ,T., Hatano ,T., Okuda, H. et Arichi ,S., "Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver. Chem. Pharm. Bull",(1983) , 31;1625-1631.

119- Okamura ,H., Mimura ,A., Yakou ,Y., Niwano ,M. et Takahara, Y., "Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. Phytochem", (1993) ,33;557-561.

120-Milal., Scalbert, A and Expert, D., " Iron wth-holding by plant polyphénols and resistance to pathogens and rots. Phytochemistry" ,(1996),42: 1551-1555.

121- Kim, J.Y., Lim, H.J., Lee, D.Y., Kim, D.H., Jeon, R., Ryu, J.H., "In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*", (2009), 19: 937 -940.

122- Roulier, G., "Les huiles essentielles pour votre santé. Editions Dangles". (1999).

123- Luu, C., "Les essences majeures anti-infectieuses, l'aromatogramme. *Votre diététique*", N° 53,(2002).

124- El Kalamouni,C., " Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées". Thèse de Doctorat de l'Université de TOULOUSE, (2010).

125- Aravodis ,E., " Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*", 4 (2), (2005), 128-133.

126- Favier, A., "Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique ", (2003), 108-115.

127- Vansant, G., "Radicaux libres et antioxydants : Principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation »", (2004).

- 128- Novelli, G.P., Rok., "Role of free radicals in septic shock. *J physical pharmacol*", ,(1997), p48, 517-527.
- 129- Bartosikova , L., necas ,J., Suchy ,V.et Kubinova ,R., " Antioxydative effects of morine". in ischemia, reperfusion of kidney in the laboratory .*Drug and Chemical Toxicology*, (2003), 72:87-94.
- 130- Potterat, O., "Antioxydant and free radical scavengers of natural origin. *Curent Organic Chemistry*", 1, (1997), 415-440.
- 131- Catalano, A., Rodilossis, S., Caprari ,P., Coppola ,V.et Procopio ,A., "Lipoxygenase regulates senescence like growth arrest by promoting Ros-dependent p53 activation. *EMBOJ*", 4, (2005),17-179.
- 132- Hosein, S.R., Lytle,M., " Les antioxydants. Traducteur : Alaine Boutilier. *Catie Feuillet d'information*", (2001),50 p.
- 133- Hennebelle, T., "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamiles productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de doctorat. Lille", (2006) ,304 p.
- 134- Fridovich, L., "Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase,*J Biol Chem*", 231,(1970), 899-911.
- 135- Panda, K., Chatopardhayaya, R et Fhosh, M.K., " Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damae of proteins and increased proteolysis. *Free Radicals. Biol Med*", 27, (1999), 1064-1079.
- 136- Pincemail, j., Bonjean, K., Cayeux, K et defraigne, J.O., " Physiological action of antioxydant defences. *Nutrition Chimique et Metabolisme*", 16, (2002), 233-239.

137- Fiorucci, S., "Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice", (2006), 211 p.

138- Les antioxydants et les radicaux libres dans le corps humain © 2008 Copyright EuroNaturomFormation.

139- Justine, Odile, Carole PASTRE., "Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat en Vétérinaire. L'Université Paul-Sabatier de Toulouse", (2005).

140- Abuja, P.M and Albertini, R., "Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clinica Chimica Acta" 306 (2001). 1-17.

141- Durackova, Z., Djrolo, F., Hounbe, H., Avode, G., Attoulou, V., Addra, B., Kodjoh, N et Avimadj, M., "Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdjakova A (ed)", (2008), 19-43.

142- Le Perche, P., " Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection. Ed Nathan, Paris", (1994), 142 p.

143- Mielal, J.J., "Mechanism of enzyme like reactions involving human hemoglobin, Bioorganic chemistry, vol IV, Van Tamelen. Acad. Press, New York", (1978), 315-348.

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

145- Potterat, O., "Antioxydant and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*", 1, (1997), 415-440.

- 146- Madhavi, D.L., Deshpandle, S., et Salunkle, D.K., "Food antioxidants technological, Toxicological and health perspectives. Marcel Dekker, New York", (1996), 101 p.
- 147- Anderson , C.M., Hallberg , A., et Hogberg , T., " Advances in development of pharmaceutical antioxidants. Adv. Drug. Res.28", (1996), 65-180.
- 148- Krinsky, N.I., " Antioxidant functions of carotenoids. Free rad. Biol. Med". 7, (1989), 617-635.
- 149- Ekoumou, C., "Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako", (2003), 145 p.
- 150- Prat, R. ; « Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations ». Edition QUAE, Herman éditeurs, Paris 2007, 56 p.
- 151- Bouquet, A et Paris, R., "« Note sur le *Dionchqbyllum thollonii* baill. », Plantes médicinales et phytothérapie, Tome I", n° 4, (1967), 214- 220.
- 152- Linard, A., Jacquemin,H., et Paris, R. « plantes malgaches n° XXI sur les flavonoides du *Xyris semifuscata* (Xyriadacées) » Plantes médicinales et phytothérapie, Tome X, n°4, (1976), 267-275
- 153-Belkacem Debbou., "Extraction et caractérisation biochimique de l'huile d'argan (*Argania spinosa* L. Skeels), Institut National Agronomique (Alger)", (2002-2003).
- 154- Boubakar Souley Amadou., "Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* perr. Ex DC (Combretacea),Thèse de docteur en pharmacie".(2004),
- 155 - WILLEM, J.P., "Les huiles essentielles, médecine d'avenir", (2004), 318 p.

156- Rakotondramasy, V.C., "Isolement et détermination de structure de deux constituants majoritaires de l'huile essentielle d'une plante endémique de Madagascar : *Plushea aphanantha* Back.(Asteraceae). Diplôme d'Etudes Approfondies en Chimie organique option « Produits Naturels »", (1999).

157- Mimica-Dukic,N., Bozin, B., Sokovic, M. et Simin, N. "Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. Journal Of Agriculture and Food Chemistry",(2004), 52: 2485-2489.

158- Kabouche, A., Kabouche, Z., Bruneau., " Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (poiret) from Algeria. Flavour and Fragrance Journal", (2005), 20:235-236.

159- Kiran, B., Singh, G., "Essential oil composition of damask rose distilled under different pressures and temperature. Flav. Frag". 1, 17,(2002) , 136-140.

160- KOEDAM, A., "The influence of some distillation conditions on essential oil composition in aromatics plants: Basic and applied aspects. Martinus Nijhoff Publishers Netherlands", (1982), 229-236.

161- Mladen, M., Josip, M et Ani, R., " Free and Glycosidically Bound Volatile Compounds from Cypress Cones (*Cupressus Sempervirens* L.). *Faculty of Technology, Laboratory of Organic Chemistry, Teslina 10/V 21000 Split, Croatia* ", (1997).

162- Pingot, A., "Les huiles essentielles. Ed: Tec et Doc", Paris(1998), 230-236.

163- Bendriss Houari., "*Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales : « Ruta chalepensis et Marrubium vulgare ».. thèse de Magister en Génie des procédés Option : Génie chimique*", (2002-2003).

164- AFNOR, "Recueil des normes françaises. Huiles essentielles 2ème édition " Paris, (1986).

165- AFNOR, "Corps gras, graines Oléagineuses, produits dérivés. Recueil des Nonnes Françaises. 5 ème Edition", (1993).

166- "Les huiles essentielles", AFNOR, NFT75 – 104 Juin (1994).

167- Cavalli, J.F., " Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar", Thèse de doctorat en chimie Organique et Analytique ; Université de Corse Pascal Paoli. (2002).

168- Loziene, K., Venkutonis, P.R., "Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*- Biochemical Systematics and Ecology", V.33, (2005), 517-525.

169- Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L.M.I., Hamamouchi, M., " Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers": Fr-Journal of Ethnopharmacology, V.89, (2003) ,165-169.

170- Rasooli, I., Abyaneh, M.R., " Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*", Food Control; V.15; (2004), 479-483.

171- Buckle, J., "Clinical Aromatherapy ". 2nd edition. .Copyright , Elsevier Science, (2003), 72-73.

172- Ackman, R.G., "Some old and problems in capillary gas chromatography (in proceeding of the International Conference on oils, fats and Waxes-fats for the future). Duromark Publishing, Auckland", 171-181.

173- Rouessac, F., Rouessac, A., " Analys chimique, Méthods et Techniques Instrumentales 2éme Edition Masson", (1982).

174- Sandra, P., Bicchi, C., "Capillary gas chromatography in essential oil analysis, Huething, New York", (1987), 31-32, 267-274.

175- Tranchant, J., Gardais. J-F., Borin, P.R., Prevot, A., Serpinet, J., Uniz, G., "Manual Pratique de Chromatographie en phase gazeuse 3éme édition", Paris, (1982).

176- "Wikipedia, encyclopédie en ligne".

http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:Soxhlet_extractor.png.

177- Amrani, O., "Valeur nutritive du Chardon marie (*Silybum marianum*).», Mémoire de magistère Agronomie, université de Batna, (2006).

178- Bauer, S.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Thurck, M., « Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. » *American Journal of Pathology*., V.45, (1966), 493-6.

179- Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumou, C., Bougoudogo, F., " « Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au mali. Ed. Mali Médical", T XXI N° 1, (2006), 18-23

180- Fattouch, S., Caboni, P., Coreneo, V., Tuberness, C., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P., "Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia Oblonga miller*) pulp and peel phenolic extracts, *J.Agr.food.chem*", (2006).

181- Dulger, B., et Gonuz, A., "Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences.*, "7 (9) ,(2004), 1559-1562.

182- Mohammedi, Z., "Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen", (2005), 54-55

183- Parekh, J et Chanda, S., "*In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology.*", V .31 (2007),53-58.

- 184- Rota, M. C., Herrera, A., Martinez, R. M., Sotomayor, J. A. et Jordán, M. J., "Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control.*", 19 , (2008), 681-687.
- 185- "Standardisation de l'antibiogramme En médecine humaine à l'échelle Nationale. Selon les recommandations de l'OMS 5ème édition", (2008).
- 186- Chikhoume, A., "Huiles de thym et d'origan". Thèse de magister en agronomie,(2007).
- 187- Sanchez-Moreno, C., "Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International.* ", 8 (2002). 121-137.
- 188- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S and Altundag, S., " Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten.", (2009).
- 189- Panichayupakaranant, P., et Kaewsuwan, S., "Bioassay-guide isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves". Songklanakarin, J., Sci. Technol. 26(1). (2004), 103-107.
- 190- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitao, G.G., Reis, A .S., Santos, T.C., Coube ,C.S et Leitao, S.G., "Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy-tother. Res.*". 15, (2001), 127-130.
- 191- Paris. R. et Moyse. M., " Précis de matière médicale ". Edit. Masson. Paris, (1965), 412.
- 192- Emmami, S., Asilia, J., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B., Hassanzadeh-Khayyat, M., "Chemical and Antimicrobial Studies of *Cupressus sempervirens* L. and *C. horizontalis* Mill. Essential Oils, (2006)" . Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. Spring, (2006): 2(2): 103-108.

193- Emmami, S.A., Asili, J., Mohagheghi, Z et Hassanzadeh, M.K., "Antioxidant Activity of Leaves and Fruits of Iranian Conifers". Université de sciences médicales, Iran, (2007).

194- Kanko, C., Sawaliho, BE., Kone, S., Koukoua, G., N'guessan, YT., " Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*." , Comptes rendus Chimie 7, (2004),1039–1042

195- Ali, O., Med Salem, O., Boukhary., Ahmedou Ould Houmeida., "Travaux pratiques de biochimie structurale, Deuxième Année Biologie-Géologie". Université de Nouakchott, (2007).

196- Carlos Ramón, V., Francisco, C., José Ramón, V., Javier, V., Oscar, R., Elsa, B., "Actividad antimicrobiana del aceite esencial de bellotas de Ciprés (*Cupressus sempervirens* var *horizontalis*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*". Thèse de magister en Biotechnologie. Mexique, (2010).

197- Kassem, FF., Harraz, FM., El-Sebakhy, NA., Depooter, HL., Shawp, NM., Abou Schleib, H., "Composition of the essential oil of Egyptian *Cupressus semipervirens* L". Flav Frag J (1991), 6: 205-7.

198- Chéraif , I., Ben Jannet, H., Hammami, M., Mighri, Z., "Composition chimique de l'huile essentielle des cones du *Cupressus sempervirens* L." , Poussant en Tunisie. Journal de la Société Algérienne de Chimie. J.Soc.Alger.Chim., (2006), 91-98

199- Senatore, F., D'Agostino, M., and Dini, I., "Flavonoid Glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae)" . Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(7), (2000), 2659-2666.

200- Cariel, L et Jean, D., "Proanthocyanidol, Based Composition and its Pharmacological Application". Publication : AT126439T T , (1995).

201- Cavin, A.L., " Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains du genre *Detarium* (Fabaceae-Caesalpinioideae) : *D. microcarpum* Guill. Et Perr. Et des formes comestibles et toxiques de *D. seneegalense* J.F.Gmel." ,Thèse de doctorat. Genève, (2007),277.

202- Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J., wojdylo, A., "Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap". Food chemistry, (2007), 103: 853-859.

203- Service, R.F., "Antibiotics that resist resistance.", Science (1995), 270: 724-727.

204- Mukherjee, PK., Saritha, GS., Suresh, B., "Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India (1995)" ., *Phytother. Res.*(2002). 16: 692-695.

205- Isman, M.B., "Plant essential oils for pest and disease management". *Crop Prot.* (2000), 19: 603-608.

206- Misra, G., Pavlovstathis, S.G., " Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid soil-slurry systems". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*(1997) 7: 572-577.

207- Mutai, C., Vagias, C., Abatis, D., Roussis, V., "Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes- *Journal of Ethnopharmacology*", doi: 10.1016/j.jep.02.007.2009.

208- Valero, M et Salmeron, M.C., "Antifungal activity of different cinnamon extracts. *Journal de Mycologie Médicale*"; Vol.15; (2009), 220-229.

- 209- Faucher, J.L., Avril, J.L., "Bactériologie générale et médicale". Tome1. Ellipses (Ed). Paris,(2002), 214 p.
- 210- Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N.S., Abrini, J., "Thymus essential oils : Chemical composition and in vitro antioxydant and antibacterial activities.", Congr  international de Biochimie, Agadir. (2006).
- 211- Deans, S.G et Ritchie, G., "Antibacterial proprieties of plant essential oils". International Journal of Food Microbiology,(1987), 5,162-180.
- 212- Fleurette, J., Freney, J., Reverdy, M.E., "Antiseptique et désinfection.", ESKA, (1995), 199-221.
- 213- Pibiri, M.C., "Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles". Thèse Doctorat, Lausanne, Canada, ,(2006). 177 p.
- 214- Budavari, S (ed)., "The Merck Index, 12th ed.Whitehouse Station, NJ: Merck & Co Ltd ". (1996).
- 215- Scalbert, A., "Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* ", (1991), 30:3875-3883.
- 216- Elegami, A.A., Elnino, E.I., Eltohami, M.S., Muddathist, K.,. " Antibacterial activity of some species of family Combretaceae ". *Phytotherapy research*, (2002), 16:555-561.
- 217- Hatano, T., Kusuda, M., inada, K., Ogawa,T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T.,. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, (2005), 66:2047-2055.

218- Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumon, C., Bougoudougou, F., "Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali.", *Mali Medical*, (2006), 1 :18-24.

219- Surveswaran, S., Cai, Z.Y., Cark, H., Sun, M., "Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 indian medicinal plants. ", *Food chemistry*, (2007), 102: 938-953.

220- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E and Plmas, F., "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils-Letters in Applied Microbiology "; V.29, (1999), 130-135.

221- Yang, J.K., Choi, M.S., Seo, W.T., Rinker, D.L., Han, S.W., Cheong, G.W., "Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtusa* leaf essential oil". *Fitoterapia*, (2007), 78: 149-152.

222- Demirci, B., Kosar, M., Demirci, F., Dinc, M., Baser, K.H.C., " Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss et Kotschy. *Food Chem.*(2007). 105:1512-151

223- Marino, M., Bersani, C., Comi, G., "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae". *Int.J.Food Microbiol*, (2001),67: 187-195.

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

225- Amakura, Y., Umino, Y., Tsuji, S., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., "Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. ", *Food Chem*, (2002), 77:47–56.

226- Da Silva, J.M.R., Darmon, N., Fernandez, Y., Mitjavila, S., "Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. ", *J Agric Food Chem*, (1991), 39:1549–52.

227- Pére ,M.B., Calderón, N. L. et Croci, C. A., "Radiation–induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary (*Rosmarinus officinalis L*).", *Food chemistry.*, (2007), 104 :585-592.

228- Molyneux, P., "The use of the stable free radical diphenuylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity ". *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2), 211-219.

229- Parakash, D., Upadhyay, G ., Brahma, N., Singh, H.B., " Singh antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*) ". *Food Chemistry*, (2007), 104:783-790.

230- Ruberto, G., et Baratta, M. T., "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems ". *Food Chemistry*, 69, (2000), 167–174.

231-Jukié, M et Miloš, M., "Catalytic Oxidation and properties of thyme essential oils (*Thymus vulgarae L.*) ". *Croatia Chemica Acta.* 78 (1), (2005), 105-110.

232- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traré, A., Coulibaly, K., Maïga, A. (2004). "Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* lam.(Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali." , *C.R.Chimie*,7 :1073-1080.

233- De Bruyne, T., Pieters., Deelstra, H., Vlietink., "A Condensed vegetable tannins :Biodiversity and biological activities." , *Biochemical Systematics and Ecology*,(1999).27 :445- 459.

234- Harborne, J.B., "The flavonoids advances in Research." , Chapman and Hall, London,(1993). 460-463.

235- Kassem, F. F., Harraz, F. M., El-Sebakhy, N. A., De Pooter, H. L., Schamp, N.M., Abu-Shleib, H., "Composition of the essential oil of Egyptian *Cupressus sempervirens* L. cones." , *Flavour Fragmentation Journal* 6, (1991): 205-207.

236- Ibrahim, N.A., El-Seedi, H.R., et Mohammed, M.M., "Phytochemical investigation and hepatoprotective activity of *Cupressus sempervirens* L. leaves growing in Egypt." , *Nat Prod Res* 21, (2007), 857p.

237- Rizk, M.Z., M.S., Abdallah, H.M., Sharara, S.A., Ali, N.A., Ibrahim and M.M. Moustafa., "Efficiency of *Cupressus sempiverens* L. and *Juniperus phoenicea* against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats". *Trends Med. Res.*, (2007), 2: 83-94.

RESUME

Cupressus sempervirens L. est une plante médicinale qui se caractérise par la présence des fruits sous forme des cônes. Ces cônes sont des organes très utilisés en phytothérapie pour ses richesses en plusieurs substances bio-actives. Nous nous sommes intéressés au cours de ce travail aux cônes de la variété *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*, qui pousse dans la station expérimentale de l'université de Blida (Algérie). Nous avons déterminé que les sites sécréteurs de ces cônes sont des canaux sécréteurs. Nous avons également étudié leurs compositions chimiques. L'hydrodistillation est utilisée pour l'extraction des constituants volatils des cônes avec un rendement de 0.4%. La CPG/SM appuyée par le calcul des indices de Kovats (IK) ont permis l'identification de quarante-six (46) composés dont onze (11) sont majoritaires parmi lesquels : L' α -pinène (30.5%), le Δ -3-carène (15.9%), l' α -terpinolène (6.63%), β -phellandrène (5.92%). La comparaison de cette composition chimique à celles d'origines mexicaine, iranienne, Croate, égyptienne, et tunisienne a montré parfois des différences remarquables. L'extraction de la fraction non volatile a été déterminée par soxhlet qui a donné un extrait méthanolique avec un rendement de 16.43%. Un screening phytochimique de la plante a montré la présence des flavonoïdes, des saponines et des tanins en abondances.

La présente étude a également pour but d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante des deux extraits de la plante. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique possèdent un pouvoir antimicrobien variable selon les espèces avec une plus forte zone d'inhibition de 20mm exercée par l'huile essentielle sur *S.aureus* et l'extrait méthanolique sur *P.aeruginosa* qui reste une valeur d'inhibition modérée. Alors qu'aucune activité n'a été signalée sur *E.coli*, *K.pneumonie* et la levure *C.albicans*.

Les extraits méthanoliques ont présenté de fortes propriétés de piéger les molécules du radical libre DPPH. D'ailleurs son pouvoir antioxydant avec un

IC₅₀=0.0075mg/ml est proche de celle du standard α -tocophérol (IC₅₀=0.006mg/ml). Nous avons conclu aussi que l'huile essentielle possède la capacité antioxydante, mais elle est très faible en comparaison avec l'extrait méthanolique.

ABSTRAT

Cupressus sempervirens L. is a medicinal plant which is characterized by the presence of the fruits in the form of the cones. These cones are organs widely used in phytotherapy for its riches of several bio-active substances. In this work, we were interested in the cones of the *Cupressus sempervirens var horizontalis* variety. This variety grows in the experimental station of the University of Blida (Algeria). We determined that the secretory sites of these cones are secretory canals. We also studied their chemical compositions. The hydrodistillation is used for the extraction of the cones volatile components with a productivity of 0.4%. The GC/MS supported by the calculation of Kovats indices (KI) allowed the identification of forty-six (46) compounds with eleven (11) represent the majority of which: The α -pinene (30.5%), the Δ -3-carene (15.9%), α -terpinolene (6.63%), β -phellandrene (5.92%). The comparison of this chemical composition with those of the same oil from Mexico, Iran, Croatia, Egypt, and Tunisia showed remarkable differences. The extraction of the nonvolatile fraction was determined by soxhlet which gave a methanolic extract with a productivity of 16.43%. A phytochemical screening of the plant showed the presence of flavonoïdes, saponins and tanins in abundances.

The purpose of the present study is also to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the two extracts of the plant. The essential oil and methanolic extract have a variable antimicrobial ability according to species' with a stronger inhibition zone of 20mm exerted by essential oil on *S.aureus* and the methanolic extract on *P.aeruginosa* which remains a moderate inhibition value. While no activity was reported on *E. Coli*, *K.pneumonie*, and *C. albicans* yeast.

The methanol extract presented strong properties to scavenge the molecules of free radical DPPH. Moreover its antioxidant ability with $IC_{50}=0.0075\text{mg/ml}$ is close to that of the α -tocopherol standard ($IC_{50}=0.006\text{mg/ml}$). We also concluded that essential oil has the antioxidant capacity but it is very low in comparison to the methanolic extract.

ملخص

Cupressus sempervirens.L هي نبات طبي يتميز باحتوائه على ثمار على شكل صنوبر. هذه الثمار تستخدم على نطاق واسع في طب الأعشاب بسبب احتوائها على عدد مرتفع من المواد البيولوجية النشطة. نحن مهتمون في هذا العمل لثمار فصيلة *Cupressus sempervirens var horizontalis* التي تنمو في المحطة التجريبية في جامعة البليدة (الجزائر). لقد بينا ان مواقع الإفراز هي عبارة عن قنوات إفرازية. وقد قمنا بدراسة التركيب الكيميائي لهذه الثمار. تستخدم طريقة التقطير بالبخار لاستخراج المكونات المتطايرة من الثمار مع تحقيق مردود بنسبة 0.4 %. وقد سمحت تحاليل المدعومة بحساب مؤشرات كوفاتش IK بتحديد ستة وأربعين مركبا (46) من بينهم 11 مركبا يمثل الغالبية منها ألفا بينان (30.5%) ، دالتا-3-كاران (15.9%)، الفا تاربيبولان (6.63%)، β - فيلاندرين (5.92%)، ومقارنة هذا التركيب الكيميائي مع تلك التي لها أصول مكسيكية، إيرانية، كرواتية، مصرية، وتونسية.

قد تم استخراج الجزء غير المتطاير بواسطة soxhlet الذي أعطى مستخلص الميثانول مع مردود قدره 16.43 %. و قد اظهر الفحص الكيميائي للنبتة وجود الفلافونويد، الصابونين، والتانا بوفرة. هذه الدراسة قيمت النشاطات المضادة للأكسدة والمضادة للجراثيم للمستخلصين من هذه النبتة. الزيت الأساسي وكذلك مستخلص الميثانول يمتلكون فاعلية مضادات للميكروبات التي تختلف باختلاف الأنواع مع وجود اعلي درجه للتثبيط بقدر 20 مم التي يبذلها الزيت الأساسي ضد بكتريا *S.aureus* و مستخلص الميثانول ضد بكتريا *P.aeruginosa* مع أنها تبقى قيمه متوسطه للتثبيط. في حين لم يبلغ أي نشاط على *E.coli* و *K.pneumonie* والخميرة *C. albicans*

وأظهر مستخلص الميثانول قدرته الكبيرة في مسح الجذور الحرة للجزيئات DPPH. في الواقع قدرتها المضادة للأكسدة بقيمة $IC_{50}=0.0075\text{مغ/مل}$ هي قريبا جدا من ألفا-توكوفيرول التي تساوي $IC_{50}=0.006\text{مغ/مل}$. استنتجنا أيضا أن الزيت الأساسي لديه القدرة المضادة للأكسدة ولكنها جد منخفضة مقارنة بمستخلص الميثانول.

REMERCIEMENTS

*A*vant toutes choses, Je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné le savoir et la faculté de pouvoir réaliser ce travail.

*J*e tiens particulièrement à remercier mon Promoteur Mr. HAMAIDIM , Maitre de conférences à L'USD, pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il avait consentis durant la rédaction de ce mémoire.

*J*e tiens à remercier aussi, M^{me}. HAMAIDI.F. ma Co- promotrice, Maitre de conférences, à L'USD, pour ses conseils, ses discussions enrichissantes, ses orientations et ses encouragements.

*U*n remerciement chaleureux à M^{me} SAIDI.F, Professeur et responsable de la post graduation (biotechnologies végétales) à l'USD, pour l'honneur qu'elle ma fait en président mon jury. Je ne saurais jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien sans faille et sa sympathie.

*J*e exprime ma reconnaissance à Mr. MEGATLI. Maitre de Conférence à L'USD d'avoir honoré ce travail en acceptant de l'examiner.

*J*e remercie M^{me} BOUCHENAF. Maitre de conférence à l'institut de Chimie industrielle, d'avoir honoré ce travail en acceptant de l'examiner.

A Mme BENOUAKLIL Ingénieur de laboratoire de Post-Graduation de Biologie végétale et Mme BRAHIM ELRAHMANI Ingénieur de laboratoire de Biochimie. J'exprime ma profonde gratitude pour leur disponibilité, leurs encouragements, et leur aide pour le bon déroulement de mon travail. Je les remercie du fond du cœur.

J' adresse également mes sincères remerciements à Mr. Yousef, le gardien de la station expérimentale de l'institut d'Agronomie pour son aide lors de la cueillette de la plante.

Je tiens tout particulièrement à remercier M^{me} Sababo. K. Microbiologiste à l'hôpital de Boufarik pour ses nombreuses explications sur les protocoles des tests microbiologiques et aux autres laborantines pour la bonne humeur régnant au sein du laboratoire.

Mes remerciements sont adressés également à ceux qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long de la période de recherche.

J' exprime ma reconnaissance à tous les Enseignants et Etudiants en Post-Graduation de Biologie de l'université de Blida pour leur encouragement et leur amitié, et à tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans mon travail.

DEDICACE

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes *chers parents* qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

A mon mari Farid qui m'a soutenu dans la réalisation de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mon profond remerciement.

A mon *grand père* et mes *grande-mères* qui m'ont toujours aimé et comblé par ses bénédictions.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

-Mes très chers frères *Abdel Karim*, et *Abdel Aziz*

-Mes très chères sœurs *Rafika*, *Samira*, *Hanane*, et *Aicha*

-Mes chers neveux et nièces *Abdel basset*, *Mohammed*, *Sérine*, *Lina*, *Nour* et

Chaymae -Mes chers *Ancles*, *Tantes*, *Cousins* et *Cousines*

-Ainsi que pour tous mes *Amis* et mes *Collègues*.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
ABSTRACT	2
ملخص	3
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	6
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	11
INTRODUCTION	17
1. BIBLIOGRAPHIE	20
1.1. Généralités sur la plante étudiée	20
1.1.1. Description botanique	20
1.1. 2. Taxonomie	24
1. 1.3. Origine et répartition géographique	26
1.1.4. Dénomination vernaculaire	27
1. 1.5. Données écologiques	28
1. 1.6. Données phytochimiques	28
1.1.7. Médecine traditionnelle (propriétés thérapeutiques)	29
1.1.8. Travaux antérieurs	30

1.2. Les substances actives :	32
1.2.1. Les huiles essentielles	32
1.2.1.1. L'Aromathérapie	32
1.2.1.2. Définition des huiles essentielles	32
1.2.1.3. Localisation des huiles essentielles	33
1.2.1.4. Extraction des huiles essentielles	33
1.2.1.5. Composition chimique	34
1.2.1.6. Toxicité des huiles essentielles	35
1.2.2. Les composés phénoliques	36
1.2.2.1. Généralités sur les composés phénoliques	36
1.2.2.1. Les principales classes des composés phénoliques	36
1.2.2.2 Intérêt biologique de quelques composés phénoliques	40
1.3. Etudes biologiques	42
1.3.1. L'Aromatogramme	42
1.3.1.1. Définition de l'aromatogramme et le mode d'application	42
1.3.1.2. Mode d'action contre les bactéries	42
1.3.2. Le stress oxydant, oxydants et antioxydants	43
1.3.2.1. Définition du stress oxydant	43
1.3.2 .2. Origine du stress	43
1.3.2.3. Définition d'un radical libre	43
1.3.2.4. Origine d'un radical libre	44
1.3.2.5. Conséquences du stress oxydant	45
1.3.6. Les antioxydants	46
1.3.6.1. Définition des antioxydants	46
1.3.6.2. Les principales sources d'antioxydants	46
2. EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES	50
2.1. Matériel végétal	50
2.2. Description botanique de la plante étudiée	50
2.2.1 Etude morphologique	50
2.2.2. Etudes histologiques et localisation des sites sécréteurs	50
2.3. Détermination de la teneur en matière sèche	51
2.4. Détermination de la teneur en cendres	51

2.5. Etudes des principes actifs	52
2.5.1. Réactions de caractérisation de la plante	52
2.5.1.1. Les solutions à analyser	53
2.5.1.2. Les réactions de caractérisation	53
2.5.2. Etudes des composés volatiles	54
2.5.2.1. Extraction par hydrodistillation	54
2.5.2.1.1. Principe	54
2.5.2.1.2. Procédé classique d'extraction	55
2.5.2.1.3. Conditions opératoires	56
2.5.2.2. Rendement de l'extraction	56
2.5.2.3. Caractérisation de l'huile essentielle	57
2.5.2.3.1. Caractéristiques organoleptiques	57
2.5.2.3.2. Caractéristiques physico-chimiques	57
2.5.2.4. Analyse qualitative et semi quantitative de l'huile essentielle par CG/MS	61
2.5.2.4.1. But	61
2.5.2.4.1. Principe	62
2.5.2.4.2. Conditions opératoires	62
2.5.2.4.3. L'identification et détermination quantitative des composants	63
2.5.2.5. Identifications des constituants en CG/MS par le calcul des indices de Kovats	64
2.5.3. Etudes des composés non volatiles polaires	65
2.5.3.1. Principe	66
2.5.3.2. Conditions opératoires de l'extraction au soxhlet	67
2.5.3.3. Rendement de l'extraction	67
2.6. Etude biologique de <i>Cupressus sempervirens var horizontalis</i>	68
2.6.1. Activité antimicrobienne de <i>Cupressus sempervirens var horizontalis</i>	68
2.6.1.1. Principe	68
2.6.1.2. Protocole expérimental	69
2.7. Activité antioxydante	73
2.7.1. Principe	73
2.7.2. Mode opératoire	74

3. RESULTATS ET DISCUSSION	77
3.1. Description botanique	77
3.1.1. Etude morphologique	77
3.1.2. Etudes histologiques et localisation des sites sécréteurs	82
3.2. Détermination de la teneur en matière sèche	91
3-3-détermination de la teneur en cendres	92
3.4-Etudes des principes actifs	92
3.4.1-Réactions de caractérisation de la plante	92
3.4.2-Etudes des composés volatiles	94
3.4.2.1-Rendement de l'extraction	94
3.4.2.2. Caractérisation de l'huile essentielle	94
3.4.2.3. Analyse de l'huile essentielle par CG/MS	96
3.4.3. Etude des composés non volatiles	102
3.4.3.1. Rendement de l'extraction de la fraction non volatile	102
3.5. Activité biologique	103
3.5.1.Activité antimicrobienne	103
3.5.2.Activitéantioxydante	110
CONCLUSION	117
APPENDICE	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

LISTE DES ILLUSTRATION, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Aspect général des deux variétés de <i>cupressus sempervirens</i> L (original).	21
Figure 1.2	Feuilles de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original).	22
Figure1.3	Organes reproducteurs de <i>cupressus sempervirens</i> L. var <i>horizontalis</i> (original).	22
Figure 1.4	Différentes classes des composés phénoliques.	39
Figure 1.5	Origine des radicaux libres dans la cellule (d'après Machlin & Bendich, 1987).	45
Figure 2.1	Appareillage d'hydrodistillation de type Clevenger.	55
Figure 2.2	Détermination de l'indice de Kovats à partir d'un chromatogramme 65 quelconque.	65
Figure 2.3	Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.	66
Figure 2.4	Schéma du Test de l'activité anti microbienne.	69
Figure 2.5	Réaction de réduction du DPPH.	73
Figure 3.1	A) <i>Cupressus sepervirens</i> var <i>horizontalis</i> ; B) <i>Cupresssus sempervirens</i> var <i>pyramidalis</i> (original).	77

Figure 3.2	Vue d'ensemble dun feuillage dense de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original) .	78
Figure 3.3	Différents types de rameaux de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original).	78
Figure 3.4	A) et B) Feuilles de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> observées sous loupe (originals).	79
Figure 3.5	Organes reproducteurs de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original).	79
Figure 3.6	Cônes mâles groupés en inflorescence (original).	80
Figure 3.7	A) Cône mâle de <i>cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> B) Coupe longitudinale au niveau du cône mâle, observés sous loupe (originals).	80
Figure 3.8	Cône femelle de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> sous loupe (original) .	81
Figure 3.9	Constituants du fruit charnue de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> sous loupe (original).	81
Figure 3.10	Fruits de <i>cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> à différentes tailles (original).	82
Figure 3.11	Les graines à partir des fruits mures ligneux de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original).	82
Figure 3.12	Coupe transversale au niveau du fruit de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (état vital) (original)	83

Figure 3.13	A) Coupe longitudinale au niveau d'une canal excréteur au niveau du fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> sous MP×100(original).	83
Figure 3.14	A) Deux écailles observée sous loupe ; B) la structure reliant entre ces écailles observée au MP ×40 et C) Ecailles séparées et observées sous MP×100(original).	84
Figure 3.15	Coupe transversale au niveau d'un cône femelle avec double coloration MP×40(original).	85
Figure 3.16	A) Epiderme du cône femelle ;B) Structure d'une stomate au MP×400 avec double coloration (original).	86
Figure 3.17	Canal excréteur observé au MP×40 (original).	86
Figure 3.18	A) Tissu conducteur au niveau du coupe transversale d'un cône femelle MP×100; B) Fibres de sclérenchymes au MP×400 (originals).	86
Figure 3.19	Fibres de sclérenchymes au niveau d'une coupe transversale d'un cône femelle au MP×100 avec double coloration (original).	87
Figure 3.20	Coupe transversale d'une feuille de <i>cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> au MP×40 avec double coloration (original).	88
Figure 3.21	Coupe transversale d'une tige de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> au MP×40 avec double coloration (original)	89
Figure 3.22	Structure du canal excréteur au MP×400 avec double coloration (original).	89

Figure 3.23	A) Coupes transversales au niveau des tissus conducteurs au MP×100 ; B) Le bois au MP×400; C) Le Liber au MP×400 (avec double coloration) (original).	90
Figure 3.24	Bois en coupes longitudinales des tiges de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> dont A) observé au MP× 100 et B) observé au MP× 400(original).	90
Figure 2.25	Teneur en eau et en matière sèche des fruits frais de <i>cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	91
Figure 2.26	Réactions de caractérisation de la poudre des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	93
Figure 3.27	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	96
Figure 3.28	Teneur des cônes femelles de <i>Cupressus sempervirens</i> .L. var <i>horizontalis</i> en substances polaires et apolaires.	102
Figure 3.29	(A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique testés sur <i>Bacillus subtilis</i> .	106
Figure 3.30	(A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique ; (B) testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	107
Figure 3.31	(A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur <i>Bacillus cereus</i> .	107
Figure 3.32	: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique ; testés sur <i>Staphylococcus aeruginosa</i> .	107

Figure 3.33	Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> vis-à-vis du radical libre DPPH.	112
Figure 3.34	Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> vis-à-vis du radical libre DPPH .	112
Figure 3.35	Pourcentages de l'activité antiradicalaire de satandard α -tocophérol des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> vis-à-vis du radical libre DPPH.	113
Tableau 1.1	Quelques activités biologiques des polyphénols.	40
Tableau 2.1	Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.	70
Tableau 2.2	Concentrations des solutions à tester dans le test antioxydant.	74
Tableau 3.1	Résultats des pesées de <i>Cupressus sempervirens</i> L. var <i>horizontalis</i> après dessiccation pendant 96h.	91
Tableau 3.2	Teneur en cendres totales de la poudre des fruits de cyprès <i>horizontalis</i> .	92
Tableau 3.3	Résultats des réactions en tubes sur la poudre des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	93
Tableau 3.4	Caractères organoleptiques de l'huile essentielle des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	94
Tableau 3.5	Les indices physicochimiques de l'huile essentielle étudiée.	95

Tableau 3.6	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i>	97
Tableau 3.7	Composés majoritaires, proportions et familles.	99
Tableau 3.8	Principaux constituants de l'huile essentielle des cônes femelles de <i>Cupressus sempervirens</i> . L selon l'origine.	101
Tableau 3.9	Résultats de l'antibiogramme (Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne en mm).	104
Tableau 3.10	Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).	105
Tableau 3.11	Pourcentages de l'activité antiradicalaire moyenne de l'huile essentielle (A) et l'extrait méthanolique (B) des cônes femelles et du standard α -tocophérol (C) vis-à-vis du radical libre DPPH.	111
Tableau 3.12	Activité antiradicalaire des extraits des cônes femelles de <i>sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> et du standard.	114

INTRODUCTION

Ces dix dernières années le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité, non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé [1].

Dans ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressaient aux composés des plantes qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les molécules issues des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments; sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel [2]. Actuellement l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plante en tant que soins de santé primaire [2].

Par conséquent les industries pharmaceutiques s'intéressent de plus en plus à la diversité des molécules biologiques des végétaux dans le but d'avoir de nouveaux composés pourvus de propriétés inédites.

Vue cette richesse du monde végétal, notre travail porte sur une plante médicinale dénommée *Cupressus sempervirens* L. C'est une espèce caractéristique en région méditerranéenne(3). Elle se présente sous deux formes d'aspect différent, qui correspondent à deux variétés : la forme pyramidalis : à branches dressées ; c'est le *Cupressus sempervirens* var *pyramidalis*, et la forme horizontalis : à branches étalées ; c'est le *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* ; la variété étudiée dans ce mémoire [3, 4, 5].

Les feuilles et les cônes de *Cupressus sempervirens* L. jouent un rôle important dans la médecine traditionnelle dans laquelle, ils sont utilisés comme des anti-septiques, des anti-rhumatismales, anti-hémorroïdaires, anti-diarrhéiques, des agents vasoconstricteurs, pour la toux, les rhumes, les infections parasitaires, l'inflammation et tonique pour les cheveux aussi forte. Ils sont utilisés pour le traitement des troubles gastro-intestinaux (diarrhée) et contre les dermatoses. Les fruits de la plante sont utilisés traditionnellement pour guérir le diabète [6]. L'action pharmacologique de *Cupressus* a été étudiée par Madar et al. (1995), qui ont rapporté que les terpénoïdes de cette plante présente une activité antifongique [7]. En Albanie, un extrait hydro-alcoolique des cônes de *Cupressus sempervirens* L. est utilisé pour traiter une variété de troubles, y compris l'hyperlipidémie chez des rats Wistar [8]. Cette plante a une huile essentielle très abondante avec un monoterpène typique et est considéré comme un capteur de radicaux avec des effets d'inhibition de la peroxydation lipidique [9].

Le choix de la plante basé d'une part sur l'importance de leurs fruits, qui sont riches en métabolites secondaires (tanins, en essence à leucoanthocyanes et catéchols, et en terpènes), et d'autre part sur leurs usages traditionnels connus. Cependant, quelques études phytochimiques et biologiques sur *Cupressus sempervirens* L. dans l'Algérie ont été signalées, au contraire dans d'autres parties du monde.

La présente étude a porté sur la recherche de constituants chimiques et sur l'évaluation in vitro des activités biologiques de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique, préparés à partir des fruits de *Cupressus sempervirens* L. var *horizontalis*. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Description botanique de la plante récoltée,
- Extractions des principes actifs ; l'huile essentielle par hydrodistillation, et composés phénoliques par soxhlet,
- Faire un screening chimique des extraits (tests en tube, CGMS,...),

- Faire un screening biologique (activité antiradicalaire, activité antimicrobienne) des extraits des fruits de *Cupressus sempervirens* L.var *horizontalis* (huile essentielle et extrait méthanolique).

CHAPITRE 1

BIBLIOGRAPHIE

1.1. Généralités sur la plante étudiée

1.1.1. Description botanique

Le cyprès méditerranéen ou en commun (*Cupressus sempervirens* L.) [10] est un grand arbre toujours vert avec un tronc bien développé, il mesure habituellement de 15 à 20 m de haut, mais peut atteindre 30 à 40 m [11]. Il croit rapidement jusqu'à l'âge de 20 ans et peut vivre jusqu'à l'âge de 500 ans [11].

C'est un arbre très ramifié [12], les rameaux sont généralement courts, quadrangulaires, fins ($\theta=1$), vert grisâtre et qui tombent après quelques années [13].

Il offre deux ports très distincts selon la variété, bien qu'ils soient généralement considérés comme deux cultivars d'une même espèce [14] (Figure 1.1) :

- Pyramidal, en fuseau, dans la variété *pyramidalis*, dont les branches sont dressées et proche du tronc.
- A cime légère, étalée, pour la variété *horizontalis*, dont sa forme peut rappeler celle du cèdre [13], qui étend ses branches de tous cotés [15] avec des grands angles entre les branches et le tronc [16].

L'espèce *Cupressus sempervirens*.L se caractérise par une écorce grise brune et lisse et se fissure verticalement avec l'âge. Le bois quand à lui, de forte densité et quasiment imputrescible ; il contient une essence appréciée pour son usage en

menuiserie [14]. Il possède également la propriété d'éloigner les insectes par son odeur [17].

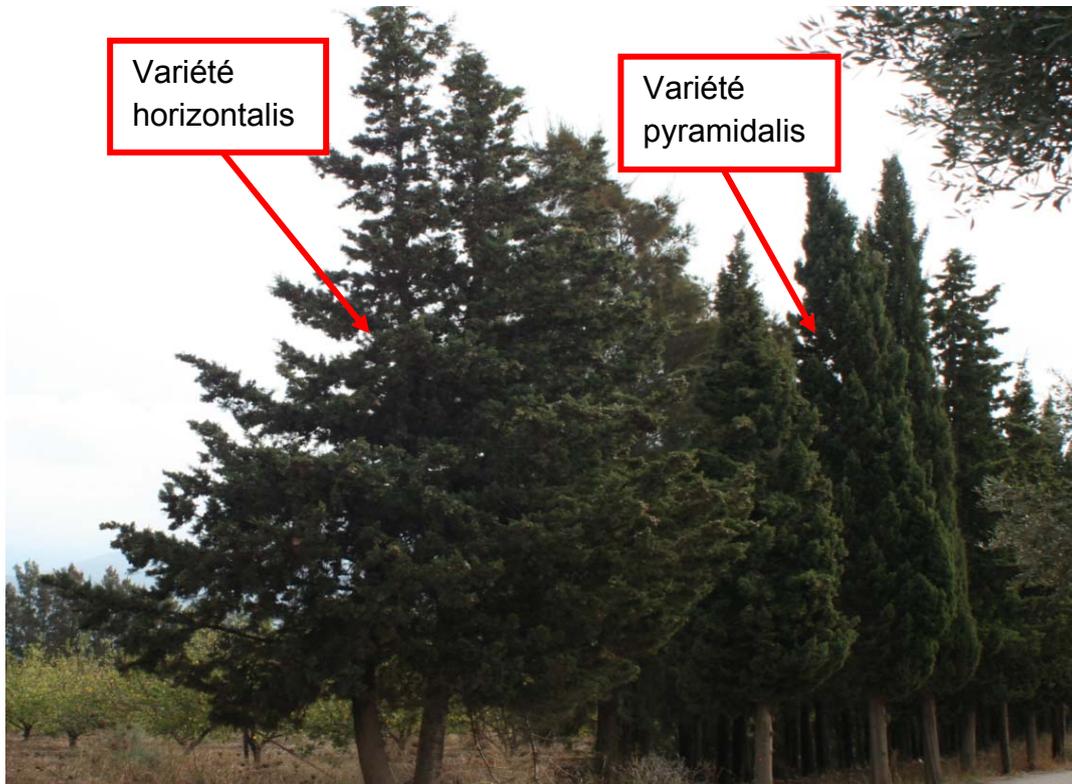


Figure1.1 : Aspect général de deux variétés de *cupressus sempervirens* L (original)

Les feuilles sont persistantes, squamiformes, opposées, réduites à des petites écailles, étroitement imbriquées sur 4 rangs [11, 18, 19, 20]. Elles se chevauchent comme les tuiles d'un toit, recouvrant entièrement les rameaux et lui donnant une teinte d'un vert foncé [21, 22, 23]. Elles ne dégagent qu'une odeur très faible, même froissées [21] (Figure1.2).



Figure 1.2: Feuilles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* (original).

Le Système racinaire est très développé, profond et étendu [23], avec des racines secondaires horizontales et superficielles qui ancrent l'arbre dans le sol, alors que la racine principale avorte tôt [4,23].

Les fleurs : au printemps, sur les jeunes rameaux apparaissent les organes reproducteurs mâles et femelles [24]. Ces derniers sont portés par des cônes. Cette espèce est dite monoïque [18,19] puisque les organes reproducteurs mâles et femelles sont présents sur le même pied [22] (Figure1.3).



Figure 1.3: les organes reproducteurs de *Cupressus sempervirens var horizontalis* (original).

- **Les organes reproducteurs mâles** sont groupés en chatons terminaux, produits en abondance [24], ils constituent de petits cônes agglomérés en épis denses. Chacun comporte un axe simple autour duquel sont disposées suivant une spirale très serrées de nombreuses étamines écailleuses, imbriquées de 8 à 10 paires d'écailles jaunâtres [18].

Chaque étamine à maturité s'ouvre, laissant échapper les grains de pollen murs et flétrissent peu de temps après.

- **Les organes reproducteurs femelles** sont réunis en inflorescence globuleuses ou ovoïdes regroupent 6 à 12 fleurs ou écailles, en donnant naissance à des petits cônes fructifères [25].

Les cônes femelles constituent le fruit du cyprès vert [26]. Ils présentent des grosses bosselures, sont glabres [27], globuleux, un peu luisant, passent du vert brillant à brun en murissant [28]. Ils atteignent une longueur de 4 cm mais généralement cette longueur varie entre 2 et 3 cm [29]. Les écailles sont anguleuses, excentriquement peltées, mucronées vers le centre [30.31].

Ces écailles s'insèrent autour d'un axe central et chaque écaille est accompagnée d'une bractée qui est souvent visible au printemps, mais qui peut être masquée par les écailles, dont la taille augmente, au cours de la maturation du cône [32]. Les écailles sont dites ovulifères, chacune d'elles porte à leur base 6 à 20 ovules qui deviennent des graines [20,24]. Ils sont charnues [27] et soudées [9] avant leur maturation mais deviennent ligneuses en murissant puis s'écartent l'une de l'autre à la maturité [33].

Dans la variété *horizontalis* les cônes femelles sont plus nombreux et souvent agglomérés que dans la variété *pyramidalis* [30].

Les graines : l'ovule fécondé se transforme en graine [32]. Les cônes libèrent de très petites graines (8 à 20 par écaille), ces dernières sont brunes claires [3,18,23], anguleuses, munies latéralement de 2 ailes membraneuses [28]. Ces ailes

proviennent de l'élimination de la partie supérieure de l'écaille, qui facilitent sa dispersion [22].

Pollinisation et fécondation : les grains de pollen sont dispersés par le vent : pollinisation anémophile; ils atteignent les cônes femelles, s'insinuent dans les interstices des écailles, arrivent en contact des ovules où ils sont retenus par une substance mucilagineuse excrétée par le sommet de l'ovule puis germent [34]. Il s'écoule plusieurs mois entre la pollinisation et la fécondation [34].

Maturation et cueillette

Le fruit atteint à peu près le terme de son volume au cours de la même année, mais il ne mûrit que l'année suivante [3, 11, 35].

Les cônes sont recueillis entre la fin de l'été et le début de l'automne, lorsqu'on observe les changements de couleur de vert brillant à brun foncé [36].

1.1.2. Taxonomie

Les arbres vivants appartiennent à deux grands groupes systématiques, les gymnospermes et les angiospermes.

Les gymnospermes (du Grec gymnos= nu) sont des plantes à fleurs dont les graines sont dites nues parce qu'elles ne sont jamais protégées par un ovaire clos. C'est pour cette raison que les gymnospermes n'ont pas des fruits car s'est la paroi de l'ovaire qui, chez les angiospermes se transforme en fruit renfermant les graines.

On appelle « conifères », les gymnospermes (vivantes ou fossiles) dont l'inflorescence femelle prend à maturité l'aspect d'un cône [37].

Les conifères appelés également résineux sont les représentants actuels des gymnospermes. Ils forment l'ordre des coniférales ou pinales, divisées classiquement en six familles : les Araucariaceae (Araucarias, Agathis), les Cephalataxaceae (cephalotaxus), les Cupresaceae (Cyprès, Thuyas, Genévrier), les pinaceae (Mélézes, Sapin, Pin, Cédres, épicéas), les Podocarpaceae (Podcarpus) et les Taxodiaceae (Séquoias) [38].

Le genre cupressus qui a donné son nom à la tribu des cupressaceae [39], est constitué de 25 taxons répartis dans la zone tempérée chaude de l'hémisphère nord [11].

Des trois espèces méditerranéennes, le cyprès vert (*Cupressus sempervirens L.*) également nommé cyprès de Provence ou de Florence est le plus répandu. Les deux autres cyprès méditerranéens sont originaires d'Afrique du nord. Le cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen) est endémique du Haut Atlas occidentale du Maroc où il constitue des peuplements assez dégradés et parfois réduits à quelques arbres. Enfin, le cyprès de Duprez (*Cupressus dupreziana A.Camus*) se rencontre naturellement dans le désert du Tassili N'Ajjer (Algérie) et représente une des espèces les plus menacées du monde [40].

Le cyprès vert a été connu pour exister depuis les plus anciens temps sous deux formes qui correspondent à deux variétés [5,41] :

- Cyprès pyramidal (*Cupressus sempervirens L. var fastigiata = var pyramidalis*).
- Cyprès horizontalis (*Cupressus sempervirens L. var horizontalis*).

Les deux formes peuvent s'hybrider naturellement et produire des descendances présentant une forme de couronne qui varie entre les premiers et les seconds [16].

Selon la classification de Linnaeus et Farjon [42,43,44], le cyprès horizontalis appartient au :

Domaine : Eukaryota

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Pinophytina

Division : Coniferophyta

Classe : Pinopsida / Coniferopsida

Ordre : Pinales

Famille : Cupressaceae

Subfamille : Cupressoideae

Genres : Cupressus

Espèce : *Cupressus sempervirens* L.

Variété : *Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Mill) Gordon.

1.1.3. Origine et répartition géographique

Le genre *Cupressus* se rencontre en zone tempérée chaude de l'hémisphère nord [45,46]. Le cyprès méditerranéen (C.S.L) semble appartenir de tous temps au paysage méditerranéen, avec ses formes horizontales et fastigiées [47]. Il s'agit donc d'une introduction très ancienne réalisée au fil de nombreuses années et parfaitement réussie [5].

Il est originaire d'Iran, la Syrie, la Turquie, Chypre et de plusieurs îles grecques (Crète, Samos, Rhodes). Cette espèce a été introduite dans la plupart des pays méditerranéens, probablement au cours du Tertiaire où elle occupait les grandes surfaces qui se sont réduites au cours des millénaires principalement par l'homme [48,49,50].

En Algérie, cette espèce est utilisée surtout comme brise -vent dans les régions de vents violents.

Pendant la période coloniale, dans la plaine de Mitidja à Blida (25 Km de l'ouest d'Alger) et celle de Mohammedia (à 65 Km au sud de l'Oran), où ont été plantés de vastes champs d'agrumes, les colons français ont utilisé cette espèce massivement afin de border et délimiter ces champs servant comme abris et pour créer également un microclimat favorable à la culture des agrumes.

Dans les zones montagneuses, cette espèce est rarement utilisée dans les travaux de conservation des sols à risque d'érosion hydrique et éolienne. Ainsi on le trouve partout dans les cimetières musulmans, chrétiens et juifs [51]. Il n'existe pas une station naturelle en Algérie [23].

1.1.4. Dénomination vernaculaire

Le *Cupressus sempervirens var horizontalis* est parfois appelée communément : cyprès commun, cyprès d'Italie, cyprès de Montpellier, cyprès de Provence, cyprès toujours vert, cyprès méditerranéen, cyprès horizontal ou cyprès mâle [12,39,52].

Nom arabe : sarou a'adi (سرو عادي) [53].

A travers son histoire, son nom a été modifié et à travers différentes époques on la retrouve sous différentes appellations [44]:

- *Cupressus horizontalis* Mill. 1768;
- *Cupressus sempervirens L. var. horizontalis* (Mill.) Loudon 1830;
- *Cupressus sempervirens L. f. horizontalis* (Mill.) Voss 1907;
- *Cupressus sempervirens L. subsp. horizontalis* (Mill.) A. Camus 1914;
- *Cupressus patula* Spadoni 1826;
- *Cupressus horizontalis* Mill. var. *pendula* hort. ex Endl. 1847;
- *Cupressus sempervirens L. var. numidica* Trab. 1913.

Selon la mythologie, dédiée au jeune Grec-Cuparissos, transformé par Apollon en cyprès; du latin **sempervirens** : toujours vert (d'où son nom repris par Linnée) [18].

1.1.5. Données écologiques

Le cyprès est une essence xérophile, car c'est un arbre robuste susceptible de s'adapter à des conditions physiques très sévères, mais il peut être plastique, c'est-à-dire qui peut se développer dans des climats humides [12]. Vue cette résistance à la sécheresse il est utilisé pour le reboisement des terrains secs [4].

En effet, le cyprès est un arbre sans exigences pluviométriques et peut se contenter de 250 à 350mm / an [12]. Du point de vue thermique, il est sensible aux fortes gelées, résiste bien à la sécheresse, moyennement exigeant la lumière [13].

Il est peu exigeant quand à la nature du sol : il tolère aussi bien des sols calcaires et acides s'ils sont profonds [4].

1.1.6. Données phytochimiques

Chimiquement, les galbules ou noix de cyprès renferment :

-Huiles essentielles :

- monoterpènes (α pinène, δ -3-carène, sabinène) ;
- Sesquiterpène (α cedrène- δ cadinène) ;
- Sesquiterpénols (cédrol, cadinol) ;
- Diterpénols (manool, sempervirol) ;
- Acides di terpéniques (acides néocupressiques) [54].

- Polyphénols :

- Flavonoïdes [55, 56] ;

- Tanins [56, 57] ;

-Dimères et oligomères proanthocyanidoliques [11,58).

1.1.7. Médecine traditionnelle (propriétés thérapeutiques)

Les cônes femelles de cyprès contiennent des principes actifs qui ont des propriétés thérapeutiques très importantes. Le cyprès faisait partie de la matière médicale des anciens égyptiens, comme en témoignent divers papyrus (Ebers, Chester, Beatty) [25].

Dans un ancien texte assyrien du Vie siècle av.J-C. le cyprès était indiqué pour remédier aux douleurs et démangeaisons de l'anus. A cet égard, Hippocrate (relayé au Moyen Age par Sainte-Hildegarde) vantait leurs mérites pour soigner les troubles de la circulation (varices ou hémorroïdes, métrorragies associées à la ménopause) [25]. L'insuffisance circulatoire au niveau des membres inférieurs est pareillement combattue en utilisant ces « Noix » que l'on peut, en outre, tenir pour antihémorragiques, antitussives, astringentes, diurétiques). Quant aux rameaux, on les considère comme antiseptiques et antispasmodiques [25]. Aussi cette huile est-elle employée pour resserrer et tonifier les tissus relâchés, raison pour laquelle elle est temporairement efficace dans les hémorroïdes et dans certains cas de cellulite. Comme ceux de pin, ses composants sont facilement éliminés dans l'urine, d'où son action diurétique [59].

Dans l'Antiquité, les Grecs soignaient la dysenterie, les crachats sanglants, l'asthme et la toux en administrant des cônes de cyprès concassés et marinés dans du vin [60].

Depuis toujours, le cyprès jouissait d'une solide réputation comme hémostatique, astringent, diurétique, pectoral et sudorifique. Il supprime les hémorragies

passives, les hémorroïdes, les diarrhées, les flux muqueux (Cazin, Lecherc, Bensaude). Lecherc [25] affirme que les noix du cyprès constituent un vasoconstricteur, d'une grande efficacité dans les affections du système veineux et dont l'action est identique et de beaucoup supérieure à celle de l'hamamélis de virginie. Les fruits de cyprès ont été également utilisés traditionnellement pour soigner le diabète [61].

Préconisée en 1892 par Bravo [25], l'essence de cyprès est un remède toujours infailible pour calmer les quintes de toux incoercibles en cas de coqueluche, trachéite, bronchite, etc. (en solution alcoolique à 1/4^e, Gatte fossé). On peut aussi en imbiber de quelques gouttes, l'oreiller, le drap et le linge des malades.

Les travaux de Barbin (1931) ont montré que l'essence de cyprès est utilisée avec succès contre l'énurésie nocturne (pipi au lit).

Enfin, l'essence de cyprès est recommandée en cas de fièvres intermittentes dont l'efficacité est comparable à celle du quinquina (Lanzoni) ainsi que dans les troubles génito-urinaire. Elles possèdent également un pouvoir bactéricide actif sur *Bacillus subtilus et micrococcus gyogènes var aureus* (Sarbach, 1962) [25].

1.1.8. Travaux antérieurs :

Les noix de *Cupressus sempervirens. L* renferment des polymères proanthocyanidines qui in vitro ont présenté une véritable activité antivirale contre les deux rétrovirus : le VIH et HTLV III B. Cette activité est un atout majeur de la plante contre toutes les infections virales aiguës ou récidivantes. Ces molécules ont une action directe sur les virus et permettent de supprimer l'infection [62].

Une autre expérimentation pharmacologique chez les rats a montré une activité angioprotectrice des oligomères proanthacyonidines, obtenue à partir des cônes

de *Cupressus sempervirens*. L . Ces molécules sont par ailleurs des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Lapin, voie IV) et des inhibiteurs de l'élastase et de l'activité trypsique (in vitro) [11,58].

Une autre activité étudiée sur l'extrait méthanolique des cônes de *Cupressus sempervirens* a montré que le traitement avec cet extrait avec ses flavonoïdes peuvent fournir une protection partielle contre l'effet toxique induit par l'acétate de plomb. Cela indique que cet extrait méthanolique peut être capable de modifier profondément la sensibilité des rats à la toxicité du sang et du foie, en plus de stress oxydatif induit par l'acétate de plomb [63].

Karkabounas et al., (2003) ont testé l'effet de l'extrait des cônes de *Cupressus sempervirens*.L sur les paramètres lipidiques chez les rats. Ils ont constaté que l'administration d'un extrait hydro-alcoolique des cônes de C.SL a un effet important de réduction des lipides chez les rats Wistar [64].

Les travaux d'**Emmami et al., (2009)** ont montré que *Cupressus sempervirens* L., *cupressus sempervirens* var *horizontalis*, *Cupressus sempervirens* cv *Cereiformis* possèdent une activité antivirale contre le virus d'herpes HSV-1, et que parmi les différentes parties de ces plantes testées, il ressort que l'extrait éthanoliques des fruits de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* possède une forte activité anti-HSV [65].

1.2. Les substances actives : Les huiles essentielles et les composés phénoliques

1.2.1. Les huiles essentielles

1.2.1.1 L'Aromathérapie

L'aromathérapie vient du grec aroma, « odeur » et therapia, « soins ». Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odoriférants.

L'appellation qui est devenue d'usage courant pour parler des essences aromatiques est « Huiles Essentielles ». cependant, la définition la plus complète est : « l'aromathérapie scientifique médicale est définie comme étant l'utilisation d'Huiles Essentielles chémotypées, c'est à dire de composition biochimique bien connue, par voie cutanée, orale, vaginale, rectale, nasale, auriculaire et olfactive afin d'assurer un complément de soin ou un soin préventif ou curatif d'un large panel d'affections chez l'homme, l'animal et la plante, tant au niveau de la destruction des foyers infectieux pathogènes que de la gestion des troubles symptomatiques, organiques ou fonctionnels de ladite affection » [66].

1.2.1.2 Définition des huiles essentielles

Les parfums qu'exhalent certaines plantes sont dus à des molécules volatiles que l'on désigne globalement par le terme "essence".

L '**AFNOR. (2000 a, b, et c)** a définit les huiles essentielles comme étant : « des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont préparés de la phase aqueuses par des procédés physiques » [67, 68, 69].

Funk et Wagnallis (2004) dans la nouvelle Encyclopédie ont décrit les huiles essentielles comme étant des « liquides volatiles, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement soluble dans les alcools, éthers et huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact » [70].

1.2.1.3 Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal avec des familles à haute teneur en matières odorantes comme les conifères, les rutacées, les myrtacées, les ombellifères, les lamiacées, les géraniacées.

Les essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétrices isolées (cas des lauracées et magnoliacées), mais on les rencontre le plus souvent dans des organes sécréteurs spécialement différenciés et variables suivant les familles botaniques. On peut citer, par exemple, les poils sécréteurs des lamiacées, les poches sécrétrices des rutacées et les canaux sécréteurs des conifères. L'appareil sécréteur peut être externe, comme chez la plupart de lamiacées, ou bien interne, comme dans le cas des différents eucalyptus (myrtacées) [71.72].

1.2.1.4. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues des épices, herbes aromatiques, fruits ou fleurs [73]. Elles sont extraites par distillation (hydrodistillation simple ou distillation à vapeur saturée), par pression, par enfleurage ou au moyen d'un solvant, selon la partie de la plante utilisée et la fragilité de l'huile [71, 74]. La méthode pratiquée est très importante pour obtenir une huile essentielle capable de produire la saveur et l'odeur naturelle de la plante, avec un changement chimique minimal des composés présents dans l'huile obtenue [73]. Il y a également d'autres procédés plus développés tels que l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide et l'hydrodiffusion. Les procédés utilisés pour l'obtention des huiles essentielles peuvent influencer sur la composition de ces dernières [74].

Il est à mentionner que d'autres facteurs comme le climat, le sol, et les conditions de croissance influent sur la qualité et la concentration des composés dans les huiles essentielles, et par conséquent leurs pouvoirs thérapeutiques [73, 75].

1.2.1.5. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires des plantes [76]. Ce sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes:

Le groupe de Terpénoïdes: les plus volatils c'est-à-dire à masse moléculaire peu élevée [75], spécialement les monoterpènes: (C₁₀) (myrcène, α-pinène, cinéol, menthol) qui constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle, et les sesquiterpènes: (C₁₅) (caryophyllène, humulène, etc) [73, 77].

Les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C₅H₈), soit deux unités pour les monoterpènes (C₁₀H₁₆) et trois unités pour les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄). Ils ont la même origine métabolique. Ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles [78, 79, 80].

Exceptionnellement, quelques diterpènes (C₂₀H₃₂) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles [81, 82, 83]. La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α-bisabolol), des cétones (menthone, β-vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinenal), des esters (acétate d'α-terpinyol, acétate de cédryle), des phénols (thymol) [84].

Le groupe des composés aromatiques: Ce sont des dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, comme le safrol, l'apiol, l'ansaldéhyde, l'eugénol, la vanilline et le cinnamaldéhyde [74]. Les dérivés phénylpropanoïques et les

terpénoides sont associés en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs ou ils forment l'essence naturelle [81].

Il existe également un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatiles (cas des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petits odorats obtenus à partir des acides linoléique et α -linoléique) tel que le (3Z)-hexén-1-ol décanal [84].

1.2.1.6. Toxicité des huiles essentielles

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence. Elles peuvent présenter de graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres: absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaïsie, aneth, rue, anis, carvi, romarin [85]. D'autres sont à éviter durant la grossesse, ou interdites aux personnes souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques [71].

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible: une DL 50 comprise entre 2 et 5 g de l'huile essentielle/kg du poids de l'animal pour la majorité des huiles couramment utilisées: anis, eucalyptus, girofle ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). D'autres ont une DL50 inférieure à 1g/kg c'est le cas de l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg) où les convulsions apparaissent dès 0.07 g/kg; l'essence de moutarde (0.34 g/kg); l'origan et la sarriette (1.37 g/kg); le basilic, l'estragon et l'hysope (1.5 ml/kg).

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue [68], cependant leur utilisation dans l'usage externe minimise les risques de toxicité [73].

2.2. 1.Les composés phénoliques

1.2.2.1 Généralités sur les composés phénoliques

Le terme « *polyphénols* » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale « composés phénoliques » concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques [86].

Les composés phénoliques constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Ils sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante [87].

Ces composés possèdent en commun un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (88). La structure des composés phénoliques naturels varie des molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) [89].

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes elles mêmes (Allélopathie) et entre les plantes et les symbioses, ou pour lui permettre de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent également de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. Ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel [89].

1.2.2.1. Principales classes des composés phénoliques

La classification des polyphénols est basée sur la distinction entre les composés non flavonoïdes et les flavonoïdes [90] (Figure3):

- **Les composés non flavonoïdes** : Les composés non flavonoïdes ne possèdent pas de squelette flavone [90] :

- **Les acides phénoliques** : On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque [91] et les dérivés de l'acide cinnamique (92) La concentration de l'acide hydroxy-benzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents [86].
- **Les stilbènes** : Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Exemple: le resvératrol, qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales [86, 93].
- **Les lignanes et les lignines** : Les plantes élaborent les lignanes par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique. Il existe d'autres types de lignanes tels que les sesquinéolignanes et les dinéolignanes) [94]. Les lignanes se trouvent essentiellement dans les graines d'oléagineux [86]. Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal représentés par les alcools *p*-coumarique, coniférique et sinapique [95].
- **Les coumarines** : Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone [96]. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* [97]. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau.
- **Les xanthones** : C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microorganismes répondant à une structure de base (C6-C1- C6). Quelques exemples de ces composés sont représentés ci-dessous: le gaboxanthone [98], le xanthène-9-one [99] et le globuliférine [100].

- Les composés flavonoïdes :

Ce sont des pigments hydrosolubles fréquents chez les végétaux et responsables de certaines colorations des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils ont une origine biosynthétique commune et possèdent de ce fait le même élément structurel de base : enchainement de 2-phénylchromane. Les flavonoïdes sont connus principalement pour leur activité antioxydante [73].

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens [101]. Ce groupe est subdivisé en plusieurs sous-classes, mais on distingue principalement 3 sous classes : les flavonones et flavonols, les anthocyanes, et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central.

-Les flavonones et les flavonols représentent environ 80% des flavonoïdes connus. La principale activité attribuée à ces flavonoïdes est une propriété vitaminique P veino-active [73].

- Les anthocyanes se trouvent en quantité importante dans certains fruits, en particulier dans les baies de fruits rouges (myrtilles, cassis...). [102,103]

- Les flavan-3-ols, sont très répandues dans le thé, le vin, le cacao. Exemple : les catéchines

* Les polyphénols existent aussi sous forme d'oligomères comme les tanins.

Les tanins : ils ont d'origine végétale et non azotée. Ce sont des composés polyphénoliques de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines [104,105]. Les tanins sont particulièrement abondants chez les conifères, les Fagaceae, les Rosaceae [104]. On les trouve dans de nombreuses plantes utilisées dans l'alimentation, notamment les céréales et les légumineuses (orge, haricots secs, petits pois, caroube, sorgho) [106]. Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (racines, écorces, feuilles) mais on note fréquemment une accumulation dans les organes âgés. On distingue deux groupes selon leur structure chimique:

1.2.2.3. Intérêt biologique de quelques composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est largement mis en évidence dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes [86]. Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 ■ Quelques activités biologiques des polyphénols.

<i>Polyphénols</i>	<i>Activités</i>	<i>Auteurs</i>
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants	BRUNETON., 1999 [74]
Coumarines	cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du coeur), hypotensives affections cutanées	Gonzalez et coll., 1997 [107] Stavric et Matula., 1992 [108]
Flavonoides	Antitumorales, Anticarcinogènes Anti-inflammatoires, Hypotenseurs et diurétiques antioxydantes, antivirales, anti-allergiques	Das et al., 1994 [109], Bidet et al., 1980 [110], Bruneton ., 1993 [111], Aruoma et al., 1995 [112],

Anthocyanes	Protectrices capillaroveineux	Middleton et Kardasnam., 1993 [113]. Bruneton., 1993(111]
Proanthocyanidines	Antioxydantes, Antitumorales Antifongiques, Anti inflammatoires	Bahorun., 1996 [114] De Oliveira et al.,1972 [115] Brownlee et al., 1992 [116] Kreofsky et al., 1992 [117]
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydante Antimicrobien	Okuda et al., 1983 (118] Okamura et al., 1993 [119] Milal et al., 1996 (120]
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques	Kim et al.,2009 [121]

3.1 Les tests biologiques

1.3.1. L'Aromatogramme

1.3.1.1 Définition de l'aromatogramme

C'est un examen de laboratoire simple et peu coûteux [122]. Lorsque les antibiotiques classiques n'agissent plus ou que la sensibilité de la personne aux infections devient chronique ou tout simplement par choix, le praticien peut avoir recours à l'aromatogramme [123]. C'est un test de laboratoire pour déterminer quelle huile essentielle est plus active, dans une situation clinique donnée. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues. Cette technique datant de 1950 et a été perfectionnée depuis lors [123].

1.3.1.2. Mode d'action contre les bactéries

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles HE a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Cependant, la majorité des travaux cités s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces HE. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont peu nombreux, et à ce jour, il n'existe pas d'étude décrivant d'une manière claire et précise le mode d'action des HE [124].

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

* Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.

* Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

* Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [124].

1.3.2. Stress oxydant, Oxydant, et Les antioxydants

1.3.2.1 Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs, ce déséquilibre a pour conséquences l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules [125].

1.3.2.2 Origine du stress

Les radicaux libres (RL) sont produits par divers mécanismes physiologiques car utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de RL, un état de « stress oxydant » est signalé [126].

1.3.2.3 Définition d'un radical libre

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif [127]. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseur et souvent appelée espèces réactives de l'oxygène (ROS) [126].

L'appellation, espèces réactives de l'oxygène (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (Le radical superoxyde O_2^\bullet ; hydroxyle HO^\bullet ; l'oxyde nitrique NO^\bullet), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires

(peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ; l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$; l'anion hypochlorite ClO^- ; le peroxydinitrite ONOO^-) dont la toxicité est importante ([28,129]).

1.3.2.4. Origine d'un radical libre

En l'absence d'agression extérieure particulière d'origine chimique ou radiative, les ERO sont produites physiologiquement à cause d'imperfection au niveau de la gestion de l'oxygène dans des processus comme la respiration mitochondrial, la phagocytose (au cours de laquelle survient une « flambée respiratoire ou choc respiratoire»), qui entraîne la production d'anion superoxyde, peroxyde et hypochlorite, toxique pour les agents infectieux mais aussi pour les cellules humaines [131].

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées. Le monoxyde d'azote, est produit par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages [126].

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres [126].

L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme [132].

L'activité de certaines enzymes cytoplasmique comme par exemple la xanthine oxydase conduit également à la formation des ERO [133,134].



Les ERO sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, l'exposition prolongée au soleil, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'effort intense et prolongé, ainsi que le tabagisme (une bouffée de cigarette contient environ 1014 radicaux) [135, 136, 137].

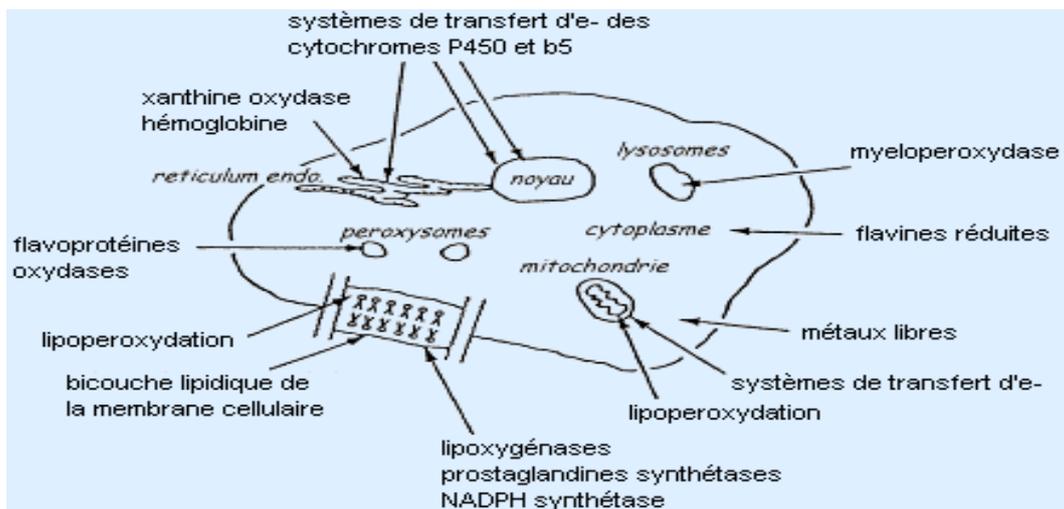


Figure 1.5: Origine des radicaux libres dans la cellule (d'après Machlin & Bendich, 1987) [138].

1.3.2.5. Conséquence du stress oxydant

- **Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides** et notamment les acides gras polyinsaturés qui sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle, cette réaction est appelée peroxydation lipidique. Les conséquences engendrées sont différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux [126].

- **Les radicaux libres peuvent aussi agir sur le glucose** et générer des intermédiaires réactifs. Aussi le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH° [126,139].

- **Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés** et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. C'est donc toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée [139].

- **Les radicaux libres et en particulier OH° , peuvent s'attaquer à l'ADN.** Ils réagissent avec les nucléotides. Ils peuvent mener à des modifications des bases azotées, à la fragmentation de l'ADN, à des ruptures de brins ou à des pontages entre des bases. Les conséquences de ces altérations peuvent être immédiates. La cellule, n'étant plus capable de fonctionner correctement, entre en apoptose. Cependant, ces conséquences peuvent aussi s'exprimer à long terme. Les modifications de l'expression du programme génétique de la cellule peuvent être à l'origine d'un cancer [139].

Pourtant, à côté de ces effets néfastes, les radicaux libres sont nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Leur action est essentielle lors de la phagocytose. De plus, des travaux récents mettent en évidence leur rôle dans la communication cellulaire [139].

1.3.2.6. Les antioxydants

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des RL. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «antioxydant».

1.3.2.6.1. Définition des antioxydants

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat [140] et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne participe pas à la réaction radicalaire [141].

1.3.2.6.2. Les principales sources d'antioxydants

Lorsque des espèces réactives de l'oxygène sont générées *in vivo*, de nombreux antioxydants interviennent. Il s'agit principalement d'enzymes: la superoxydase dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase et aussi des molécules de faible masse moléculaire comme le tripeptide glutathion ou l'acide urique.

En plus de ces substances propres à l'organisme, les médicaments et l'alimentation peuvent être également d'autres sources d'antioxydants.

➤ **Les médicaments** : comme le probucol qui baisse l'athérogenèse, et La N-acétylcystéine qui protège contre l'oxydation par la régénération de la glutathion. Ce dernier présent la capacité de protection de la glutathion est jugée supérieur à celle d'un antioxydant aussi puissant que l'a-tocophérol [143,145].

➤ **Les vitamines** : comme la vitamine C qui s'interagit avec les radicaux libres OH et régénère la vitamine E. La vitamine E qui semble devoir fixer le radical hydroxyle, et la B-carotène qui est considérée parmi les photo-protecteurs actifs, elle apparaît comme un piègeur efficace de l'oxygène [144].

➤ **Les antioxydants naturels**

L'intérêt porté aux antioxydants naturels ne cesse de croître ces dernières années. En effet, on trouve dans la littérature scientifique de plus en plus des publications sur des composés naturels aux propriétés antioxydantes [145].

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont pour la plupart des composés polyphénoliques. Un composé polyphénolique est tout composé possédant un noyau aromatique contenant un ou plusieurs substituants hydroxyles, incluant différents groupes fonctionnels dérivés (esters, glycosides, etc.). Ils sont répandus parmi les plantes alimentaires et sont régulièrement consommés.

Les polyphénols naturels sont des molécules simples, comme les acides phénoliques, et des composés hautement polymérisés comme les tanins.

. **Les flavonoïdes** : Les flavonoïdes agissent par deux mécanismes :

- soit par chélation des métaux (quercétine, catéchine)

- soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes [146].

Ils jouent un rôle très important dans le traitement des inflammations, des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension, des thromboses, des allergies, des affections bactériennes [136]. On les retrouve dans les fruits, les légumes, le thé et le vin [144].

.Les xanthones Ils possèdent des propriétés inhibitrices envers la peroxydation des lipides en plus du fait qu'ils captent les radicaux libres contre les anions superoxydes [147].

.Les coumarines Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires [147].

.Les caroténoïdes Les caroténoïdes réagissent avec l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et alkoxydes en capturant les radicaux libres [148].

.Les dérivés d'acide phénolique On les retrouve dans de nombreux fruits, les légumes, le café, les prunes, les myrtilles, le raisin et les pommes. Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique [144].

La plupart de ces composés sont issus de l'acide hydroxycinnamique, de l'acide coumarique, de l'acide caféique, de l'acide férulique et de l'acide chlorogénique.

Ils possèdent également des propriétés antitumorales par leur capacité de bloquer la nitrosation des amines. Cette nitrosation se fait par réduction du nitrite en oxyde nitrique ou encore par formation des dérivés C-nitroso.

Le verbascoside qui possède une partie catéchole, inhibe l'autooxydation de l'acide linoléique et la peroxydation lipidique microsomale. Il inhibe aussi la peroxydation lipidique dépendante du fer dans les mitochondries et possède une forte capacité de capter le radical libre DPPH.

Parmi les dérivés phénoliques possédant une activité antioxydante, le plus important est le résvératrol. Ce stilbène que l'on retrouve dans le raisin, inhibe le développement des lésions pré-néoplasiques de la souris et il est connu comme agent chimiopréventif potentiel chez l'être humain [149].

.les tanins Les tanins inhibent la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes mais aussi l'oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate.

Lors de la peroxydation les tannins donnent des protons face aux radicaux libres, et ainsi des radicaux tanniques stables sont formés. Ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique.

Les effets bénéfiques du thé vert ne sont plus à prouver. Le thé par ces polyphénols en particulier le gallate d'épigallocatechine, possède des propriétés antioxydantes et capte les radicaux libres. Les polyphénols du thé vert ont en plus des propriétés antimutagènes ; des propriétés anticancéreuses qui ont été démontrées [149].

.Les lignanes Les dérivés bifuranyles des lignanes sont étudiés pour leur propriété antioxydante. Ces dérivés sont présents dans les graines de sésame (*Sesamum indicum* DC., Pedaliaceae). Les lignanes diarylfuranofuraniques tels que le sésaminol sont les substances qui empêchent la détérioration oxydative de l'huile de sésame [149].

CHAPITRE 2 EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES

2.1. Matériel végétal

Les fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (Figure1), ont été collectés au cours des mois de Juin - Juillet, au niveau de la station expérimentale du département d'Agronomie de l'université Saad Dahleb (Blida). Une partie de la matière végétale cueillie a été utilisée à l'état frais, l'autre partie a été séchée à l'air libre, à l'ombre jusqu'à stabilisation de son poids (=7 jours).

L'identification de la plante a été effectuée au laboratoire de Biologie Végétale, Département d'Agronomie, au niveau de l'université Saad Dahleb de Blida. Les études histologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de recherche de biologie végétale du département de Biologie.

2.2. Description botanique de la plante étudiée

2.2.1. Etude morphologique

Afin de caractériser les différents organes de la plante étudiée et leurs constituants, nous avons réalisé une étude morphologique par des observations à l'œil nu et à la loupe.

2.2.2. Etude histologique et localisation des sites sécréteurs

Des coupes histologiques sont réalisées à main sous une loupe binoculaire pour obtenir des coupes fines au niveau des feuilles (écailles), des tiges, et des fruits. Nous avons utilisé la technique de la double coloration au rouge Congo et au vert

de méthyle (Appendice B) [150] pour localiser les sites sécréteurs des essences végétales ainsi que la structure des différents tissus.

2.3. Détermination de la teneur en matière sèche

Principe :

Le but est de déterminer la matière sèche dans la plante.

Mode opératoire :

Le matériel végétal a été lavé, pesé (**PF**) et séché à l'étuve ventilée à 60°C. La plante a été pesée toutes les 24 H jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**PS**) [151,152]. La teneur en eau (**T**) a été calculée comme suit :

$$T(\%) = \frac{PF-PS}{PF} \times 100$$

- Les résultats sont exprimés par la moyenne de cinq mesures ± écart type.

La matière sèche (**M_S**) est obtenue comme suit :

$$M_S(\%) = 100 - T(\%)$$

2.4. Détermination de la teneur en cendres

Principe :

Il repose sur la détermination des substances résiduelles non volatiles contenues dans une drogue lorsque cette dernière est calcinée.

Mode opératoire :

L'incinération du produit est conduite à $550^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$ dans un four à moufle, à chauffage électrique, jusqu'à une masse pratiquement constante, (NF V 03-922). Les échantillons pesés de cônes séchés et broyés (2g) et sont portés à une température de 550°C pendant 3 heures jusqu'à l'obtention de cendres blanches, gris clair ou rougeâtres, visiblement dépourvues de particules de charbon. L'échantillon est refroidi dans le dessiccateur et pesé dès qu'il a atteint la température ambiante [153]. Le taux de cendres est calculé de la manière suivante :

$$\text{Taux de cendres}(\%) = (M_1 - M_2) \frac{100}{(M_1 - M_0)}$$

M_0 : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération,

M_1 : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération chargée avec la prise d'essai.

M_2 : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération avec les cendres.

- Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.

2.5. Etudes des principes actifs

2.5.1. Réactions de caractérisation de la plante

La caractérisation chimique de la plante a été faite en utilisant principalement les réactions en tube. Elle permet d'avoir des informations préliminaires sur les principaux groupes chimiques de la plante [154].

2.5.1.1. Les solutions à analyser

- **infusé à 5 %**

Nous avons mis dans un Erlenmeyer contenant 100ml d'eau bouillante, 5 g de poudre. Après infusion de 15 mn, nous avons filtré et complété le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée.

- **décocté à 1 %**

Nous avons porté à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer, puis nous avons ajouté 1g de poudre tout en le maintenant à une ébullition modérée pendant 15 mn. Après filtration, nous avons ajusté le filtrat à 100 ml

2.5.1.2. Les réactions de Caractérisation de la plante

1) Tanins :

Dans un tube à essai contenant 1 ml de l'infusé, ajouter 1 ml d'une solution aqueuse diluée de FeCl_3 à 1%. En présence de tanins catéchiques, il se développe une coloration verdâtre. L'apparition d'une teinte bleue noire indique la présence de tanins galliques.

2) Flavonoïdes :

Le test consiste à ajouter à 1ml de l'infusé, quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré (HCL) et 0.5g de magnésium (Mg). On laisse agir 3 minutes. Une coloration orange ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

3) Saponosides :

Un volume de 100 ml du décocté à 1% sont répartis dans 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10 successivement 1, 2,10 ml. Le volume de chaque tube est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube est agité pendant 15 secondes dans le sens de la longueur puis laissé au repos pendant 15 minutes. Puis on mesure la hauteur de la mousse.

L'indice de mousse est calculé à partir du tube dans lequel la hauteur de la mousse est de 1 cm.

$$\text{Indice de mousse} = \frac{1000}{\text{Numéro du tube où la hauteur de la mousse}=1}$$

4) Mucilages :

A 1 ml de décocté à 10 % ajouter 5 ml d'éthanol absolu. L'obtention d'un précipité floconneux, par mélange, indique la présence de mucilages.

2.5.2 Etudes des composés volatiles

2.5.2.1. Extraction par hydrodistillation

2.5.2.1.1. Principe

Au cours de l'hydrodistillation, la matière végétale est en contact directe avec l'eau bouillante. Elle peut flotter sur l'eau ou être complètement immergée selon la densité et la quantité à traiter. La vapeur formée au sein de l'eau bouillante entraîne les constituants de l'huile essentielle [155], et le mélange se dirige vers le système de réfrigérant ascendant. Après condensation, l'eau et l'huile essentielle tombent par gravité dans l'essencier où aura lieu la décantation. Ce mélange est

non miscible, ce qui facilite leur séparation par décantation et la récupération de l'huile essentielle. L'huile essentielle et l'eau forment deux phases : phase organique et phase aqueuse.

La fin de l'extraction est atteinte lorsque le volume de l'huile essentielle recueilli ne varie pas [156].

2.5.2.1.2. Procédé classique d'extraction

L'hydrodistillation est considérée comme le seul mode d'extraction retenu par la Pharmacopée Européenne [157,158]. L'extraction des huiles essentielles est réalisée en utilisant un appareil de type Clevenger modifié. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage (Figure 2.1).

Le montage de type Clevenger [159,160] est composé de quatre parties principales :

1. Le réacteur, un ballon dans lequel on introduit la matière et l'eau.
2. La colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur,
3. Le réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs
4. Le vase florentin où vont se séparer la phase organique et la phase aqueuse.

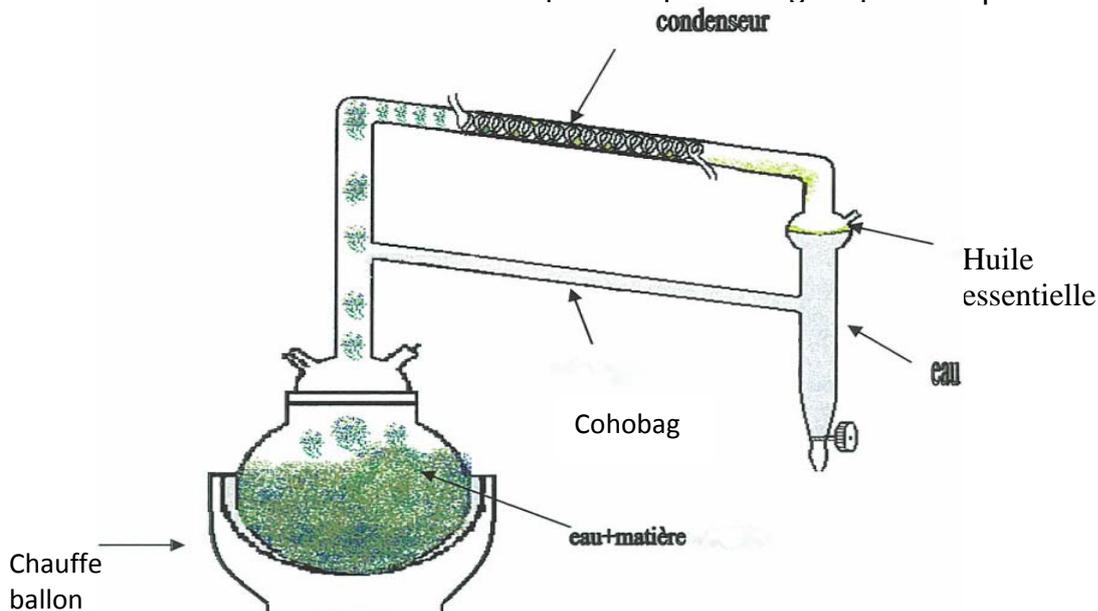


Figure 2.1: Appareillage d'hydrodistillation de type Clevenger [159,160].

Ce système peut être équipé d'un recyclage ou cohobage : un principe de siphon renvoie l'eau florale du vase florentin vers le réacteur. Un simple robinet au bas du vase permet de recueillir l'huile essentielle à la fin de la réaction. Le milieu réactionnel, constitué par la matière et l'eau, est porté à ébullition grâce à un chauffe-ballon. La température est limitée par la température d'ébullition de l'eau: 100°C. La composition chimique des huiles essentielles dépend largement de l'influence des conditions d'hydrodistillation sur l'essence contenue dans la plante.

2.5.2.1.3. Conditions opératoires

La matière végétale (100g), constitué de cônes frais, partiellement écrasés est introduite dans un ballon rempli d'eau distillé (500ml). L'hydrodistillation a été réalisée dans un appareil de type Clevenger pendant trois heures [161]. L'huile essentielle a été récupérée par décantation car elle surnage sur la phase aqueuse. Cette dernière est recueillie en premier dans un bécher, pour pouvoir ensuite récupérer l'huile dans autre bécher.

L'huile essentielle extraite est conservée à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre opaque fermé hermétiquement pour la préserver de l'air, et de la lumière (principaux agents de dégradation) [162].

2.5.2.2. Rendement de l'huile essentielle

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée (M_{HE}) et la masse de la matière végétale (M_V) fraîche, exprimées dans la même unité de masse.

Le rendement en HE, exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante :

$$R\% = \frac{M_{HE}}{M_V} \times 100$$

2.5.2.3. Caractérisation de l'huile essentielle

La caractérisation d'une huile essentielle consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur) ;
- Déterminer ses indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, et pouvoir rotatoire, acidité, indice d'ester, et indice de saponification) ;
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

2.5.2.3.1. Caractéristiques organoleptiques

Chaque extrait est caractérisé par ses propriétés organoleptiques telles que l'odeur, l'aspect la couleur, et la saveur qui dépendent des produits qui le constituent [163].

4.5.2.3.2. Caractéristiques physico- chimiques :

Les constantes physiques sont des données indispensables pour caractériser une huile essentielle en vue de son exploitation.

Les indices d'acides et d'esters permettent également d'avoir une idée générale sur la composition chimique de l'huile essentielle.

Indices physiques :

1)- Densité relative à 20°C d_{20}^{20} [164]:

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse d'un égal volume d'eau à la même température. On mesure la masse m_0 du pycnomètre en verre vide et propre. On le remplit d'eau distillée puis on le

met dans un bain porté à une température de 20 °C pendant 20 à 30 minutes. A la sortie du bain, on l'essuie puis on le pèse, la masse obtenue correspond à m_1 . Le pycnomètre est vidé, lavé puis séché, ensuite on le remplit avec de l'huile essentielle et on répète les mêmes opérations pour obtenir la masse m_2 .

La densité relative à 20°C est obtenue selon la formule :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

En fonction de leurs densités les huiles essentielles sont réparties en deux classes :

- Les huiles lourdes ayant des densités supérieures à 1.
- Les huiles légères ayant des densités inférieures à 1 dont la majorité des huiles essentielles sont dans cette classe incluant l'huile essentielle étudiée.

2)- Indice de réfraction n_D^{20} [164]:

On définit l'indice de réfraction d'une huile essentielle comme le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde donnée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante (t). On utilise la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda=589,6$) nm. La température de référence est généralement à 20°C. Lorsque l'huile n'est pas liquide à cette température, on effectue les mesures à 25°C ou à 30°C. La détermination de l'indice de réfraction s'effectue avec un réfractomètre.

Mode opératoire :

L'échantillon est porté à une température égale à celle de l'expérience définie plus haut. On nettoie le prisme du réfractomètre avec de l'éthanol et on met quelques gouttes de l'huile essentielle sur le prisme.

Pour calculer l'indice de réfraction I_r , on applique la formule suivante :

$$I_r = n_D^{20} = n_D^\theta + (\theta - 20) \cdot 0.00045$$

n_D^{20} : L'indice de réfraction.

n_D^θ : La température à la quelle la substance soit liquide.

D : La raie de sodium (de longueur d'onde 589,6 nm).

0,00045 : la variation d'indice de réfraction quand la température varie de 1°C.

Indices chimiques :**1)- Indice de saponification [165]:**

L'indice de saponification, I_S , est déterminé par la norme (NF T60-206). Il correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier 1 g de matière grasse. On ajoute avec précision 25ml de KOH 0,5 M (d'hydroxyde de potassium) dans un ballon contenant 5 g d'huile essentielle. Le tout est porté à ébullition pendant 3 heures. On ajoute de la phénophtaléine et le mélange est titré avec HCL 0,5 M jusqu'à disparition de la couleur rouge. On effectue un essai à blanc (sans huile).

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$I_S = \frac{(v_0 - v_1) M \cdot 56.1}{M_S}$$

V_0 : volume d'HCL titrant pour le blanc (ml).

V_1 : volume d'HCL titrant pour l'échantillon (ml),

M : molarité d'acide chlorhydrique (mol/l) (0,4999),

M_s : masse de l'échantillon en (mg).

2)- L'indice d'acide I_A [166] :

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

Mode opératoire:

A 0,5 g d'huile essentielle sont ajoutés 2 ml d'éthanol et 2 à 3 gouttes de phénophtaléine. La solution ainsi obtenue est titrée par une solution de KOH (0,1N) dans l'éthanol jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle. L'indice d'acide (I_a) est calculé par la formule suivante :

$$I_a = \frac{5.61 \cdot V}{M}$$

V : Le volume en millilitre de la solution de KOH utilisé.

M : La masse en gramme de la prise d'essai.

3)- L'indice d'ester [166] :

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme de l'huile essentielle.

Mode opératoire:

On ajoute à l'aide d'une burette 6,5 ml, de KOH (0,5N) et des fragments de pierre ponce, dans un ballon contenant 0,5 g d'huile essentielle. Ensuite, on adapte le réfrigérant et on place le ballon sur le bain d'eau bouillante et le laisse pendant une durée précise.

Après refroidissement et démontage du réfrigérant, 0,5 ml d'eau puis 3 gouttes de la solution phénophtaléine ont été ajoutés. L'excès de KOH est titré avec HCl (0,5N). Parallèlement, un essai à blanc a été réalisé dans les mêmes conditions avec les mêmes réactifs.

L'indice d'ester (I_e) est donné par la formule suivante :

$$I_e = \frac{28.05}{m} \cdot (V_0 - V_1) \cdot I_a$$

V_0 : Volume de HCl utilisé pour l'essai à blanc (ml).

V_1 : Volume de HCl utilisé pour la détermination.

m : Masse de prise d'essai (g).

I_a : Indice d'acide déterminé.

2.5.2.4. Analyse qualitative et semi quantitative de l'huile essentielle par CG/MS2.5.2.4.1 But

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques [167]. La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permettant l'individualisation des constituants, avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM), permettant l'identification des

constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont ainsi systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane [83, 186, 169, 170].

4.5.2.4.2 Principe :

Pour commencer le test, une infime quantité (environ 1 microlitre) d'huile essentielle est injectée dans une colonne tubulaire à une température très élevée, où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Les substances traversent la totalité de la colonne où est placée la phase stationnaire qui permet leurs séparations. Leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonction du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés comme une série de pics. En couplant avec CPG, la partie source de SM recueille les molécules qui sont éluées à l'état gazeux, et à l'aide des électrons à haute énergie, ces molécules vont être bombardées, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse, qui sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil.

Finalement, l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse. Les fragments ioniques forment le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Wiley Registry of Mass Spectral Data), contenant plusieurs milliers de spectres [167, 171].

4.5.2.4.2. Conditions opératoires

Cette analyse a été faite au laboratoire d'analyses physico-chimiques au niveau de la société des produits pesticides « Moubaydal », selon les conditions opératoires suivantes :

CPG :

. Appareil du type Hewlett Packard Agilent6890N piloté par Chemstation (NIST98).

. Les conditions de chromatographie sont les suivantes :

. Colonne capillaire : HP5-MS (Crosslinked 5% PHME siloxane)

- Longueur : 30 m;

- Diamètre interne : 0.25mm ;

- Epaisseur du film de la phase : 0.25 µm.

- Programmation de température : 35°C pendant 5 min; puis on augmente la température à raison de 3 °C/min jusqu'à atteindre 250°C pendant 30 min ;

- Volume injecté : 0.2 µl ;

- Mode d'injection : en mode Splitless pendant 30 sec ;

- gaz vecteur : Hélium ;

- Débit du gaz vecteur : 1ml/min.

Spectrométrie de masse :

. Appareil : model Agilent 5973

-Températures : interface (280°C), source (230°C), quadripôle (150°C) ;

- L'énergie d'ionisation : 70 eV.

2.5.2.4.3. L'identification et détermination quantitative des composants

L'identification des composants est effectuée en se basant sur :

-La comparaison des valeurs expérimentales des temps de rétention, des indices de Kovats I_k calculées, et des spectres de masse obtenus des constituants de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens var horizontalis* avec ceux donnés avec une base de données informatisées [NIST, PHEROBASE].

- Et en tenant compte du pourcentage de probabilité de présence du composé fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse.

2.5.2.4.4.. Identification des constituants en CG/MS par le calcul des indices de Kovats :

Principe :

Les indices de Kovats sont les temps de rétention relatifs des substances analysées par rapport à celles des alcanes

L'indice de Kovats d'un produit est caractéristique de l'interaction de ce produit avec la phase stationnaire de la colonne. Il est calculé à partir du chromatogramme des produits à identifier additionnés d'une gamme d'étalon d'alcane.

Chaque pic (X) du chromatogramme doit pouvoir être entre deux nombre d'atomes de carbone de l'alcane consécutifs n et n+1.

Par définition, chaque nombre de carbone d'alcane a un indice égal à 100 fois son nombre d'atomes de carbone sur toute la colonne [172, 173, 174, 175].

En fonction de la température, la position du pic X est repérée par son indice de Kovats I_k donné par la formule suivante :

$$I_k = 100 \left[n + \frac{t'_{Rx} - t'_{Rn}}{t'_{Rn+1} - t'_{Rn}} \right]$$

n : nombre d'atomes de carbone de l'alcane n

t'_{Rx} : temps de rétention réduite du produit X à déterminer

t'_{Rn} : temps de rétention réduite du alcane à n atomes de carbone se trouvant juste avant X.

t'_{Rn+1} : temps de rétention réduite du alcane normal à $n+1$ atomes de carbone se trouvant juste après X.

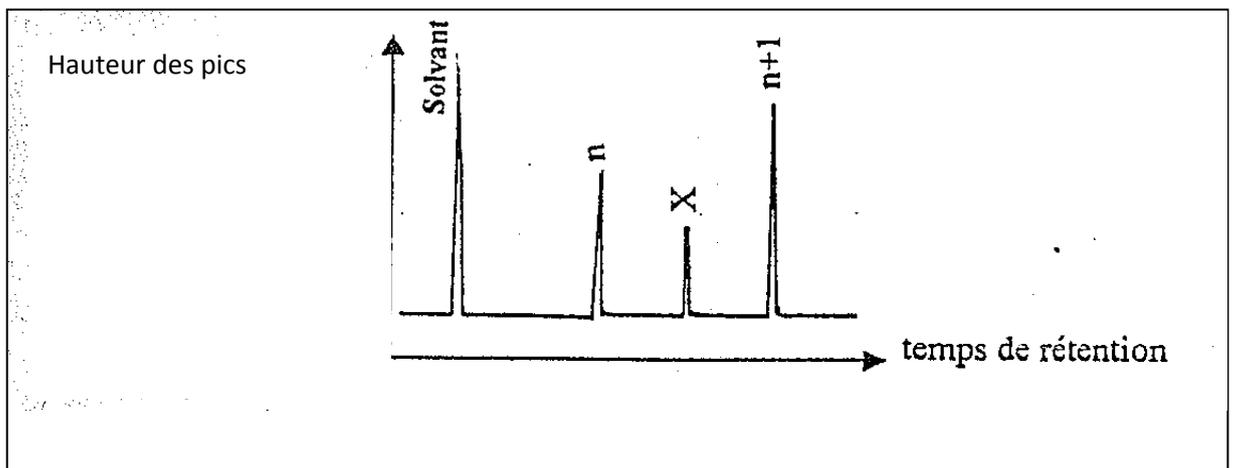


Figure 2.2 : Détermination de l'indice de Kovats à partir d'un chromatogramme [156].

t_0 : temps de rétention du solvant d'injection ou du premier produit non retenu.

t_R : temps de rétention.

2.5.3. Etude des composés non volatils

L'extraction des composés non volatils de la plante sont réalisés à l'aide du soxhlet.

2.5.3.1. Principe

Le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, elles se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant.

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon provoquant ainsi le retour du liquide dans le ballon qui est accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le cycle peut se répéter indéfiniment, jusqu'à épuisement complet du solide, d'où l'efficacité remarquable de cette technique par rapport à la simple macération (Figure 2.3) [176].

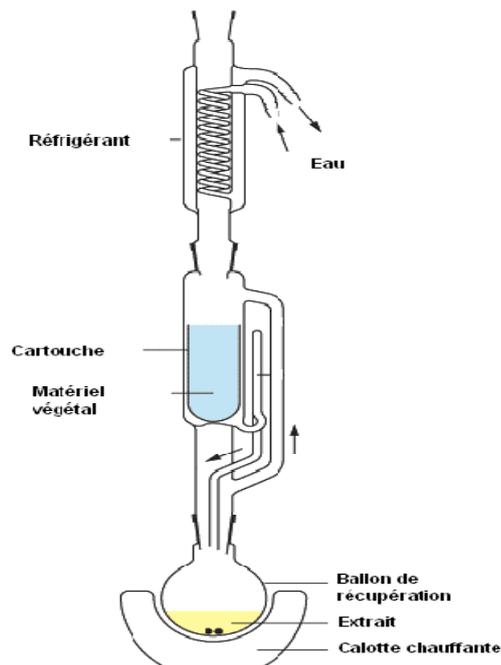


Figure 2.3 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet [176].

2.5.3.2. Conditions opératoires de l'extraction au soxhlet

Nous avons introduire 20 g de fruit séché, préalablement lavé et séché dans une cartouche en papier filtre. Cette cartouche est placée au niveau du soxhlet. Puis nous avons incorporé 250 ml d'éther de pétrole dans un ballon à col rodé à fond plat qui est lui-même placé dans un bain marie et porté à ébullition.

Après une douzaine de siphonages, nous avons récupéré d'une part, le ballon contenant le solvant enrichi en substances solubles (fraction lipidique) [177], et d'autre part la matière végétale contenue dans la cartouche de papier filtre que l'on nommera marc et qu'on laisse sécher à l'air libre.

Le marc récupéré est réintroduit dans une seconde cartouche et soumis à une seconde extraction au soxhlet en utilisant cette fois-ci du méthanol afin de récupérer les substances polaires solubles.

Les résidus secs des deux extractions, à l'éther de pétrole et au méthanol, sont obtenus par évaporation du solvant grâce à un évaporateur rotatif.

2.5.3..3 Rendement de l'extraction

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des substances (Figure 2.7)

On définit le rendement de l'extrait R_e comme étant le rapport entre la masse de l'extrait M_e et la masse de la matière végétale M_{mv} . Il est exprimé en pourcentage par la relation suivante :

$$R_e(\%) = \frac{M_e}{M_{mv}} \cdot 100$$

2.6. Etude biologique de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*

Dans cette partie, nous avons réalisé l'étude de l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*, ainsi que de celle de son huile essentielle. Nous avons également testé l'effet antioxydant de ces extraits.

2.6.1. Activité antimicrobienne de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique de la plante étudiée, a été appréciée par la méthode de diffusion sur milieu gélosée en utilisant des disques stériles appelés aromatoگرامme. Les tests ont été effectués au niveau de laboratoire de microbiologie à l'hôpital de Boufarik.

2.6.1.1. Principe :

La méthode des aromatoگرامmes consiste à déposer un disque en papier absorbant imprégné de la substance à tester sur une boîte de géloseensemencée de culture à étudier.

Cette substance diffuse sur la surface de la gélose à partir du disque et d'un gradient décroissant s'établit autour de ce dernier [178,179] (figure 2.4).

Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à l'efficacité de l'activité antimicrobienne de l'échantillon [180].

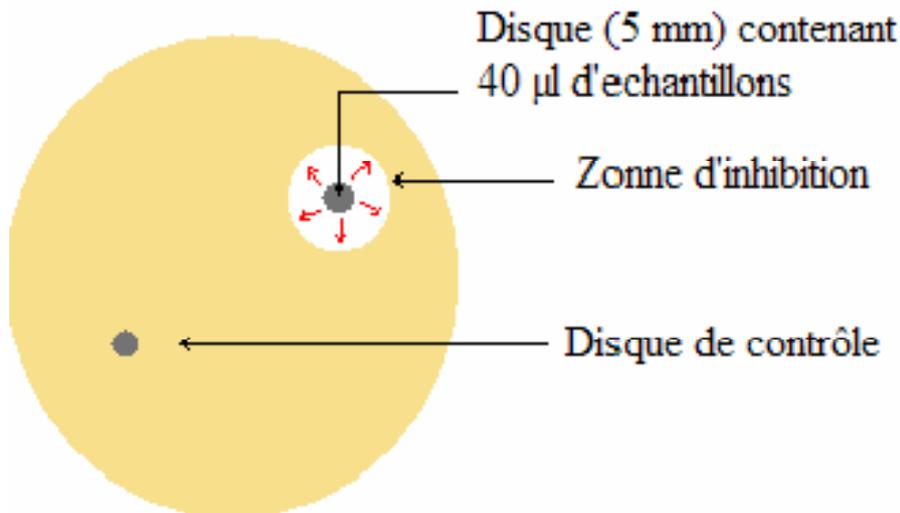


Figure 2.4 : schéma du Test de l'activité anti microbienne [180].

2.6.1.2. Protocole expérimental

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par Dulger et Gonuz, 2004 [181] ; Mohammadi, 2005 [182] ; Parekh et Chanda, 2007 ([183] ; Rota *et al*, 2008 [184] et selon les recommandations de l'OMS suivies par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Boufarik [185].

➤ Les souches de tests

Afin de tester le potentiel antimicrobien des extraits des fruits de la plante étudiée, sept souches microbiennes ont été utilisées. Ces souches utilisées se rencontrent dans diverses pathologies chez l'homme. Ces souches nous ont été gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL, sauf pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui proviennent du laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Boufarik.

Tableau 2.1 : liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.

Nom de la souche	N°ATCC	Gram	Famille
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacillaceae
<i>Basilus cereus</i>	10876	+	Bacillaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	Micrococcaceae
<i>Echerichia coli</i>	25922	-	Enterobacteriaceae
<i>Pseudomonas aerugéiosa</i>	27853	-	Pseudomonadaceae
<i>Klebsiella pneumonie</i>	4352	-	Enterobacteriacee
<i>Condida albicans</i>	24433	/	Cryptococcaceae

➤ **Repiquage des souches**

Les différentes espèces ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 heures pour les bactéries et 24 heures pour les levures, afin d'obtenir une culture jeune des souches testées et des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

➤ **Préparation des milieux de culture**

Selon les méthodes employées et les souches, nous avons utilisés des milieux de cultures, les suivants :

- 1) Gélose nutritive et gélose Muller Hinton pour les Bactéries.
- 2) Gélose nutritive et milieu Sabouraud pour les levures.

Nous avons coulé ces milieux dans des boîtes pétrie posées préalablement sur un plan de travail strictement horizontal, afin de permettre une répartition homogène du milieu de culture de 4mm d'épaisseur, ce qui correspond à une quantité de 20 ml de milieu de culture pour les boîtes de pétrie de 9mm de diamètre.

Les boîtes doivent être convenablement séchées avant l'ensemencement.

➤ **Préparation de l'inoculum**

- A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, nous avons raclé à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et la mettre dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.

- Après une bonne homogénéisation de la suspension bactérienne, son opacité a été mesurée; elle doit être équivalente à 0.5 Mac Farland .L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ **Les produits à tester**

Afin d'explorer le pouvoir antimicrobien des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*, nous avons testé l'effet de l'huile essentielle pure et l'extrait méthanolique qui a été dissous dans le méthanol (1mg/ml).

Pour le contrôle, nous avons utilisé des disques d'antibiotiques prêts à l'usage : Gentamicine- Norfloxacin -Ampiciline- Penicilline G- Cefazoline.

Des témoins sans extrait ont été réalisés avec des disques imprégnés de 3 µl de méthanol.

➤ **Ensemencement**

- nous avons trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis nous l'avons essoré.

- puis nous l'avons frotté sur toute de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même ;

- L'ensemencement se termine en passant l'écouvillon à la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétrie, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des cultures.

➤ **Application des disques**

Les disques de papier ($\varnothing=6\text{mm}$) absorbant contenant 3 μl des extraits à tester (huile essentielle et l'extrait méthanolique), ont été placés sur la surface gélosée sèche, inoculée au préalable par une suspension microbienne pure. Chaque boîte reçoit 3 disques ce qui correspond à 3 répétitions pour chaque espèce.

- l'ensemble des boîtes de pétri est incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.

➤ **Lecture des résultats :**

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques imprégnés des extraits testés. Les résultats de cette activité sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en calculant la moyenne de trois mesures \pm écart type pour chaque test.

2.7. Activité antioxydante

Le test chimique que nous avons utilisé pour évaluer l'activité antioxydante repose sur le principe du pouvoir piégeage du radical DPPH⁺. En général, le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique testés a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (α-tocophérol).

2.7.1. Principe

La capacité de donations des électrons par les huiles essentielles ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH⁺ (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) [186].

Le Diphenyle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphenyle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) [187]. La réaction se résume sous la forme de l'équation (figure 2.5).

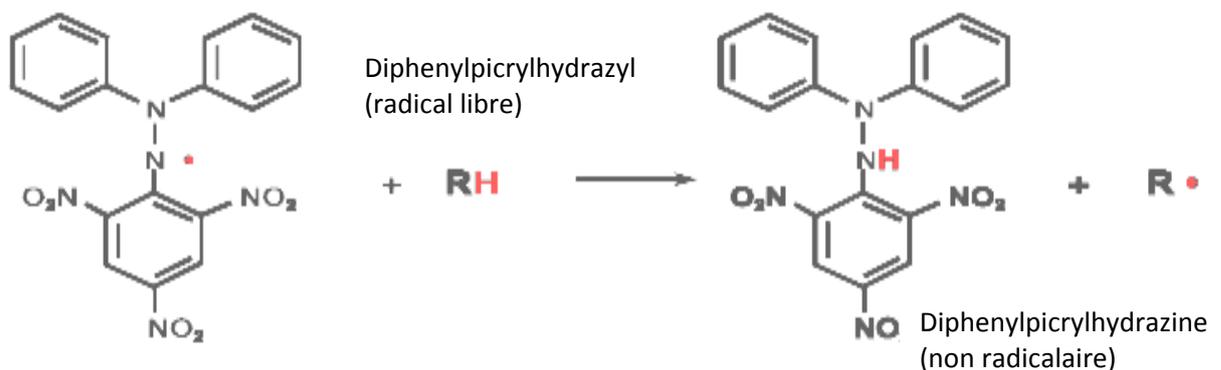


Figure 2.5: Réaction de réduction du DPPH [187].

RH= représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphenyle picryl hydrazine (jaune).

2.7.2. Mode opératoire :

L'activité de piègeur des radicaux libres a été déterminée par la méthode spectrométrique basée sur la réduction d'une solution méthanolique de DPPH en utilisant la méthode de Blois (Feyza Oke, Belma Aslim,, Sahlan Ozturk and Senol Altundag. , 2009)[188].

➤ Préparation de la solution DPPH :

Le DPPH 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl est solubilisé dans du méthanol absolu pour obtenir une solution de 0.004%.

➤ Préparation des solutions à tester:

Pour le test, les échantillons sont dissous dans le méthanol absolu [189]. Pour tous les échantillons, que ce soit huile essentielle, extrait méthanolique ou standard (*α-tocophérol*) nous préparons des solutions dans du méthanol à différentes concentrations de l'ordre de milligramme par ml (tableau 2.2).

Tableau 2. 2: Concentrations des solutions à tester dans le test antioxydant.

Les échantillons	Huile essentielle	Extrait méthanolique	Antioxydant standard (<i>α-tocophérol</i>)
Concentrations mg/ml	5	0.5	0.05
	10	0.3	0.04
	15	0.2	0.03
	20	0.05	0.02
	25	0.01	0.01
	30	0.005	

	50 75	0.001	0.005
--	----------	-------	-------

➤ **L'essai au DPPH :**

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1 ml de la solution à tester, on ajoute 1 ml de la solution au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. Le blanc est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH (0.004%) et de 1 ml de méthanol.

La lecture s'effectue par la mesure de l'absorbance à 517nm par un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (α – tocophérol) dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons tests.

➤ **Expression des résultats :**

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour l' α -tocophérol. L'activité antioxydante qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicaleire} = [(Abs \text{ blanc} - Abs \text{ échantillon}) / Abs \text{ blanc}] \times 100.$$

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.

La valeur IC_{50} a été déterminée pour chaque échantillon, est défini comme étant la concentration de l'échantillon qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Les valeurs IC50 sont déterminées graphiquement des trois tests séparés dont l'abscisse représente la concentration des composés testés et l'ordonnée l'activité antiradicalaire en pourcentage [190].

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomique, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologie végétale

**ETUDE D'UNE PLANTE MEDICINALE *CUPRESSUS*
SEMPERVIRENS var *HORIZONTALIS***

Par

Fatiha BOUALOUANA

Devant le jury composé de :

F. SAIDI	Professeur, USD de Blida	Présidente
S. MEGATLI	Maître de Conférences B, USD de Blida	Examineur
N. BOUCHENAF	Maître de Conférences A, USD de Blida	Examineur
M.HAMAIDI	Maître de Conférences A, USD de Blida	Promoteur
F. HAMAIDI	Maître assistant A, USD de Blida	Co-Promoteur

Blida, Février 2013.

RESUME

Cupressus sempervirens L. est une plante médicinale qui se caractérise par la présence des fruits sous forme des cônes. Ces cônes sont des organes très utilisés en phytothérapie pour ses richesses en plusieurs substances bio-actives. Nous nous sommes intéressés au cours de ce travail aux cônes de la variété *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*, qui pousse dans la station expérimentale de l'université de Blida (Algérie). Nous avons déterminé que les sites sécréteurs de ces cônes sont des canaux sécréteurs. Nous avons également étudié leurs compositions chimiques. L'hydrodistillation est utilisée pour l'extraction des constituants volatils des cônes avec un rendement de 0.4%. La CPG/SM appuyée par le calcul des indices de Kovats (IK) ont permis l'identification de quarante-six (46) composés dont onze (11) sont majoritaires parmi lesquels : L' α -pinène (30.5%), le Δ -3-carène (15.9%), l' α -terpinolène (6.63%), β -phellandrène (5.92%). La comparaison de cette composition chimique à celles d'origines mexicaine, iranienne, Croate, égyptienne, et tunisienne a montré parfois des différences remarquables. L'extraction de la fraction non volatile a été déterminée par soxhlet qui a donné un extrait méthanolique avec un rendement de 16.43%. Un screening phytochimique de la plante a montré la présence des flavonoïdes, des saponines et des tanins en abondances.

La présente étude a également pour but d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante des deux extraits de la plante. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique possèdent un pouvoir antimicrobien variable selon les espèces avec une plus forte zone d'inhibition de 20mm exercée par l'huile essentielle sur *S.aureus* et l'extrait méthanolique sur *P.aeruginosa* qui reste une valeur d'inhibition modérée. Alors qu'aucune activité n'a été signalée sur *E.coli*, *K.pneumonie* et la levure *C.albicans*.

Les extraits méthanoliques ont présenté de fortes propriétés de piéger les molécules du radical libre DPPH. D'ailleurs son pouvoir antioxydant avec un

IC₅₀=0.0075mg/ml est proche de celle du standard α -tocophérol (IC₅₀=0.006mg/ml). Nous avons conclu aussi que l'huile essentielle possède la capacité antioxydante, mais elle est très faible en comparaison avec l'extrait méthanolique.

ABSTRAT

Cupressus sempervirens L. is a medicinal plant which is characterized by the presence of the fruits in the form of the cones. These cones are organs widely used in phytotherapy for its riches of several bio-active substances. In this work, we were interested in the cones of the *Cupressus sempervirens var horizontalis* variety. This variety grows in the experimental station of the University of Blida (Algeria). We determined that the secretory sites of these cones are secretory canals. We also studied their chemical compositions. The hydrodistillation is used for the extraction of the cones volatile components with a productivity of 0.4%. The GC/MS supported by the calculation of Kovats indices (KI) allowed the identification of forty-six (46) compounds with eleven (11) represent the majority of which: The α -pinene (30.5%), the Δ -3-carene (15.9%), α -terpinolene (6.63%), β -phellandrene (5.92%). The comparison of this chemical composition with those of the same oil from Mexico, Iran, Croatia, Egypt, and Tunisia showed remarkable differences. The extraction of the nonvolatile fraction was determined by soxhlet which gave a methanolic extract with a productivity of 16.43%. A phytochemical screening of the plant showed the presence of flavonoïdes, saponins and tanins in abundances.

The purpose of the present study is also to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the two extracts of the plant. The essential oil and methanolic extract have a variable antimicrobial ability according to species' with a stronger inhibition zone of 20mm exerted by essential oil on *S.aureus* and the methanolic extract on *P.aeruginosa* which remains a moderate inhibition value. While no activity was reported on *E. Coli*, *K.pneumonie*, and *C. albicans* yeast.

The methanol extract presented strong properties to scavenge the molecules of free radical DPPH. Moreover its antioxidant ability with $IC_{50}=0.0075\text{mg/ml}$ is close to that of the α -tocopherol standard ($IC_{50}=0.006\text{mg/ml}$). We also concluded that essential oil has the antioxidant capacity but it is very low in comparison to the methanolic extract.

ملخص

Cupressus sempervirens.L هي نبات طبي يتميز باحتوائه على ثمار على شكل صنوبر. هذه الثمار تستخدم على نطاق واسع في طب الأعشاب بسبب احتوائها على عدد مرتفع من المواد البيولوجية النشطة. نحن مهتمون في هذا العمل لثمار فصيلة *Cupressus sempervirens var horizontalis* التي تنمو في المحطة التجريبية في جامعة البليدة (الجزائر). لقد بينا ان مواقع الإفراز هي عبارة عن قنوات إفرازية. وقد قمنا بدراسة التركيب الكيميائي لهذه الثمار. تستخدم طريقة التقطير بالبخار لاستخراج المكونات المتطايرة من الثمار مع تحقيق مردود بنسبة 0.4 %. وقد سمحت تحاليل المدعومة بحساب مؤشرات كوفاتش IK بتحديد ستة وأربعين مركبا (46) من بينهم 11 مركبا يمثل الغالبية منها ألفا بينان (30.5%) ، دالتا-3-كاران (15.9%)، الفا تاربيبولان (6.63%)، β - فيلاندرين (5.92%)، ومقارنة هذا التركيب الكيميائي مع تلك التي لها أصول مكسيكية، إيرانية، كرواتية، مصرية، وتونسية.

قد تم استخراج الجزء غير المتطاير بواسطة soxhlet الذي أعطى مستخلص الميثانول مع مردود قدره 16.43 %. و قد اظهر الفحص الكيميائي للنبتة وجود الفلافونويد، الصابونين، والتانا بوفرة. هذه الدراسة قيمت النشاطات المضادة للأكسدة والمضادة للجراثيم للمستخلصين من هذه النبتة. الزيت الأساسي وكذلك مستخلص الميثانول يمتلكون فاعلية مضادات للميكروبات التي تختلف باختلاف الأنواع مع وجود اعلي درجه للتثبيط بقدر 20 مم التي يبذلها الزيت الأساسي ضد بكتريا *S.aureus* و مستخلص الميثانول ضد بكتريا *P.aeruginosa* مع أنها تبقى قيمه متوسطة للتثبيط. في حين لم يبلغ أي نشاط على *E.coli* و *K.pneumonie* والخميرة *C. albicans*

وأظهر مستخلص الميثانول قدرته الكبيرة في مسح الجذور الحرة للجزيئات DPPH. في الواقع قدرتها المضادة للأكسدة بقيمة $IC_{50}=0.0075\text{مغ/مل}$ هي قريبا جدا من ألفا-توكوفيرول التي تساوي $IC_{50}=0.006\text{مغ/مل}$. استنتجنا أيضا أن الزيت الأساسي لديه القدرة المضادة للأكسدة ولكنها جد منخفضة مقارنة بمستخلص الميثانول.

REMERCIEMENTS

*A*vant toutes choses, Je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné le savoir et la faculté de pouvoir réaliser ce travail.

*J*e tiens particulièrement à remercier mon Promoteur Mr. HAMAIDIM , Maitre de conférences à L'USD, pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il avait consentis durant la rédaction de ce mémoire.

*J*e tiens à remercier aussi, M^{me}. HAMAIDI.F. ma Co- promotrice, Maitre de conférences, à L'USD, pour ses conseils, ses discussions enrichissantes, ses orientations et ses encouragements.

*U*n remerciement chaleureux à M^{me} SAIDI.F, Professeur et responsable de la post graduation (biotechnologies végétales) à l'USD, pour l'honneur qu'elle ma fait en président mon jury. Je ne saurais jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien sans faille et sa sympathie.

*J*e exprime ma reconnaissance à Mr. MEGATLI. Maitre de Conférence à L'USD d'avoir honoré ce travail en acceptant de l'examiner.

*J*e remercie M^{me} BOUCHENAF. Maitre de conférence à l'institut de Chimie industrielle, d'avoir honoré ce travail en acceptant de l'examiner.

A Mme BENOUAKLIL Ingénieur de laboratoire de Post-Graduation de Biologie végétale et Mme BRAHIM ELRAHMANI Ingénieur de laboratoire de Biochimie. J'exprime ma profonde gratitude pour leur disponibilité, leurs encouragements, et leur aide pour le bon déroulement de mon travail. Je les remercie du fond du cœur.

J' adresse également mes sincères remerciements à Mr. Yousef, le gardien de la station expérimentale de l'institut d'Agronomie pour son aide lors de la cueillette de la plante.

Je tiens tout particulièrement à remercier M^{me} Sababo. K. Microbiologiste à l'hôpital de Boufarik pour ses nombreuses explications sur les protocoles des tests microbiologiques et aux autres laborantines pour la bonne humeur régnant au sein du laboratoire.

Mes remerciements sont adressés également à ceux qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long de la période de recherche.

J' exprime ma reconnaissance à tous les Enseignants et Etudiants en Post-Graduation de Biologie de l'université de Blida pour leur encouragement et leur amitié, et à tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans mon travail.

DEDICACE

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes *chers parents* qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleurs conditions et qui m'ont appris à ne jamais baissé les bras.

A mon mari Farid qui m'a soutenu dans la réalisation de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mon profond remerciement.

A mon *grand père* et mes *grande-mères* qui m'ont toujours aimé et comblé par ses bénédictions.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

-Mes très chers frères *Abdel Karim*, et *Abdel Aziz*

-Mes très chères sœurs *Rafika*, *Samira*, *Hanane*, et *Aicha*

-Mes chers neveux et nièces *Abdel basset*, *Mohammed*, *Sérine*, *Lina*, *Nour* et

Chaymae -Mes chers *Ancles*, *Tantes*, *Cousins* et *Cousines*

-Ainsi que pour tous mes *Amis* et mes *Collègues*.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
ABSTRACT	2
ملخص	3
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	6
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	11
INTRODUCTION	17
1. BIBLIOGRAPHIE	20
1.1. Généralités sur la plante étudiée	20
1.1.1. Description botanique	20
1.1. 2. Taxonomie	24
1. 1.3. Origine et répartition géographique	26
1.1.4. Dénomination vernaculaire	27
1. 1.5. Données écologiques	28
1. 1.6. Données phytochimiques	28
1.1.7. Médecine traditionnelle (propriétés thérapeutiques)	29
1.1.8. Travaux antérieurs	30

1.2. Les substances actives :	32
1.2.1. Les huiles essentielles	32
1.2.1.1. L'Aromathérapie	32
1.2.1.2. Définition des huiles essentielles	32
1.2.1.3. Localisation des huiles essentielles	33
1.2.1.4. Extraction des huiles essentielles	33
1.2.1.5. Composition chimique	34
1.2.1.6. Toxicité des huiles essentielles	35
1.2.2. Les composés phénoliques	36
1.2.2.1. Généralités sur les composés phénoliques	36
1.2.2.1. Les principales classes des composés phénoliques	36
1.2.2.2 Intérêt biologique de quelques composés phénoliques	40
1.3. Etudes biologiques	42
1.3.1. L'Aromatogramme	42
1.3.1.1. Définition de l'aromatogramme et le mode d'application	42
1.3.1.2. Mode d'action contre les bactéries	42
1.3.2. Le stress oxydant, oxydants et antioxydants	43
1.3.2.1. Définition du stress oxydant	43
1.3.2 .2. Origine du stress	43
1.3.2.3. Définition d'un radical libre	43
1.3.2.4. Origine d'un radical libre	44
1.3.2.5. Conséquences du stress oxydant	45
1.3.6. Les antioxydants	46
1.3.6.1. Définition des antioxydants	46
1.3.6.2. Les principales sources d'antioxydants	46
2. EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES	50
2.1. Matériel végétal	50
2.2. Description botanique de la plante étudiée	50
2.2.1 Etude morphologique	50
2.2.2. Etudes histologiques et localisation des sites sécréteurs	50
2.3. Détermination de la teneur en matière sèche	51
2.4. Détermination de la teneur en cendres	51

2.5. Etudes des principes actifs	52
2.5.1. Réactions de caractérisation de la plante	52
2.5.1.1. Les solutions à analyser	53
2.5.1.2. Les réactions de caractérisation	53
2.5.2. Etudes des composés volatiles	54
2.5.2.1. Extraction par hydrodistillation	54
2.5.2.1.1. Principe	54
2.5.2.1.2. Procédé classique d'extraction	55
2.5.2.1.3. Conditions opératoires	56
2.5.2.2. Rendement de l'extraction	56
2.5.2.3. Caractérisation de l'huile essentielle	57
2.5.2.3.1. Caractéristiques organoleptiques	57
2.5.2.3.2. Caractéristiques physico-chimiques	57
2.5.2.4. Analyse qualitative et semi quantitative de l'huile essentielle par CG/MS	61
2.5.2.4.1. But	61
2.5.2.4.1. Principe	62
2.5.2.4.2. Conditions opératoires	62
2.5.2.4.3. L'identification et détermination quantitative des composants	63
2.5.2.5. Identifications des constituants en CG/MS par le calcul des indices de Kovats	64
2.5.3. Etudes des composés non volatiles polaires	65
2.5.3.1. Principe	66
2.5.3.2. Conditions opératoires de l'extraction au soxhlet	67
2.5.3.3. Rendement de l'extraction	67
2.6. Etude biologique de <i>Cupressus sempervirens var horizontalis</i>	68
2.6.1. Activité antimicrobienne de <i>Cupressus sempervirens var horizontalis</i>	68
2.6.1.1. Principe	68
2.6.1.2. Protocole expérimental	69
2.7. Activité antioxydante	73
2.7.1. Principe	73
2.7.2. Mode opératoire	74

3. RESULTATS ET DISCUSSION	77
3.1. Description botanique	77
3.1.1. Etude morphologique	77
3.1.2. Etudes histologiques et localisation des sites sécréteurs	82
3.2. Détermination de la teneur en matière sèche	91
3-3-détermination de la teneur en cendres	92
3.4-Etudes des principes actifs	92
3.4.1-Réactions de caractérisation de la plante	92
3.4.2-Etudes des composés volatiles	94
3.4.2.1-Rendement de l'extraction	94
3.4.2.2. Caractérisation de l'huile essentielle	94
3.4.2.3. Analyse de l'huile essentielle par CG/MS	96
3.4.3. Etude des composés non volatiles	102
3.4.3.1. Rendement de l'extraction de la fraction non volatile	102
3.5. Activité biologique	103
3.5.1.Activité antimicrobienne	103
3.5.2.Activitéantioxydante	110
CONCLUSION	117
APPENDICE	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

LISTE DES ILLUSTRATION, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Aspect général des deux variétés de <i>cupressus sempervirens</i> L (original).	21
Figure 1.2	Feuilles de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original).	22
Figure1.3	Organes reproducteurs de <i>cupressus sempervirens</i> L. var <i>horizontalis</i> (original).	22
Figure 1.4	Différentes classes des composés phénoliques.	39
Figure 1.5	Origine des radicaux libres dans la cellule (d'après Machlin & Bendich, 1987).	45
Figure 2.1	Appareillage d'hydrodistillation de type Clevenger.	55
Figure 2.2	Détermination de l'indice de Kovats à partir d'un chromatogramme 65 quelconque.	65
Figure 2.3	Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.	66
Figure 2.4	Schéma du Test de l'activité anti microbienne.	69
Figure 2.5	Réaction de réduction du DPPH.	73
Figure 3.1	A) <i>Cupressus sepervirens</i> var <i>horizontalis</i> ; B) <i>Cupresssus sempervirens</i> var <i>pyramidalis</i> (original).	77

Figure 3.2	Vue d'ensemble dun feuillage dense de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original) .	78
Figure 3.3	Différents types de rameaux de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original).	78
Figure 3.4	A) et B) Feuilles de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> observées sous loupe (originals).	79
Figure 3.5	Organes reproducteurs de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original).	79
Figure 3.6	Cônes mâles groupés en inflorescence (original).	80
Figure 3.7	A) Cône mâle de <i>cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> B) Coupe longitudinale au niveau du cône mâle, observés sous loupe (originals).	80
Figure 3.8	Cône femelle de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> sous loupe (original) .	81
Figure 3.9	Constituants du fruit charnue de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> sous loupe (original).	81
Figure 3.10	Fruits de <i>cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> à différentes tailles (original).	82
Figure 3.11	Les graines à partir des fruits mures ligneux de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (original).	82
Figure 3.12	Coupe transversale au niveau du fruit de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> (état vital) (original)	83

Figure 3.13	A) Coupe longitudinale au niveau d'une canal excréteur au niveau du fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> sous MP×100(original).	83
Figure 3.14	A) Deux écailles observée sous loupe ; B) la structure reliant entre ces écailles observée au MP ×40 et C) Ecailles séparées et observées sous MP×100(original).	84
Figure 3.15	Coupe transversale au niveau d'un cône femelle avec double coloration MP×40(original).	85
Figure 3.16	A) Epiderme du cône femelle ;B) Structure d'une stomate au MP×400 avec double coloration (original).	86
Figure 3.17	Canal excréteur observé au MP×40 (original).	86
Figure 3.18	A) Tissu conducteur au niveau du coupe transversale d'un cône femelle MP×100; B) Fibres de sclérenchymes au MP×400 (originals).	86
Figure 3.19	Fibres de sclérenchymes au niveau d'une coupe transversale d'un cône femelle au MP×100 avec double coloration (original).	87
Figure 3.20	Coupe transversale d'une feuille de <i>cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> au MP×40 avec double coloration (original).	88
Figure 3.21	Coupe transversale d'une tige de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> au MP×40 avec double coloration (original)	89
Figure 3.22	Structure du canal excréteur au MP×400 avec double coloration (original).	89

Figure 3.23	A) Coupes transversales au niveau des tissus conducteurs au MP×100 ; B) Le bois au MP×400; C) Le Liber au MP×400 (avec double coloration) (original).	90
Figure 3.24	Bois en coupes longitudinales des tiges de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> dont A) observé au MP× 100 et B) observé au MP× 400(original).	90
Figure 2.25	Teneur en eau et en matière sèche des fruits frais de <i>cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	91
Figure 2.26	Réactions de caractérisation de la poudre des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	93
Figure 3.27	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	96
Figure 3.28	Teneur des cônes femelles de <i>Cupressus sempervirens</i> .L. var <i>horizontalis</i> en substances polaires et apolaires.	102
Figure 3.29	(A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique testés sur <i>Bacillus subtilis</i> .	106
Figure 3.30	(A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique ; (B) testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	107
Figure 3.31	(A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur <i>Bacillus cereus</i> .	107
Figure 3.32	: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique ; testés sur <i>Staphylococcus aeruginosa</i> .	107

Figure 3.33	Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> vis-à-vis du radical libre DPPH.	112
Figure 3.34	Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> vis-à-vis du radical libre DPPH .	112
Figure 3.35	Pourcentages de l'activité antiradicalaire de satandard α -tocophérol des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> vis-à-vis du radical libre DPPH.	113
Tableau 1.1	Quelques activités biologiques des polyphénols.	40
Tableau 2.1	Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.	70
Tableau 2.2	Concentrations des solutions à tester dans le test antioxydant.	74
Tableau 3.1	Résultats des pesées de <i>Cupressus sempervirens</i> L. var <i>horizontalis</i> après dessiccation pendant 96h.	91
Tableau 3.2	Teneur en cendres totales de la poudre des fruits de cyprès <i>horizontalis</i> .	92
Tableau 3.3	Résultats des réactions en tubes sur la poudre des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	93
Tableau 3.4	Caractères organoleptiques de l'huile essentielle des fruits de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> .	94
Tableau 3.5	Les indices physicochimiques de l'huile essentielle étudiée.	95

Tableau 3.6	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cupressus sempervirens</i> var <i>horizontalis</i>	97
Tableau 3.7	Composés majoritaires, proportions et familles.	99
Tableau 3.8	Principaux constituants de l'huile essentielle des cônes femelles de <i>Cupressus sempervirens</i> . L selon l'origine.	101
Tableau 3.9	Résultats de l'antibiogramme (Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne en mm).	104
Tableau 3.10	Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).	105
Tableau 3.11	Pourcentages de l'activité antiradicalaire moyenne de l'huile essentielle (A) et l'extrait méthanolique (B) des cônes femelles et du standard α -tocophérol (C) vis-à-vis du radical libre DPPH.	111
Tableau 3.12	Activité antiradicalaire des extraits des cônes femelles de <i>sempervirens</i> var <i>horizontalis</i> et du standard.	114

INTRODUCTION

Ces dix dernières années le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité, non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé [1].

Dans ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressaient aux composés des plantes qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les molécules issues des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments; sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel [2]. Actuellement l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plante en tant que soins de santé primaire [2].

Par conséquent les industries pharmaceutiques s'intéressent de plus en plus à la diversité des molécules biologiques des végétaux dans le but d'avoir de nouveaux composés pourvus de propriétés inédites.

Vue cette richesse du monde végétal, notre travail porte sur une plante médicinale dénommée *Cupressus sempervirens* L. C'est une espèce caractéristique en région méditerranéenne(3). Elle se présente sous deux formes d'aspect différent, qui correspondent à deux variétés : la forme pyramidalis : à branches dressées ; c'est le *Cupressus sempervirens* var *pyramidalis*, et la forme horizontalis : à branches étalées ; c'est le *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* ; la variété étudiée dans ce mémoire [3, 4, 5].

Les feuilles et les cônes de *Cupressus sempervirens* L. jouent un rôle important dans la médecine traditionnelle dans laquelle, ils sont utilisés comme des anti-septiques, des anti-rhumatismales, anti-hémorroïdaires, anti-diarrhéiques, des agents vasoconstricteurs, pour la toux, les rhumes, les infections parasitaires, l'inflammation et tonique pour les cheveux aussi forte. Ils sont utilisés pour le traitement des troubles gastro-intestinaux (diarrhée) et contre les dermatoses. Les fruits de la plante sont utilisés traditionnellement pour guérir le diabète [6]. L'action pharmacologique de *Cupressus* a été étudiée par Madar et al. (1995), qui ont rapporté que les terpénoïdes de cette plante présente une activité antifongique [7]. En Albanie, un extrait hydro-alcoolique des cônes de *Cupressus sempervirens* L. est utilisé pour traiter une variété de troubles, y compris l'hyperlipidémie chez des rats Wistar [8]. Cette plante a une huile essentielle très abondante avec un monoterpène typique et est considéré comme un capteur de radicaux avec des effets d'inhibition de la peroxydation lipidique [9].

Le choix de la plante basé d'une part sur l'importance de leurs fruits, qui sont riches en métabolites secondaires (tanins, en essence à leucoanthocyanes et catéchols, et en terpènes), et d'autre part sur leurs usages traditionnels connus. Cependant, quelques études phytochimiques et biologiques sur *Cupressus sempervirens* L. dans l'Algérie ont été signalées, au contraire dans d'autres parties du monde.

La présente étude a porté sur la recherche de constituants chimiques et sur l'évaluation in vitro des activités biologiques de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique, préparés à partir des fruits de *Cupressus sempervirens* L. var *horizontalis*. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Description botanique de la plante récoltée,
- Extractions des principes actifs ; l'huile essentielle par hydrodistillation, et composés phénoliques par soxhlet,
- Faire un screening chimique des extraits (tests en tube, CGMS,...),

- Faire un screening biologique (activité antiradicalaire, activité antimicrobienne) des extraits des fruits de *Cupressus sempervirens* L.var *horizontalis* (huile essentielle et extrait méthanolique).

CHAPITRE 1

BIBLIOGRAPHIE

1.1. Généralités sur la plante étudiée

1.1.1. Description botanique

Le cyprès méditerranéen ou en commun (*Cupressus sempervirens* L.) [10] est un grand arbre toujours vert avec un tronc bien développé, il mesure habituellement de 15 à 20 m de haut, mais peut atteindre 30 à 40 m [11]. Il croit rapidement jusqu'à l'âge de 20 ans et peut vivre jusqu'à l'âge de 500 ans [11].

C'est un arbre très ramifié [12], les rameaux sont généralement courts, quadrangulaires, fins ($\theta=1$), vert grisâtre et qui tombent après quelques années [13].

Il offre deux ports très distincts selon la variété, bien qu'ils soient généralement considérés comme deux cultivars d'une même espèce [14] (Figure 1.1) :

- Pyramidal, en fuseau, dans la variété *pyramidalis*, dont les branches sont dressées et proche du tronc.
- A cime légère, étalée, pour la variété *horizontalis*, dont sa forme peut rappeler celle du cèdre [13], qui étend ses branches de tous cotés [15] avec des grands angles entre les branches et le tronc [16].

L'espèce *Cupressus sempervirens*.L se caractérise par une écorce grise brune et lisse et se fissure verticalement avec l'âge. Le bois quand à lui, de forte densité et quasiment imputrescible ; il contient une essence appréciée pour son usage en

menuiserie [14]. Il possède également la propriété d'éloigner les insectes par son odeur [17].

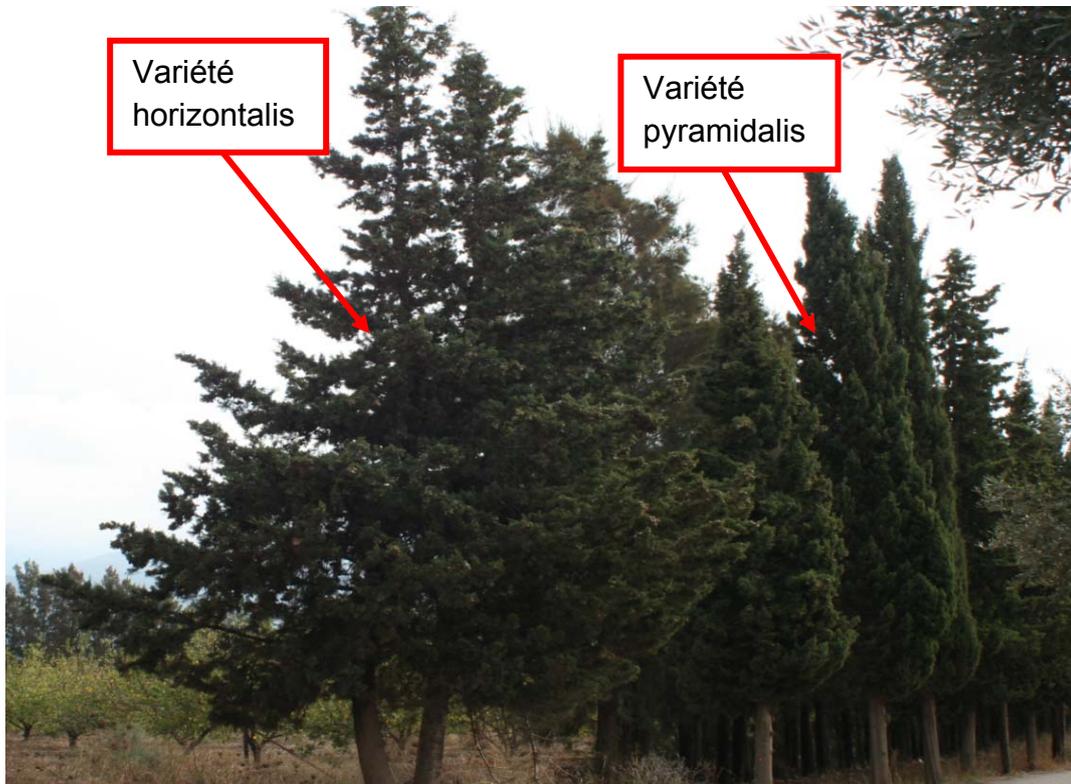


Figure1.1 : Aspect général de deux variétés de *cupressus sempervirens* L (original)

Les feuilles sont persistantes, squamiformes, opposées, réduites à des petites écailles, étroitement imbriquées sur 4 rangs [11, 18, 19, 20]. Elles se chevauchent comme les tuiles d'un toit, recouvrant entièrement les rameaux et lui donnant une teinte d'un vert foncé [21, 22, 23]. Elles ne dégagent qu'une odeur très faible, même froissées [21] (Figure1.2).

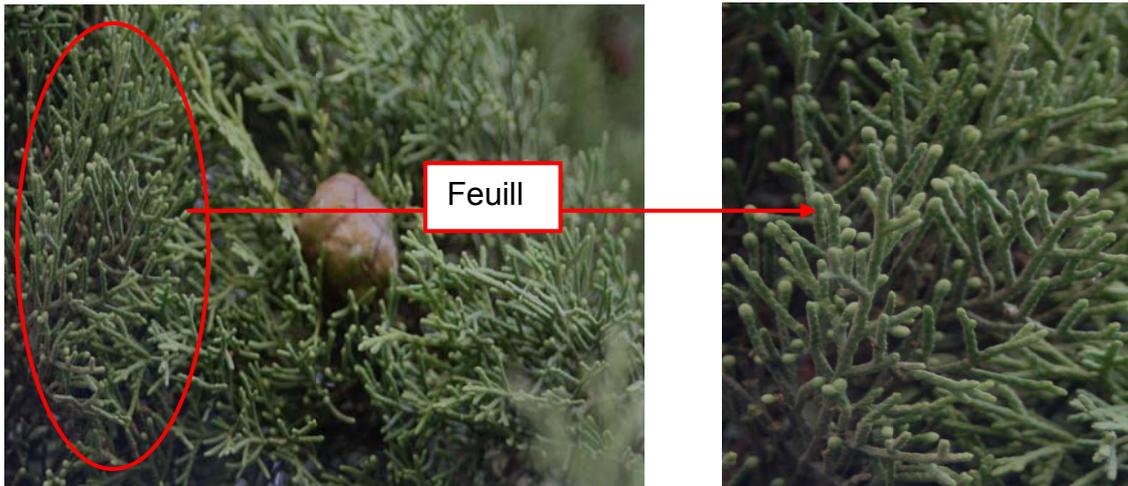


Figure 1.2: Feuilles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* (original).

Le Système racinaire est très développé, profond et étendu [23], avec des racines secondaires horizontales et superficielles qui ancrent l'arbre dans le sol, alors que la racine principale avorte tôt [4,23].

Les fleurs : au printemps, sur les jeunes rameaux apparaissent les organes reproducteurs mâles et femelles [24]. Ces derniers sont portés par des cônes. Cette espèce est dite monoïque [18,19] puisque les organes reproducteurs mâles et femelles sont présents sur le même pied [22] (Figure1.3).



Figure 1.3: les organes reproducteurs de *Cupressus sempervirens var horizontalis* (original).

- **Les organes reproducteurs mâles** sont groupés en chatons terminaux, produits en abondance [24], ils constituent de petits cônes agglomérés en épis denses. Chacun comporte un axe simple autour duquel sont disposées suivant une spirale très serrées de nombreuses étamines écailleuses, imbriquées de 8 à 10 paires d'écailles jaunâtres [18].

Chaque étamine à maturité s'ouvre, laissant échapper les grains de pollen murs et flétrissent peu de temps après.

- **Les organes reproducteurs femelles** sont réunis en inflorescence globuleuses ou ovoïdes regroupent 6 à 12 fleurs ou écailles, en donnant naissance à des petits cônes fructifères [25].

Les cônes femelles constituent le fruit du cyprès vert [26]. Ils présentent des grosses bosselures, sont glabres [27], globuleux, un peu luisant, passent du vert brillant à brun en murissant [28]. Ils atteignent une longueur de 4 cm mais généralement cette longueur varie entre 2 et 3 cm [29]. Les écailles sont anguleuses, excentriquement peltées, mucronées vers le centre [30.31].

Ces écailles s'insèrent autour d'un axe central et chaque écaille est accompagnée d'une bractée qui est souvent visible au printemps, mais qui peut être masquée par les écailles, dont la taille augmente, au cours de la maturation du cône [32]. Les écailles sont dites ovulifères, chacune d'elles porte à leur base 6 à 20 ovules qui deviennent des graines [20,24]. Ils sont charnues [27] et soudées [9] avant leur maturation mais deviennent ligneuses en murissant puis s'écartent l'une de l'autre à la maturité [33].

Dans la variété *horizontalis* les cônes femelles sont plus nombreux et souvent agglomérés que dans la variété *pyramidalis* [30].

Les graines : l'ovule fécondé se transforme en graine [32]. Les cônes libèrent de très petites graines (8 à 20 par écaille), ces dernières sont brunes claires [3,18,23], anguleuses, munies latéralement de 2 ailes membraneuses [28]. Ces ailes

proviennent de l'élimination de la partie supérieure de l'écaille, qui facilitent sa dispersion [22].

Pollinisation et fécondation : les grains de pollen sont dispersés par le vent : pollinisation anémophile; ils atteignent les cônes femelles, s'insinuent dans les interstices des écailles, arrivent en contact des ovules où ils sont retenus par une substance mucilagineuse excrétée par le sommet de l'ovule puis germent [34]. Il s'écoule plusieurs mois entre la pollinisation et la fécondation [34].

Maturation et cueillette

Le fruit atteint à peu près le terme de son volume au cours de la même année, mais il ne mûrit que l'année suivante [3, 11, 35].

Les cônes sont recueillis entre la fin de l'été et le début de l'automne, lorsqu'on observe les changements de couleur de vert brillant à brun foncé [36].

1.1.2. Taxonomie

Les arbres vivants appartiennent à deux grands groupes systématiques, les gymnospermes et les angiospermes.

Les gymnospermes (du Grec gymnos= nu) sont des plantes à fleurs dont les graines sont dites nues parce qu'elles ne sont jamais protégées par un ovaire clos. C'est pour cette raison que les gymnospermes n'ont pas des fruits car s'est la paroi de l'ovaire qui, chez les angiospermes se transforme en fruit renfermant les graines.

On appelle « conifères », les gymnospermes (vivantes ou fossiles) dont l'inflorescence femelle prend à maturité l'aspect d'un cône [37].

Les conifères appelés également résineux sont les représentants actuels des gymnospermes. Ils forment l'ordre des coniférales ou pinales, divisées classiquement en six familles : les Araucariaceae (Araucarias, Agathis), les Cephalataxaceae (cephalotaxus), les Cupresaceae (Cyprès, Thuyas, Genévrier), les pinaceae (Mélézes, Sapin, Pin, Cédres, épicéas), les Podocarpaceae (Podcarpus) et les Taxodiaceae (Séquoias) [38].

Le genre cupressus qui a donné son nom à la tribu des cupressaceae [39], est constitué de 25 taxons répartis dans la zone tempérée chaude de l'hémisphère nord [11].

Des trois espèces méditerranéennes, le cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) également nommé cyprès de Provence ou de Florence est le plus répandu. Les deux autres cyprès méditerranéens sont originaires d'Afrique du nord. Le cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen) est endémique du Haut Atlas occidentale du Maroc où il constitue des peuplements assez dégradés et parfois réduits à quelques arbres. Enfin, le cyprès de Duprez (*Cupressus dupreziana* A.Camus) se rencontre naturellement dans le désert du Tassili N'Ajjer (Algérie) et représente une des espèces les plus menacées du monde [40].

Le cyprès vert a été connu pour exister depuis les plus anciens temps sous deux formes qui correspondent à deux variétés [5,41] :

- Cyprès pyramidal (*Cupressus sempervirens* L. var *fastigiata* = var *pyramidalis*).
- Cyprès horizontalis (*Cupressus sempervirens* L. var *horizontalis*).

Les deux formes peuvent s'hybrider naturellement et produire des descendances présentant une forme de couronne qui varie entre les premiers et les seconds [16].

Selon la classification de Linnaeus et Farjon [42,43,44], le cyprès horizontalis appartient au :

Domaine : Eukaryota

Régne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Pinophytina

Division : Coniferophyta

Classe : Pinopsida / Coniferopsida

Ordre : Pinales

Famille : Cupressaceae

Subfamille : Cupressoideae

Genres : Cupressus

Espèce : *Cupressus sempervirens* L.

Variété : *Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Mill) Gordon.

1.1.3. Origine et répartition géographique

Le genre *Cupressus* se rencontre en zone tempérée chaude de l'hémisphère nord [45,46]. Le cyprès méditerranéen (C.S.L) semble appartenir de tous temps au paysage méditerranéen, avec ses formes horizontales et fastigiées [47]. Il s'agit donc d'une introduction très ancienne réalisée au fil de nombreuses années et parfaitement réussie [5].

Il est originaire d'Iran, la Syrie, la Turquie, Chypre et de plusieurs îles grecques (Crète, Samos, Rhodes). Cette espèce a été introduite dans la plupart des pays méditerranéens, probablement au cours du Tertiaire où elle occupait les grandes surfaces qui se sont réduites au cours des millénaires principalement par l'homme [48,49,50].

En Algérie, cette espèce est utilisée surtout comme brise -vent dans les régions de vents violents.

Pendant la période coloniale, dans la plaine de Mitidja à Blida (25 Km de l'ouest d'Alger) et celle de Mohammedia (à 65 Km au sud de l'Oran), où ont été plantés de vastes champs d'agrumes, les colons français ont utilisé cette espèce massivement afin de border et délimiter ces champs servant comme abris et pour créer également un microclimat favorable à la culture des agrumes.

Dans les zones montagneuses, cette espèce est rarement utilisée dans les travaux de conservation des sols à risque d'érosion hydrique et éolienne. Ainsi on le trouve partout dans les cimetières musulmans, chrétiens et juifs [51]. Il n'existe pas une station naturelle en Algérie [23].

1.1.4. Dénomination vernaculaire

Le *Cupressus sempervirens var horizontalis* est parfois appelée communément : cyprès commun, cyprès d'Italie, cyprès de Montpellier, cyprès de Provence, cyprès toujours vert, cyprès méditerranéen, cyprès horizontal ou cyprès mâle [12,39,52].

Nom arabe : sarou a'adi (سرو عادي) [53].

A travers son histoire, son nom a été modifié et à travers différentes époques on la retrouve sous différentes appellations [44]:

- *Cupressus horizontalis* Mill. 1768;
- *Cupressus sempervirens L. var. horizontalis* (Mill.) Loudon 1830;
- *Cupressus sempervirens L. f. horizontalis* (Mill.) Voss 1907;
- *Cupressus sempervirens L. subsp. horizontalis* (Mill.) A. Camus 1914;
- *Cupressus patula* Spadoni 1826;
- *Cupressus horizontalis* Mill. var. *pendula* hort. ex Endl. 1847;
- *Cupressus sempervirens L. var. numidica* Trab. 1913.

Selon la mythologie, dédiée au jeune Grec-Cuparissos, transformé par Apollon en cyprès; du latin **sempervirens** : toujours vert (d'où son nom repris par Linnée) [18].

1.1.5. Données écologiques

Le cyprès est une essence xérophile, car c'est un arbre robuste susceptible de s'adapter à des conditions physiques très sévères, mais il peut être plastique, c'est-à-dire qui peut se développer dans des climats humides [12]. Vue cette résistance à la sécheresse il est utilisé pour le reboisement des terrains secs [4].

En effet, le cyprès est un arbre sans exigences pluviométriques et peut se contenter de 250 à 350mm / an [12]. Du point de vue thermique, il est sensible aux fortes gelées, résiste bien à la sécheresse, moyennement exigeant la lumière [13].

Il est peu exigeant quand à la nature du sol : il tolère aussi bien des sols calcaires et acides s'ils sont profonds [4].

1.1.6. Données phytochimiques

Chimiquement, les galbules ou noix de cyprès renferment :

-Huiles essentielles :

- monoterpènes (α pinène, δ -3-carène, sabinène) ;
- Sesquiterpène (α cedrène- δ cadinène) ;
- Sesquiterpénols (cédrol, cadinol) ;
- Diterpénols (manool, sempervirol) ;
- Acides di terpéniques (acides néocupressiques) [54].

- Polyphénols :
 - Flavonoïdes [55, 56] ;
 - Tanins [56, 57] ;
 - Dimères et oligomères proanthocyanidoliques [11,58).

1.1.7. Médecine traditionnelle (propriétés thérapeutiques)

Les cônes femelles de cyprès contiennent des principes actifs qui ont des propriétés thérapeutiques très importantes. Le cyprès faisait partie de la matière médicale des anciens égyptiens, comme en témoignent divers papyrus (Ebers, Chester, Beatty) [25].

Dans un ancien texte assyrien du Vie siècle av.J-C. le cyprès était indiqué pour remédier aux douleurs et démangeaisons de l'anus. A cet égard, Hippocrate (relayé au Moyen Age par Sainte-Hildegarde) vantait leurs mérites pour soigner les troubles de la circulation (varices ou hémorroïdes, métrorragies associées à la ménopause) [25]. L'insuffisance circulatoire au niveau des membres inférieurs est pareillement combattue en utilisant ces « Noix » que l'on peut, en outre, tenir pour antihémorragiques, antitussives, astringentes, diurétiques). Quant aux rameaux, on les considère comme antiseptiques et antispasmodiques [25]. Aussi cette huile est-elle employée pour resserrer et tonifier les tissus relâchés, raison pour laquelle elle est temporairement efficace dans les hémorroïdes et dans certains cas de cellulite. Comme ceux de pin, ses composants sont facilement éliminés dans l'urine, d'où son action diurétique [59].

Dans l'Antiquité, les Grecs soignaient la dysenterie, les crachats sanglants, l'asthme et la toux en administrant des cônes de cyprès concassés et marinés dans du vin [60].

Depuis toujours, le cyprès jouissait d'une solide réputation comme hémostatique, astringent, diurétique, pectoral et sudorifique. Il supprime les hémorragies

passives, les hémorroïdes, les diarrhées, les flux muqueux (Cazin, Lecherc, Bensaude). Lecherc [25] affirme que les noix du cyprès constituent un vasoconstricteur, d'une grande efficacité dans les affections du système veineux et dont l'action est identique et de beaucoup supérieure à celle de l'hamamélis de virginie. Les fruits de cyprès ont été également utilisés traditionnellement pour soigner le diabète [61].

Préconisée en 1892 par Bravo [25], l'essence de cyprès est un remède toujours infailible pour calmer les quintes de toux incoercibles en cas de coqueluche, trachéite, bronchite, etc. (en solution alcoolique à 1/4^e, Gatte fossé). On peut aussi en imbiber de quelques gouttes, l'oreiller, le drap et le linge des malades.

Les travaux de Barbin (1931) ont montré que l'essence de cyprès est utilisée avec succès contre l'énurésie nocturne (pipi au lit).

Enfin, l'essence de cyprès est recommandée en cas de fièvres intermittentes dont l'efficacité est comparable à celle du quinquina (Lanzoni) ainsi que dans les troubles génito-urinaire. Elles possèdent également un pouvoir bactéricide actif sur *Bacillus subtilus et micrococcus gyogènes var aureus* (Sarbach, 1962) [25].

1.1.8. Travaux antérieurs :

Les noix de *Cupressus sempervirens. L* renferment des polymères proanthocyanidines qui in vitro ont présenté une véritable activité antivirale contre les deux rétrovirus : le VIH et HTLV III B. Cette activité est un atout majeur de la plante contre toutes les infections virales aiguës ou récidivantes. Ces molécules ont une action directe sur les virus et permettent de supprimer l'infection [62].

Une autre expérimentation pharmacologique chez les rats a montré une activité angioprotectrice des oligomères proanthacyonidines, obtenue à partir des cônes

de *Cupressus sempervirens*. L . Ces molécules sont par ailleurs des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Lapin, voie IV) et des inhibiteurs de l'élastase et de l'activité trypsique (in vitro) [11,58].

Une autre activité étudiée sur l'extrait méthanolique des cônes de *Cupressus sempervirens* a montré que le traitement avec cet extrait avec ses flavonoïdes peuvent fournir une protection partielle contre l'effet toxique induit par l'acétate de plomb. Cela indique que cet extrait méthanolique peut être capable de modifier profondément la sensibilité des rats à la toxicité du sang et du foie, en plus de stress oxydatif induit par l'acétate de plomb [63].

Karkabounas et al., (2003) ont testé l'effet de l'extrait des cônes de *Cupressus sempervirens*.L sur les paramètres lipidiques chez les rats. Ils ont constaté que l'administration d'un extrait hydro-alcoolique des cônes de C.SL a un effet important de réduction des lipides chez les rats Wistar [64].

Les travaux d'**Emmami et al., (2009)** ont montré que *Cupressus sempervirens* L., *cupressus sempervirens* var *horizontalis*, *Cupressus sempervirens* cv *Cereiformis* possèdent une activité antivirale contre le virus d'herpes HSV-1, et que parmi les différentes parties de ces plantes testées, il ressort que l'extrait éthanoliques des fruits de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* possède une forte activité anti-HSV [65].

1.2. Les substances actives : Les huiles essentielles et les composés phénoliques

1.2.1. Les huiles essentielles

1.2.1.1 L'Aromathérapie

L'aromathérapie vient du grec aroma, « odeur » et therapia, « soins ». Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odoriférants.

L'appellation qui est devenue d'usage courant pour parler des essences aromatiques est « Huiles Essentielles ». cependant, la définition la plus complète est : « l'aromathérapie scientifique médicale est définie comme étant l'utilisation d'Huiles Essentielles chémotypées, c'est à dire de composition biochimique bien connue, par voie cutanée, orale, vaginale, rectale, nasale, auriculaire et olfactive afin d'assurer un complément de soin ou un soin préventif ou curatif d'un large panel d'affections chez l'homme, l'animal et la plante, tant au niveau de la destruction des foyers infectieux pathogènes que de la gestion des troubles symptomatiques, organiques ou fonctionnels de ladite affection » [66].

1.2.1.2 Définition des huiles essentielles

Les parfums qu'exhalent certaines plantes sont dus à des molécules volatiles que l'on désigne globalement par le terme "essence".

L '**AFNOR. (2000 a, b, et c)** a définit les huiles essentielles comme étant : « des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont préparés de la phase aqueuses par des procédés physiques » [67, 68, 69].

Funk et Wagnallis (2004) dans la nouvelle Encyclopédie ont décrit les huiles essentielles comme étant des « liquides volatiles, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement soluble dans les alcools, éthers et huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact » [70].

1.2.1.3 Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal avec des familles à haute teneur en matières odorantes comme les conifères, les rutacées, les myrtacées, les ombellifères, les lamiacées, les géraniacées.

Les essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétrices isolées (cas des lauracées et magnoliacées), mais on les rencontre le plus souvent dans des organes sécréteurs spécialement différenciés et variables suivant les familles botaniques. On peut citer, par exemple, les poils sécréteurs des lamiacées, les poches sécrétrices des rutacées et les canaux sécréteurs des conifères. L'appareil sécréteur peut être externe, comme chez la plupart de lamiacées, ou bien interne, comme dans le cas des différents eucalyptus (myrtacées) [71.72].

1.2.1.4. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues des épices, herbes aromatiques, fruits ou fleurs [73]. Elles sont extraites par distillation (hydrodistillation simple ou distillation à vapeur saturée), par pression, par enfleurage ou au moyen d'un solvant, selon la partie de la plante utilisée et la fragilité de l'huile [71, 74]. La méthode pratiquée est très importante pour obtenir une huile essentielle capable de produire la saveur et l'odeur naturelle de la plante, avec un changement chimique minimal des composés présents dans l'huile obtenue [73]. Il y a également d'autres procédés plus développés tels que l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide et l'hydrodiffusion. Les procédés utilisés pour l'obtention des huiles essentielles peuvent influencer sur la composition de ces dernières [74].

Il est à mentionner que d'autres facteurs comme le climat, le sol, et les conditions de croissance influent sur la qualité et la concentration des composés dans les huiles essentielles, et par conséquent leurs pouvoirs thérapeutiques [73, 75].

1.2.1.5. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires des plantes [76]. Ce sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes:

Le groupe de Terpénoïdes: les plus volatils c'est-à-dire à masse moléculaire peu élevée [75], spécialement les monoterpènes: (C₁₀) (myrcène, α-pinène, cinéol, menthol) qui constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle, et les sesquiterpènes: (C₁₅) (caryophyllène, humulène, etc) [73, 77].

Les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C₅H₈), soit deux unités pour les monoterpènes (C₁₀H₁₆) et trois unités pour les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄). Ils ont la même origine métabolique. Ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles [78, 79, 80].

Exceptionnellement, quelques diterpènes (C₂₀H₃₂) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles [81, 82, 83]. La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α-bisabolol), des cétones (menthone, β-vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinenal), des esters (acétate d'α-terpinyl, acétate de cédryle), des phénols (thymol) [84].

Le groupe des composés aromatiques: Ce sont des dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, comme le safrol, l'apiol, l'ansaldéhyde, l'eugénole, la vanilline et le cinnamaldéhyde [74]. Les dérivés phénylpropanoïques et les

terpénoides sont associés en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs ou ils forment l'essence naturelle [81].

Il existe également un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatiles (cas des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petits odorats obtenus à partir des acides linoléique et α -linoléique) tel que le (3Z)-hexén-1-ol décanal [84].

1.2.1.6. Toxicité des huiles essentielles

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence. Elles peuvent présenter de graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres: absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaïsie, aneth, rue, anis, carvi, romarin [85]. D'autres sont à éviter durant la grossesse, ou interdites aux personnes souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques [71].

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible: une DL 50 comprise entre 2 et 5 g de l'huile essentielle/kg du poids de l'animal pour la majorité des huiles couramment utilisées: anis, eucalyptus, girofle ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). D'autres ont une DL50 inférieure à 1g/kg c'est le cas de l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg) où les convulsions apparaissent dès 0.07 g/kg; l'essence de moutarde (0.34 g/kg); l'origan et la sarriette (1.37 g/kg); le basilic, l'estragon et l'hysope (1.5 ml/kg).

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue [68], cependant leur utilisation dans l'usage externe minimise les risques de toxicité [73].

2.2. 1.Les composés phénoliques

1.2.2.1 Généralités sur les composés phénoliques

Le terme « *polyphénols* » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale « composés phénoliques » concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques [86].

Les composés phénoliques constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Ils sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante [87].

Ces composés possèdent en commun un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (88). La structure des composés phénoliques naturels varie des molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) [89].

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes elles mêmes (Allélopathie) et entre les plantes et les symbioses, ou pour lui permettre de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent également de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. Ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel [89].

1.2.2.1. Principales classes des composés phénoliques

La classification des polyphénols est basée sur la distinction entre les composés non flavonoïdes et les flavonoïdes [90] (Figure3):

- **Les composés non flavonoïdes** : Les composés non flavonoïdes ne possèdent pas de squelette flavone [90] :

- **Les acides phénoliques** : On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque [91] et les dérivés de l'acide cinnamique (92) La concentration de l'acide hydroxy-benzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents [86].
- **Les stilbènes** : Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Exemple: le resvératrol, qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales [86, 93].
- **Les lignanes et les lignines** : Les plantes élaborent les lignanes par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique. Il existe d'autres types de lignanes tels que les sesquinéolignanes et les dinéolignanes) [94]. Les lignanes se trouvent essentiellement dans les graines d'oléagineux [86]. Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal représentés par les alcools *p*-coumarique, coniférique et sinapique [95].
- **Les coumarines** : Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone [96]. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* [97]. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau.
- **Les xanthones** : C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microorganismes répondant à une structure de base (C6-C1- C6). Quelques exemples de ces composés sont représentés ci-dessous: le gaboxanthone [98], le xanthène-9-one [99] et le globuliférine [100].

- Les composés flavonoïdes :

Ce sont des pigments hydrosolubles fréquents chez les végétaux et responsables de certaines colorations des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils ont une origine biosynthétique commune et possèdent de ce fait le même élément structurel de base : enchainement de 2-phénylchromane. Les flavonoïdes sont connus principalement pour leur activité antioxydante [73].

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens [101]. Ce groupe est subdivisé en plusieurs sous-classes, mais on distingue principalement 3 sous classes : les flavonones et flavonols, les anthocyanes, et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central.

-Les flavonones et les flavonols représentent environ 80% des flavonoïdes connus. La principale activité attribuée à ces flavonoïdes est une propriété vitaminique P veino-active [73].

- Les anthocyanes se trouvent en quantité importante dans certains fruits, en particulier dans les baies de fruits rouges (myrtilles, cassis...). [102,103]

- Les flavan-3-ols, sont très répandues dans le thé, le vin, le cacao. Exemple : les catéchines

* Les polyphénols existent aussi sous forme d'oligomères comme les tanins.

Les tanins : ils ont d'origine végétale et non azotée. Ce sont des composés polyphénoliques de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines [104,105]. Les tanins sont particulièrement abondants chez les conifères, les Fagaceae, les Rosaceae [104]. On les trouve dans de nombreuses plantes utilisées dans l'alimentation, notamment les céréales et les légumineuses (orge, haricots secs, petits pois, caroube, sorgho) [106]. Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (racines, écorces, feuilles) mais on note fréquemment une accumulation dans les organes âgés. On distingue deux groupes selon leur structure chimique:

- **Les tanins hydrolysables** : Ce sont des polyesters d'oses et d'acides phénols. Ces tanins sont de deux types :
 - Les tanins galliques qui sont les esters d'oses (glucose) et d'acides galliques.
 - Les tanins ellagiques qui sont des esters d'oses et d'acide ellagiques [7,105].
- **Les tanins condensés ou les tanins catéchiques** : De structure plus complexe [95], sont des flavones polymériques. Ils se consistent en unités flavan-3-ol reliées par des ponts carbonés en position 4-8 et 4-6. Les proanthocyanidines ont été identifiés chez tous les groupes de plantes y compris les Gymnospermes et les Ptéridophytes [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54].

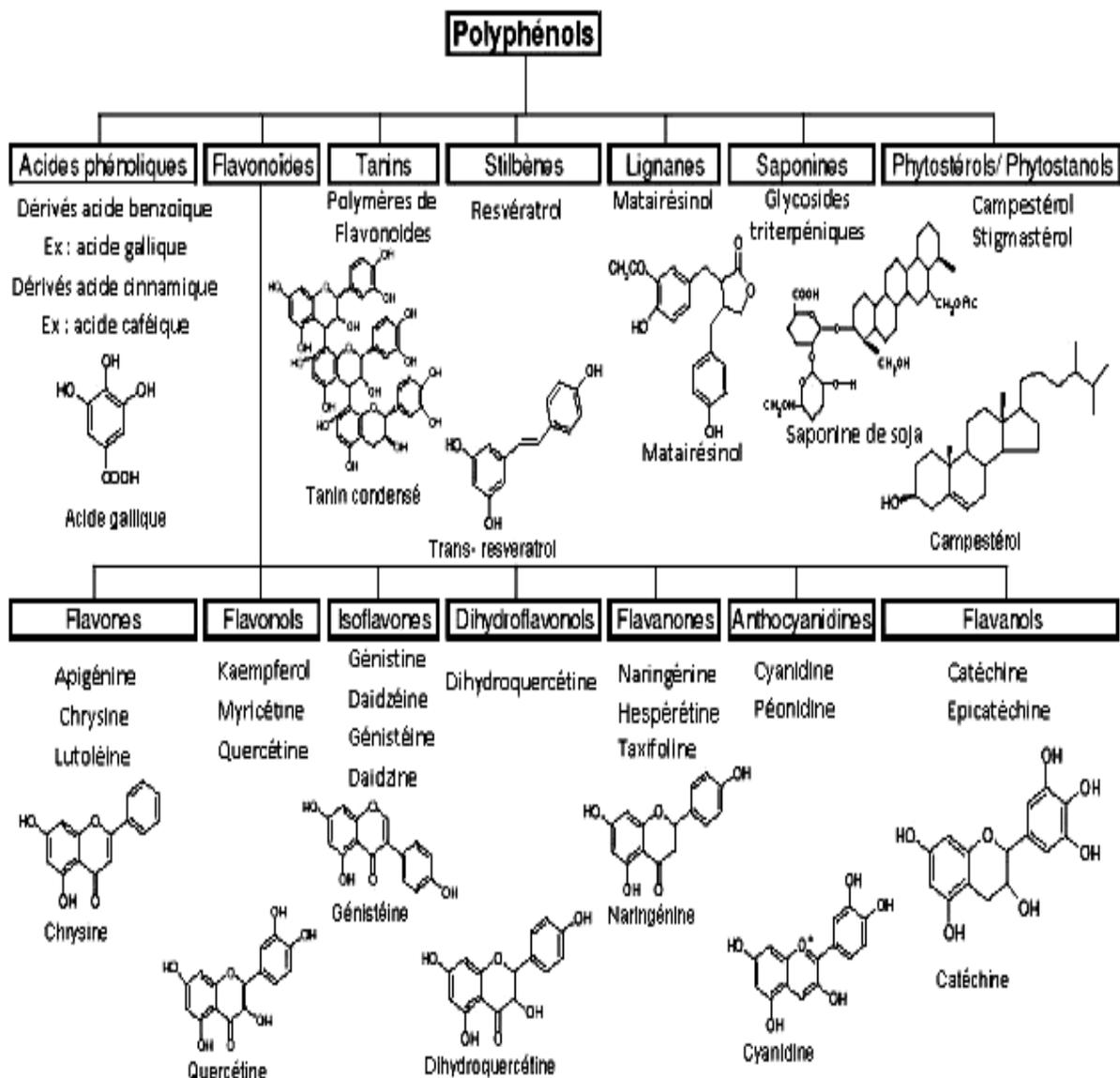


Figure 1.4 : Différentes classes des composés phénoliques [89].

1.2.2.3. Intérêt biologique de quelques composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est largement mis en évidence dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes [86]. Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 ■ Quelques activités biologiques des polyphénols.

<i>Polyphénols</i>	<i>Activités</i>	<i>Auteurs</i>
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants	BRUNETON., 1999 [74]
Coumarines	cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du coeur), hypotensives affections cutanées	Gonzalez et coll., 1997 [107] Stavric et Matula., 1992 [108]
Flavonoides	Antitumorales, Anticarcinogènes Anti-inflammatoires, Hypotenseurs et diurétiques antioxydantes, antivirales, anti-allergiques	Das et al., 1994 [109], Bidet et al., 1980 [110], Bruneton ., 1993 [111], Aruoma et al., 1995 [112],

Anthocyanes	Protectrices capillaroveineux	Middleton et Kardasnam., 1993 [113]. Bruneton., 1993(111]
Proanthocyanidines	Antioxydantes, Antitumorales Antifongiques, Anti inflammatoires	Bahorun., 1996 [114] De Oliveira et al.,1972 [115] Brownlee et al., 1992 [116] Kreofsky et al., 1992 [117]
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydante Antimicrobien	Okuda et al., 1983 (118] Okamura et al., 1993 [119] Milal et al., 1996 (120]
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques	Kim et al.,2009 [121]

3.1 Les tests biologiques

1.3.1. L'Aromatogramme

1.3.1.1 Définition de l'aromatogramme

C'est un examen de laboratoire simple et peu coûteux [122]. Lorsque les antibiotiques classiques n'agissent plus ou que la sensibilité de la personne aux infections devient chronique ou tout simplement par choix, le praticien peut avoir recours à l'aromatogramme [123]. C'est un test de laboratoire pour déterminer quelle huile essentielle est plus active, dans une situation clinique donnée. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues. Cette technique datant de 1950 et a été perfectionnée depuis lors [123].

1.3.1.2. Mode d'action contre les bactéries

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles HE a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Cependant, la majorité des travaux cités s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces HE. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont peu nombreux, et à ce jour, il n'existe pas d'étude décrivant d'une manière claire et précise le mode d'action des HE [124].

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

* Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.

* Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

* Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [124].

1.3.2. Stress oxydant, Oxydant, et Les antioxydants

1.3.2.1 Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs, ce déséquilibre a pour conséquences l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules [125].

1.3.2.2 Origine du stress

Les radicaux libres (RL) sont produits par divers mécanismes physiologiques car utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de RL, un état de « stress oxydant » est signalé [126].

1.3.2.3 Définition d'un radical libre

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif [127]. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseur et souvent appelée espèces réactives de l'oxygène (ROS) [126].

L'appellation, espèces réactives de l'oxygène (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (Le radical superoxyde O_2^\bullet ; hydroxyle HO^\bullet ; l'oxyde nitrique NO^\bullet), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires

(peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ; l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$; l'anion hypochlorite ClO^- ; le peroxydinitrite ONOO^-) dont la toxicité est importante ([28,129]).

1.3.2.4. Origine d'un radical libre

En l'absence d'agression extérieure particulière d'origine chimique ou radiative, les ERO sont produites physiologiquement à cause d'imperfection au niveau de la gestion de l'oxygène dans des processus comme la respiration mitochondriale, la phagocytose (au cours de laquelle survient une « flambée respiratoire ou choc respiratoire»), qui entraîne la production d'anion superoxyde, peroxyde et hypochlorite, toxique pour les agents infectieux mais aussi pour les cellules humaines [131].

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées. Le monoxyde d'azote, est produit par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages [126].

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres [126].

L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme [132].

L'activité de certaines enzymes cytoplasmique comme par exemple la xanthine oxydase conduit également à la formation des ERO [133,134].



Les ERO sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, l'exposition prolongée au soleil, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'effort intense et prolongé, ainsi que le tabagisme (une bouffée de cigarette contient environ 1014 radicaux) [135, 136, 137].

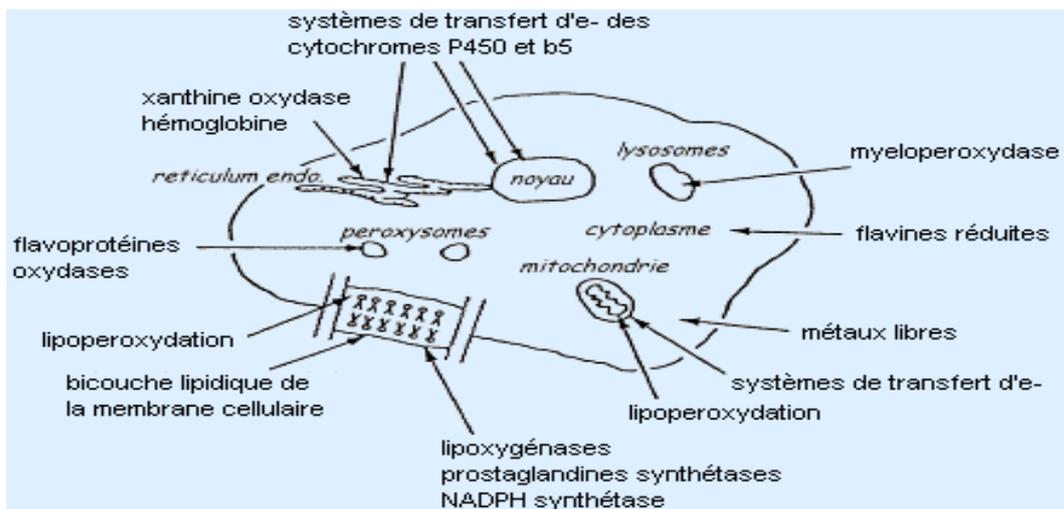


Figure 1.5: Origine des radicaux libres dans la cellule (d'après Machlin & Bendich, 1987) [138].

1.3.2.5. Conséquence du stress oxydant

- **Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides** et notamment les acides gras polyinsaturés qui sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle, cette réaction est appelée peroxydation lipidique. Les conséquences engendrées sont différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux [126].

- **Les radicaux libres peuvent aussi agir sur le glucose** et générer des intermédiaires réactifs. Aussi le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH° [126,139].

- **Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés** et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. C'est donc toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée [139].

- **Les radicaux libres et en particulier OH° , peuvent s'attaquer à l'ADN.** Ils réagissent avec les nucléotides. Ils peuvent mener à des modifications des bases azotées, à la fragmentation de l'ADN, à des ruptures de brins ou à des pontages entre des bases. Les conséquences de ces altérations peuvent être immédiates. La cellule, n'étant plus capable de fonctionner correctement, entre en apoptose. Cependant, ces conséquences peuvent aussi s'exprimer à long terme. Les modifications de l'expression du programme génétique de la cellule peuvent être à l'origine d'un cancer [139].

Pourtant, à côté de ces effets néfastes, les radicaux libres sont nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Leur action est essentielle lors de la phagocytose. De plus, des travaux récents mettent en évidence leur rôle dans la communication cellulaire [139].

1.3.2.6. Les antioxydants

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des RL. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «antioxydant».

1.3.2.6.1. Définition des antioxydants

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat [140] et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne participe pas à la réaction radicalaire [141].

1.3.2.6.2. Les principales sources d'antioxydants

Lorsque des espèces réactives de l'oxygène sont générées *in vivo*, de nombreux antioxydants interviennent. Il s'agit principalement d'enzymes: la superoxydase dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase et aussi des molécules de faible masse moléculaire comme le tripeptide glutathion ou l'acide urique.

En plus de ces substances propres à l'organisme, les médicaments et l'alimentation peuvent être également d'autres sources d'antioxydants.

➤ **Les médicaments** : comme le probucol qui baisse l'athérogenèse, et La N-acétylcystéine qui protège contre l'oxydation par la régénération de la glutathion. Ce dernier présent la capacité de protection de la glutathion est jugée supérieur à celle d'un antioxydant aussi puissant que l'a-tocophérol [143,145].

➤ **Les vitamines** : comme la vitamine C qui s'interagit avec les radicaux libres OH et régénère la vitamine E. La vitamine E qui semble devoir fixer le radical hydroxyle, et la B-carotène qui est considérée parmi les photo-protecteurs actifs, elle apparaît comme un piègeur efficace de l'oxygène [144].

➤ **Les antioxydants naturels**

L'intérêt porté aux antioxydants naturels ne cesse de croître ces dernières années. En effet, on trouve dans la littérature scientifique de plus en plus des publications sur des composés naturels aux propriétés antioxydantes [145].

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont pour la plupart des composés polyphénoliques. Un composé polyphénolique est tout composé possédant un noyau aromatique contenant un ou plusieurs substituants hydroxyles, incluant différents groupes fonctionnels dérivés (esters, glycosides, etc.). Ils sont répandus parmi les plantes alimentaires et sont régulièrement consommés.

Les polyphénols naturels sont des molécules simples, comme les acides phénoliques, et des composés hautement polymérisés comme les tanins.

. **Les flavonoïdes** : Les flavonoïdes agissent par deux mécanismes :

- soit par chélation des métaux (quercétine, catéchine)

- soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes [146].

Ils jouent un rôle très important dans le traitement des inflammations, des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension, des thromboses, des allergies, des affections bactériennes [136]. On les retrouve dans les fruits, les légumes, le thé et le vin [144].

.Les xanthones Ils possèdent des propriétés inhibitrices envers la peroxydation des lipides en plus du fait qu'ils captent les radicaux libres contre les anions superoxydes [147].

.Les coumarines Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires [147].

.Les caroténoïdes Les caroténoïdes réagissent avec l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et alkoxydes en capturant les radicaux libres [148].

.Les dérivés d'acide phénolique On les retrouve dans de nombreux fruits, les légumes, le café, les prunes, les myrtilles, le raisin et les pommes. Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique [144].

La plupart de ces composés sont issus de l'acide hydroxycinnamique, de l'acide coumarique, de l'acide caféique, de l'acide férulique et de l'acide chlorogénique.

Ils possèdent également des propriétés antitumorales par leur capacité de bloquer la nitrosation des amines. Cette nitrosation se fait par réduction du nitrite en oxyde nitrique ou encore par formation des dérivés C-nitroso.

Le verbascoside qui possède une partie catéchole, inhibe l'autooxydation de l'acide linoléique et la peroxydation lipidique microsomale. Il inhibe aussi la peroxydation lipidique dépendante du fer dans les mitochondries et possède une forte capacité de capter le radical libre DPPH.

Parmi les dérivés phénoliques possédant une activité antioxydante, le plus important est le résvératrol. Ce stilbène que l'on retrouve dans le raisin, inhibe le développement des lésions pré-néoplasiques de la souris et il est connu comme agent chimiopréventif potentiel chez l'être humain [149].

.les tanins Les tanins inhibent la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes mais aussi l'oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate.

Lors de la peroxydation les tannins donnent des protons face aux radicaux libres, et ainsi des radicaux tanniques stables sont formés. Ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique.

Les effets bénéfiques du thé vert ne sont plus à prouver. Le thé par ces polyphénols en particulier le gallate d'épigallocatechine, possède des propriétés antioxydantes et capte les radicaux libres. Les polyphénols du thé vert ont en plus des propriétés antimutagènes ; des propriétés anticancéreuses qui ont été démontrées [149].

.Les lignanes Les dérivés bifuranyles des lignanes sont étudiés pour leur propriété antioxydante. Ces dérivés sont présents dans les graines de sésame (*Sesamum indicum* DC., Pedaliaceae). Les lignanes diarylfuranofuraniques tels que le sésaminol sont les substances qui empêchent la détérioration oxydative de l'huile de sésame [149].

CHAPITRE 2 EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES

2.1. Matériel végétal

Les fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (Figure1), ont été collectés au cours des mois de Juin - Juillet, au niveau de la station expérimentale du département d'Agronomie de l'université Saad Dahleb (Blida). Une partie de la matière végétale cueillie a été utilisée à l'état frais, l'autre partie a été séchée à l'air libre, à l'ombre jusqu'à stabilisation de son poids (=7 jours).

L'identification de la plante a été effectuée au laboratoire de Biologie Végétale, Département d'Agronomie, au niveau de l'université Saad Dahleb de Blida. Les études histologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de recherche de biologie végétale du département de Biologie.

2.2. Description botanique de la plante étudiée

2.2.1. Etude morphologique

Afin de caractériser les différents organes de la plante étudiée et leurs constituants, nous avons réalisé une étude morphologique par des observations à l'œil nu et à la loupe.

2.2.2. Etude histologique et localisation des sites sécréteurs

Des coupes histologiques sont réalisées à main sous une loupe binoculaire pour obtenir des coupes fines au niveau des feuilles (écailles), des tiges, et des fruits. Nous avons utilisé la technique de la double coloration au rouge Congo et au vert

de méthyle (Appendice B) [150] pour localiser les sites sécréteurs des essences végétales ainsi que la structure des différents tissus.

2.3. Détermination de la teneur en matière sèche

Principe :

Le but est de déterminer la matière sèche dans la plante.

Mode opératoire :

Le matériel végétal a été lavé, pesé (**PF**) et séché à l'étuve ventilée à 60°C. La plante a été pesée toutes les 24 H jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**PS**) [151,152]. La teneur en eau (**T**) a été calculée comme suit :

$$T(\%) = \frac{PF-PS}{PF} \times 100$$

- Les résultats sont exprimés par la moyenne de cinq mesures ± écart type.

La matière sèche (**M_S**) est obtenue comme suit :

$$M_S(\%) = 100 - T(\%)$$

2.4. Détermination de la teneur en cendres

Principe :

Il repose sur la détermination des substances résiduelles non volatiles contenues dans une drogue lorsque cette dernière est calcinée.

Mode opératoire :

L'incinération du produit est conduite à $550^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$ dans un four à moufle, à chauffage électrique, jusqu'à une masse pratiquement constante, (NF V 03-922). Les échantillons pesés de cônes séchés et broyés (2g) et sont portés à une température de 550°C pendant 3 heures jusqu'à l'obtention de cendres blanches, gris clair ou rougeâtres, visiblement dépourvues de particules de charbon. L'échantillon est refroidi dans le dessiccateur et pesé dès qu'il a atteint la température ambiante [153]. Le taux de cendres est calculé de la manière suivante :

$$\text{Taux de cendres}(\%) = (M_1 - M_2) \frac{100}{(M_1 - M_0)}$$

M_0 : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération,

M_1 : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération chargée avec la prise d'essai.

M_2 : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération avec les cendres.

- Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.

2.5. Etudes des principes actifs

2.5.1. Réactions de caractérisation de la plante

La caractérisation chimique de la plante a été faite en utilisant principalement les réactions en tube. Elle permet d'avoir des informations préliminaires sur les principaux groupes chimiques de la plante [154].

2.5.1.1. Les solutions à analyser

- **infusé à 5 %**

Nous avons mis dans un Erlenmeyer contenant 100ml d'eau bouillante, 5 g de poudre. Après infusion de 15 mn, nous avons filtré et complété le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée.

- **décocté à 1 %**

Nous avons porté à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer, puis nous avons ajouté 1g de poudre tout en le maintenant à une ébullition modérée pendant 15 mn. Après filtration, nous avons ajusté le filtrat à 100 ml

2.5.1.2. Les réactions de Caractérisation de la plante

1) Tanins :

Dans un tube à essai contenant 1 ml de l'infusé, ajouter 1 ml d'une solution aqueuse diluée de FeCl_3 à 1%. En présence de tanins catéchiques, il se développe une coloration verdâtre. L'apparition d'une teinte bleue noire indique la présence de tanins galliques.

2) Flavonoïdes :

Le test consiste à ajouter à 1ml de l'infusé, quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré (HCL) et 0.5g de magnésium (Mg). On laisse agir 3 minutes. Une coloration orange ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

3) Saponosides :

Un volume de 100 ml du décocté à 1% sont répartis dans 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10 successivement 1, 2,10 ml. Le volume de chaque tube est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube est agité pendant 15 secondes dans le sens de la longueur puis laissé au repos pendant 15 minutes. Puis on mesure la hauteur de la mousse.

L'indice de mousse est calculé à partir du tube dans lequel la hauteur de la mousse est de 1 cm.

$$\textit{Indice de mousse} = \frac{1000}{\textit{Numéro du tube où la hauteur de la mousse}=1}$$

4) Mucilages :

A 1 ml de décocté à 10 % ajouter 5 ml d'éthanol absolu. L'obtention d'un précipité floconneux, par mélange, indique la présence de mucilages.

2.5.2 Etudes des composés volatiles

2.5.2.1. Extraction par hydrodistillation

2.5.2.1.1. Principe

Au cours de l'hydrodistillation, la matière végétale est en contact directe avec l'eau bouillante. Elle peut flotter sur l'eau ou être complètement immergée selon la densité et la quantité à traiter. La vapeur formée au sein de l'eau bouillante entraîne les constituants de l'huile essentielle [155], et le mélange se dirige vers le système de réfrigérant ascendant. Après condensation, l'eau et l'huile essentielle tombent par gravité dans l'essencier où aura lieu la décantation. Ce mélange est

non miscible, ce qui facilite leur séparation par décantation et la récupération de l'huile essentielle. L'huile essentielle et l'eau forment deux phases : phase organique et phase aqueuse.

La fin de l'extraction est atteinte lorsque le volume de l'huile essentielle recueilli ne varie pas [156].

2.5.2.1.2. Procédé classique d'extraction

L'hydrodistillation est considérée comme le seul mode d'extraction retenu par la Pharmacopée Européenne [157,158]. L'extraction des huiles essentielles est réalisée en utilisant un appareil de type Clevenger modifié. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage (Figure 2.1).

Le montage de type Clevenger [159,160] est composé de quatre parties principales :

1. Le réacteur, un ballon dans lequel on introduit la matière et l'eau.
2. La colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur,
3. Le réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs
4. Le vase florentin où vont se séparer la phase organique et la phase aqueuse.

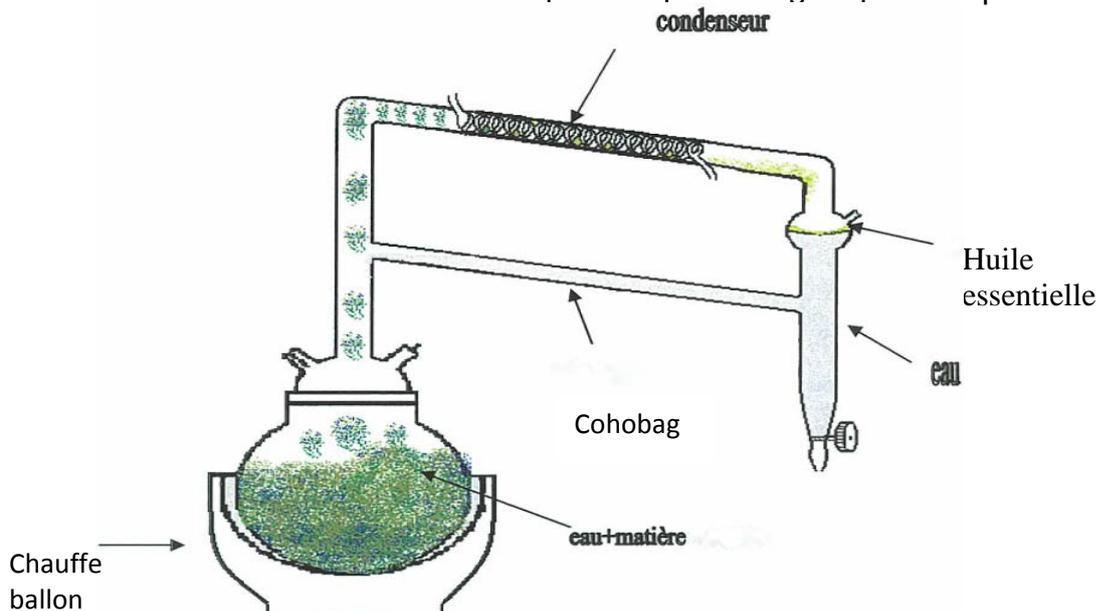


Figure 2.1: Appareillage d'hydrodistillation de type Clevenger [159,160].

Ce système peut être équipé d'un recyclage ou cohobage : un principe de siphon renvoie l'eau florale du vase florentin vers le réacteur. Un simple robinet au bas du vase permet de recueillir l'huile essentielle à la fin de la réaction. Le milieu réactionnel, constitué par la matière et l'eau, est porté à ébullition grâce à un chauffe-ballon. La température est limitée par la température d'ébullition de l'eau: 100°C. La composition chimique des huiles essentielles dépend largement de l'influence des conditions d'hydrodistillation sur l'essence contenue dans la plante.

2.5.2.1.3. Conditions opératoires

La matière végétale (100g), constitué de cônes frais, partiellement écrasés est introduite dans un ballon rempli d'eau distillé (500ml). L'hydrodistillation a été réalisée dans un appareil de type Clevenger pendant trois heures [161]. L'huile essentielle a été récupérée par décantation car elle surnage sur la phase aqueuse. Cette dernière est recueillie en premier dans un bécher, pour pouvoir ensuite récupérer l'huile dans autre bécher.

L'huile essentielle extraite est conservée à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre opaque fermé hermétiquement pour la préserver de l'air, et de la lumière (principaux agents de dégradation) [162].

2.5.2.2. Rendement de l'huile essentielle

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée (M_{HE}) et la masse de la matière végétale (M_V) fraîche, exprimées dans la même unité de masse.

Le rendement en HE, exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante :

$$R\% = \frac{M_{HE}}{M_V} \times 100$$

2.5.2.3. Caractérisation de l'huile essentielle

La caractérisation d'une huile essentielle consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur) ;
- Déterminer ses indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, et pouvoir rotatoire, acidité, indice d'ester, et indice de saponification) ;
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

2.5.2.3.1. Caractéristiques organoleptiques

Chaque extrait est caractérisé par ses propriétés organoleptiques telles que l'odeur, l'aspect la couleur, et la saveur qui dépendent des produits qui le constituent [163].

4.5.2.3.2. Caractéristiques physico- chimiques :

Les constantes physiques sont des données indispensables pour caractériser une huile essentielle en vue de son exploitation.

Les indices d'acides et d'esters permettent également d'avoir une idée générale sur la composition chimique de l'huile essentielle.

Indices physiques :

1)- Densité relative à 20°C d_{20}^{20} [164]:

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse d'un égal volume d'eau à la même température. On mesure la masse m_0 du pycnomètre en verre vide et propre. On le remplit d'eau distillée puis on le

met dans un bain porté à une température de 20 °C pendant 20 à 30 minutes. A la sortie du bain, on l'essuie puis on le pèse, la masse obtenue correspond à m_1 . Le pycnomètre est vidé, lavé puis séché, ensuite on le remplit avec de l'huile essentielle et on répète les mêmes opérations pour obtenir la masse m_2 .

La densité relative à 20°C est obtenue selon la formule :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

En fonction de leurs densités les huiles essentielles sont réparties en deux classes :

- Les huiles lourdes ayant des densités supérieures à 1.
- Les huiles légères ayant des densités inférieures à 1 dont la majorité des huiles essentielles sont dans cette classe incluant l'huile essentielle étudiée.

2)- Indice de réfraction n_D^{20} [164]:

On définit l'indice de réfraction d'une huile essentielle comme le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde donnée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante (t). On utilise la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda=589,6$) nm. La température de référence est généralement à 20°C. Lorsque l'huile n'est pas liquide à cette température, on effectue les mesures à 25°C ou à 30°C. La détermination de l'indice de réfraction s'effectue avec un réfractomètre.

Mode opératoire :

L'échantillon est porté à une température égale à celle de l'expérience définie plus haut. On nettoie le prisme du réfractomètre avec de l'éthanol et on met quelques gouttes de l'huile essentielle sur le prisme.

Pour calculer l'indice de réfraction I_r , on applique la formule suivante :

$$I_r = n_D^{20} = n_D^\theta + (\theta - 20) \cdot 0.00045$$

n_D^{20} : L'indice de réfraction.

n_D^θ : La température à la quelle la substance soit liquide.

D : La raie de sodium (de longueur d'onde 589,6 nm).

0,00045 : la variation d'indice de réfraction quand la température varie de 1°C.

Indices chimiques :**1)- Indice de saponification [165]:**

L'indice de saponification, I_S , est déterminé par la norme (NF T60-206). Il correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier 1 g de matière grasse. On ajoute avec précision 25ml de KOH 0,5 M (d'hydroxyde de potassium) dans un ballon contenant 5 g d'huile essentielle. Le tout est porté à ébullition pendant 3 heures. On ajoute de la phénophtaléine et le mélange est titré avec HCL 0,5 M jusqu'à disparition de la couleur rouge. On effectue un essai à blanc (sans huile).

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$I_S = \frac{(v_0 - v_1) M \cdot 56.1}{M_S}$$

V_0 : volume d'HCL titrant pour le blanc (ml).

V_1 : volume d'HCL titrant pour l'échantillon (ml),

M : molarité d'acide chlorhydrique (mol/l) (0,4999),

M_s : masse de l'échantillon en (mg).

2)- L'indice d'acide I_A [166] :

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

Mode opératoire:

A 0,5 g d'huile essentielle sont ajoutés 2 ml d'éthanol et 2 à 3 gouttes de phénophtaléine. La solution ainsi obtenue est titrée par une solution de KOH (0,1N) dans l'éthanol jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle. L'indice d'acide (I_a) est calculé par la formule suivante :

$$I_a = \frac{5.61 \cdot V}{M}$$

V : Le volume en millilitre de la solution de KOH utilisé.

M : La masse en gramme de la prise d'essai.

3)- L'indice d'ester [166] :

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme de l'huile essentielle.

Mode opératoire:

On ajoute à l'aide d'une burette 6,5 ml, de KOH (0,5N) et des fragments de pierre ponce, dans un ballon contenant 0,5 g d'huile essentielle. Ensuite, on adapte le réfrigérant et on place le ballon sur le bain d'eau bouillante et le laisse pendant une durée précise.

Après refroidissement et démontage du réfrigérant, 0,5 ml d'eau puis 3 gouttes de la solution phénophtaléine ont été ajoutés. L'excès de KOH est titré avec HCl (0,5N). Parallèlement, un essai à blanc a été réalisé dans les mêmes conditions avec les mêmes réactifs.

L'indice d'ester (I_e) est donné par la formule suivante :

$$I_e = \frac{28.05}{m} \cdot (V_0 - V_1) \cdot I_a$$

V_0 : Volume de HCl utilisé pour l'essai à blanc (ml).

V_1 : Volume de HCl utilisé pour la détermination.

m : Masse de prise d'essai (g).

I_a : Indice d'acide déterminé.

2.5.2.4. Analyse qualitative et semi quantitative de l'huile essentielle par CG/MS2.5.2.4.1 But

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques [167]. La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permettant l'individualisation des constituants, avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM), permettant l'identification des

constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont ainsi systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane [83, 186, 169, 170].

4.5.2.4.2 Principe :

Pour commencer le test, une infime quantité (environ 1 microlitre) d'huile essentielle est injectée dans une colonne tubulaire à une température très élevée, où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Les substances traversent la totalité de la colonne où est placée la phase stationnaire qui permet leurs séparations. Leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonction du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés comme une série de pics. En couplant avec CPG, la partie source de SM recueille les molécules qui sont éluées à l'état gazeux, et à l'aide des électrons à haute énergie, ces molécules vont être bombardées, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse, qui sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil.

Finalement, l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse. Les fragments ioniques forment le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Wiley Registry of Mass Spectral Data), contenant plusieurs milliers de spectres [167, 171].

4.5.2.4.2. Conditions opératoires

Cette analyse a été faite au laboratoire d'analyses physico-chimiques au niveau de la société des produits pesticides « Moubaydal », selon les conditions opératoires suivantes :

CPG :

. Appareil du type Hewlett Packard Agilent6890N piloté par Chemstation (NIST98).

. Les conditions de chromatographie sont les suivantes :

. Colonne capillaire : HP5-MS (Crosslinked 5% PHME siloxane)

- Longueur : 30 m;

- Diamètre interne : 0.25mm ;

- Epaisseur du film de la phase : 0.25 µm.

- Programmation de température : 35°C pendant 5 min; puis on augmente la température à raison de 3 °C/min jusqu'à atteindre 250°C pendant 30 min ;

- Volume injecté : 0.2 µl ;

- Mode d'injection : en mode Splitless pendant 30 sec ;

- gaz vecteur : Hélium ;

- Débit du gaz vecteur : 1ml/min.

Spectrométrie de masse :

. Appareil : model Agilent 5973

-Températures : interface (280°C), source (230°C), quadripôle (150°C) ;

- L'énergie d'ionisation : 70 eV.

2.5.2.4.3. L'identification et détermination quantitative des composants

L'identification des composants est effectuée en se basant sur :

-La comparaison des valeurs expérimentales des temps de rétention, des indices de Kovats I_k calculées, et des spectres de masse obtenus des constituants de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens var horizontalis* avec ceux donnés avec une base de données informatisées [NIST, PHEROBASE].

- Et en tenant compte du pourcentage de probabilité de présence du composé fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse.

2.5.2.4.4.. Identification des constituants en CG/MS par le calcul des indices de Kovats :

Principe :

Les indices de Kovats sont les temps de rétention relatifs des substances analysées par rapport à celles des alcanes

L'indice de Kovats d'un produit est caractéristique de l'interaction de ce produit avec la phase stationnaire de la colonne. Il est calculé à partir du chromatogramme des produits à identifier additionnés d'une gamme d'étalon d'alcane.

Chaque pic (X) du chromatogramme doit pouvoir être entre deux nombre d'atomes de carbone de l'alcane consécutifs n et n+1.

Par définition, chaque nombre de carbone d'alcane a un indice égal à 100 fois son nombre d'atomes de carbone sur toute la colonne [172, 173, 174, 175].

En fonction de la température, la position du pic X est repérée par son indice de Kovats I_k donné par la formule suivante :

$$I_k = 100 \left[n + \frac{t'_{Rx} - t'_{Rn}}{t'_{Rn+1} - t'_{Rn}} \right]$$

n : nombre d'atomes de carbone de l'alcane n

t'_{Rx} : temps de rétention réduite du produit X à déterminer

t'_{Rn} : temps de rétention réduite du alcane à n atomes de carbone se trouvant juste avant X.

t'_{Rn+1} : temps de rétention réduite du alcane normal à $n+1$ atomes de carbone se trouvant juste après X.

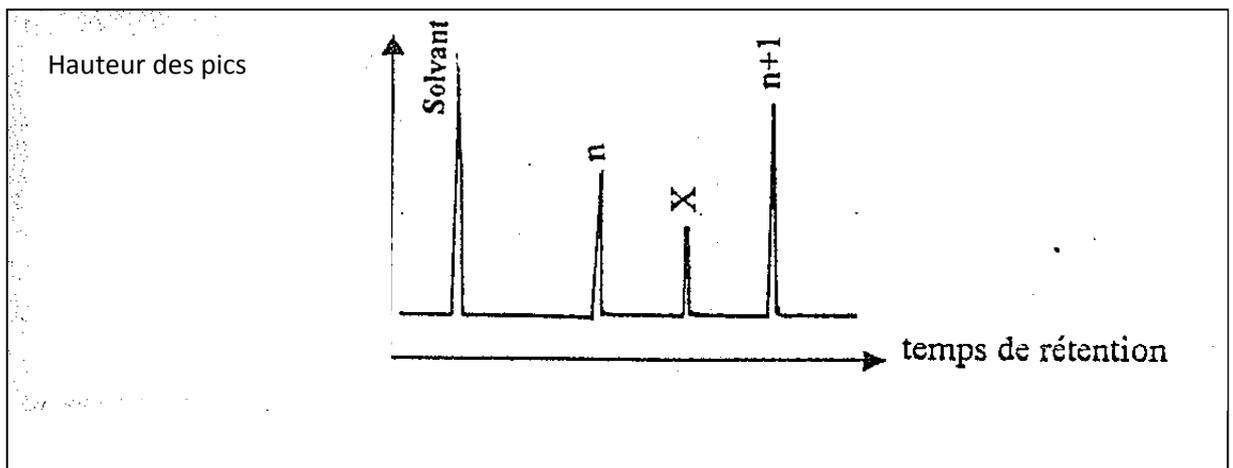


Figure 2.2 : Détermination de l'indice de Kovats à partir d'un chromatogramme [156].

t_0 : temps de rétention du solvant d'injection ou du premier produit non retenu.

t_R : temps de rétention.

2.5.3. Etude des composés non volatils

L'extraction des composés non volatils de la plante sont réalisés à l'aide du soxhlet.

2.5.3.1. Principe

Le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, elles se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant.

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon provoquant ainsi le retour du liquide dans le ballon qui est accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le cycle peut se répéter indéfiniment, jusqu'à épuisement complet du solide, d'où l'efficacité remarquable de cette technique par rapport à la simple macération (Figure 2.3) [176].

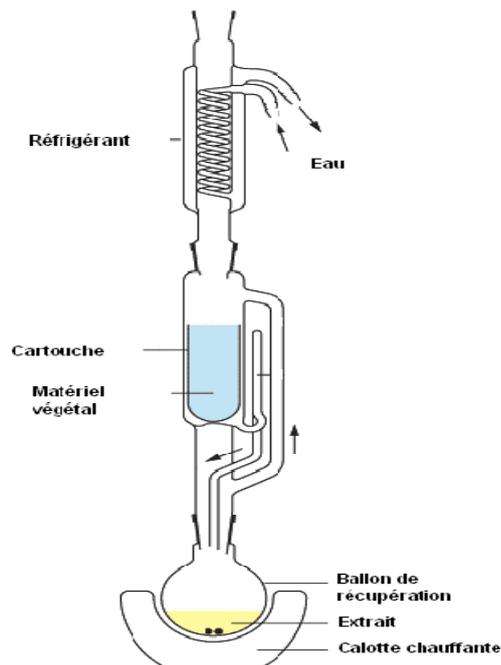


Figure 2.3 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet [176].

2.5.3.2. Conditions opératoires de l'extraction au soxhlet

Nous avons introduire 20 g de fruit séché, préalablement lavé et séché dans une cartouche en papier filtre. Cette cartouche est placée au niveau du soxhlet. Puis nous avons incorporé 250 ml d'éther de pétrole dans un ballon à col rodé à fond plat qui est lui-même placé dans un bain marie et porté à ébullition.

Après une douzaine de siphonages, nous avons récupéré d'une part, le ballon contenant le solvant enrichi en substances solubles (fraction lipidique) [177], et d'autre part la matière végétale contenue dans la cartouche de papier filtre que l'on nommera marc et qu'on laisse sécher à l'air libre.

Le marc récupéré est réintroduit dans une seconde cartouche et soumis à une seconde extraction au soxhlet en utilisant cette fois-ci du méthanol afin de récupérer les substances polaires solubles.

Les résidus secs des deux extractions, à l'éther de pétrole et au méthanol, sont obtenus par évaporation du solvant grâce à un évaporateur rotatif.

2.5.3..3 Rendement de l'extraction

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des substances (Figure 2.7)

On définit le rendement de l'extrait R_e comme étant le rapport entre la masse de l'extrait M_e et la masse de la matière végétale M_{mv} . Il est exprimé en pourcentage par la relation suivante :

$$R_e(\%) = \frac{M_e}{M_{mv}} \cdot 100$$

2.6. Etude biologique de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*

Dans cette partie, nous avons réalisé l'étude de l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*, ainsi que de celle de son huile essentielle. Nous avons également testé l'effet antioxydant de ces extraits.

2.6.1. Activité antimicrobienne de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique de la plante étudiée, a été appréciée par la méthode de diffusion sur milieu gélosée en utilisant des disques stériles appelés aromatoگرامme. Les tests ont été effectués au niveau de laboratoire de microbiologie à l'hôpital de Boufarik.

2.6.1.1. Principe :

La méthode des aromatoگرامmes consiste à déposer un disque en papier absorbant imprégné de la substance à tester sur une boîte de géloseensemencée de culture à étudier.

Cette substance diffuse sur la surface de la gélose à partir du disque et d'un gradient décroissant s'établit autour de ce dernier [178,179] (figure 2.4).

Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à l'efficacité de l'activité antimicrobienne de l'échantillon [180].

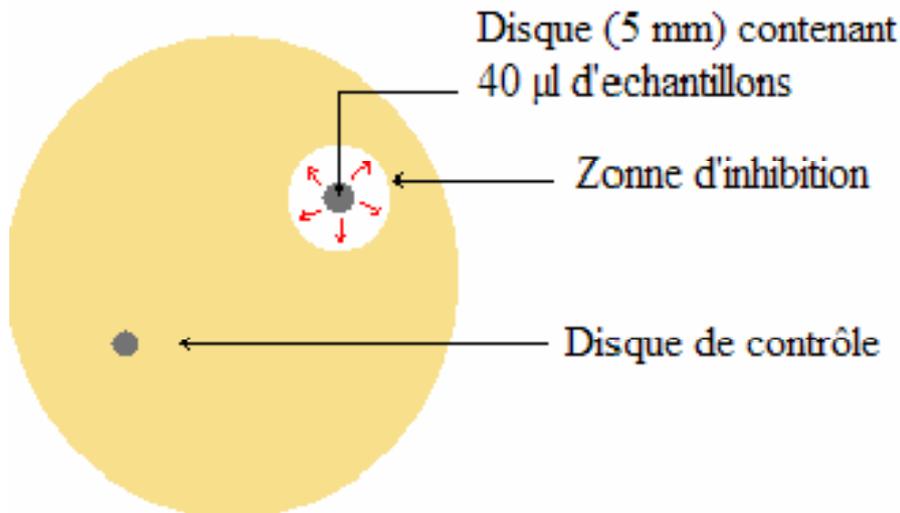


Figure 2.4 : schéma du Test de l'activité anti microbienne [180].

2.6.1.2. Protocole expérimental

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par Dulger et Gonuz, 2004 [181] ; Mohammadi, 2005 [182] ; Parekh et Chanda, 2007 ([183] ; Rota *et al*, 2008 [184] et selon les recommandations de l'OMS suivies par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Boufarik [185].

➤ Les souches de tests

Afin de tester le potentiel antimicrobien des extraits des fruits de la plante étudiée, sept souches microbiennes ont été utilisées. Ces souches utilisées se rencontrent dans diverses pathologies chez l'homme. Ces souches nous ont été gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL, sauf pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui proviennent du laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Boufarik.

Tableau 2.1 : liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.

Nom de la souche	N°ATCC	Gram	Famille
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacillaceae
<i>Basilus cereus</i>	10876	+	Bacillaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	Micrococcaceae
<i>Echerichia coli</i>	25922	-	Enterobacteriaceae
<i>Pseudomonas aerugéiosa</i>	27853	-	Pseudomonadaceae
<i>Klebsiella pneumonie</i>	4352	-	Enterobacteriacee
<i>Condida albicans</i>	24433	/	Cryptococcaceae

➤ **Repiquage des souches**

Les différentes espèces ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 heures pour les bactéries et 24 heures pour les levures, afin d'obtenir une culture jeune des souches testées et des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

➤ **Préparation des milieux de culture**

Selon les méthodes employées et les souches, nous avons utilisés des milieux de cultures, les suivants :

- 1) Gélose nutritive et gélose Muller Hinton pour les Bactéries.
- 2) Gélose nutritive et milieu Sabouraud pour les levures.

Nous avons coulé ces milieux dans des boîtes pétrie posées préalablement sur un plan de travail strictement horizontal, afin de permettre une répartition homogène du milieu de culture de 4mm d'épaisseur, ce qui correspond à une quantité de 20 ml de milieu de culture pour les boîtes de pétrie de 9mm de diamètre.

Les boîtes doivent être convenablement séchées avant l'ensemencement.

➤ **Préparation de l'inoculum**

- A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, nous avons raclé à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et la mettre dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.

- Après une bonne homogénéisation de la suspension bactérienne, son opacité a été mesurée; elle doit être équivalente à 0.5 Mac Farland .L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ **Les produits à tester**

Afin d'explorer le pouvoir antimicrobien des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*, nous avons testé l'effet de l'huile essentielle pure et l'extrait méthanolique qui a été dissous dans le méthanol (1mg/ml).

Pour le contrôle, nous avons utilisé des disques d'antibiotiques prêts à l'usage : Gentamicine- Norfloxacin -Ampiciline- Penicilline G- Cefazoline.

Des témoins sans extrait ont été réalisés avec des disques imprégnés de 3 µl de méthanol.

➤ **Ensemencement**

- nous avons trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis nous l'avons essoré.

- puis nous l'avons frotté sur toute de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même ;

- L'ensemencement se termine en passant l'écouvillon à la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétrie, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des cultures.

➤ **Application des disques**

Les disques de papier ($\varnothing=6\text{mm}$) absorbant contenant 3 μl des extraits à tester (huile essentielle et l'extrait méthanolique), ont été placés sur la surface gélosée sèche, inoculée au préalable par une suspension microbienne pure. Chaque boîte reçoit 3 disques ce qui correspond à 3 répétitions pour chaque espèce.

- l'ensemble des boîtes de pétri est incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.

➤ **Lecture des résultats :**

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques imprégnés des extraits testés. Les résultats de cette activité sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en calculant la moyenne de trois mesures \pm écart type pour chaque test.

2.7. Activité antioxydante

Le test chimique que nous avons utilisé pour évaluer l'activité antioxydante repose sur le principe du pouvoir piégeage du radical DPPH⁺. En général, le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique testés a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (α-tocophérol).

2.7.1. Principe

La capacité de donations des électrons par les huiles essentielles ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH⁺ (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) [186].

Le Diphényle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) [187]. La réaction se résume sous la forme de l'équation (figure 2.5).

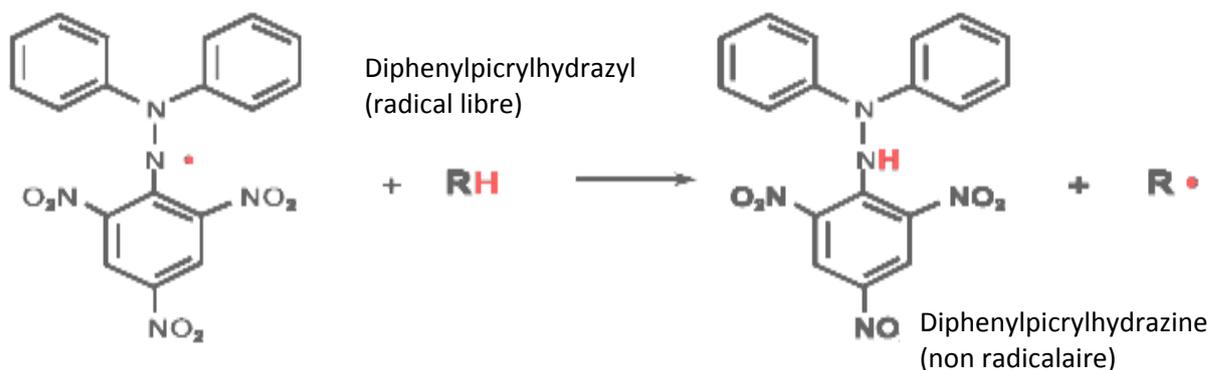


Figure 2.5: Réaction de réduction du DPPH [187].

RH= représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényle picryl hydrazine (jaune).

2.7.2. Mode opératoire :

L'activité de piègeur des radicaux libres a été déterminée par la méthode spectrométrique basée sur la réduction d'une solution méthanolique de DPPH en utilisant la méthode de Blois (Feyza Oke, Belma Aslim,, Sahlan Ozturk and Senol Altundag. , 2009)[188].

➤ Préparation de la solution DPPH :

Le DPPH 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl est solubilisé dans du méthanol absolu pour obtenir une solution de 0.004%.

➤ Préparation des solutions à tester:

Pour le test, les échantillons sont dissous dans le méthanol absolu [189]. Pour tous les échantillons, que ce soit huile essentielle, extrait méthanolique ou standard (*α-tocophérol*) nous préparons des solutions dans du méthanol à différentes concentrations de l'ordre de milligramme par ml (tableau 2.2).

Tableau 2. 2: Concentrations des solutions à tester dans le test antioxydant.

Les échantillons	Huile essentielle	Extrait méthanolique	Antioxydant standard (<i>α-tocophérol</i>)
Concentrations mg/ml	5	0.5	0.05
	10	0.3	0.04
	15	0.2	0.03
	20	0.05	0.02
	25	0.01	0.01
	30	0.005	

	50 75	0.001	0.005
--	----------	-------	-------

➤ **L'essai au DPPH :**

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1 ml de la solution à tester, on ajoute 1 ml de la solution au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. Le blanc est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH (0.004%) et de 1 ml de méthanol.

La lecture s'effectue par la mesure de l'absorbance à 517nm par un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (α – tocophérol) dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons tests.

➤ **Expression des résultats :**

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour l' α -tocophérol. L'activité antioxydante qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicale} = [(Abs \text{ blanc} - Abs \text{ échantillon}) / Abs \text{ blanc}] \times 100.$$

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.

La valeur IC_{50} a été déterminée pour chaque échantillon, est défini comme étant la concentration de l'échantillon qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Les valeurs IC50 sont déterminées graphiquement des trois tests séparés dont l'abscisse représente la concentration des composés testés et l'ordonnée l'activité antiradicalaire en pourcentage [190].

CHAEPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Description botanique

3.1.1. Etude morphologique

Appareil végétatif : C'est un grand arbre qui se caractérise par un tronc très élevé et très ramifié, excepté dans sa partie inférieure, et par un écorce de couleur brune –grisâtre

Nous différencions la variété *horizontalis* (la variété étudiée) à celle *pyramidalis* par la forme du port. Le cyprès *horizontalis* se caractérise par ses branches étalées qui sont disposées en couronne irrégulière, ce qui lui différencie du cyprès *pyramidalis* qui possède des branches dressées formant une couronne effilée (Figure3.1).



Figure3.1 : A) *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* ; B) *Cupressus sempervirens* var *pyramidalis* (original).

Le cyprès horizontalis présente un feuillage dense (Figure 3.2), dont les feuilles sont très petites sous forme des écailles, triangulaires, d'un vert vif, imbriqués sur 4 rangs, recouvrant des ramules irrégulières, appliqués contre le rameau. Les ramules sont courts, terminés en pointe émoussée (Figure 3.3, Figure 3.4).



Figure 3.2 : Vue d'ensemble dun feuillage dense de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* (original).

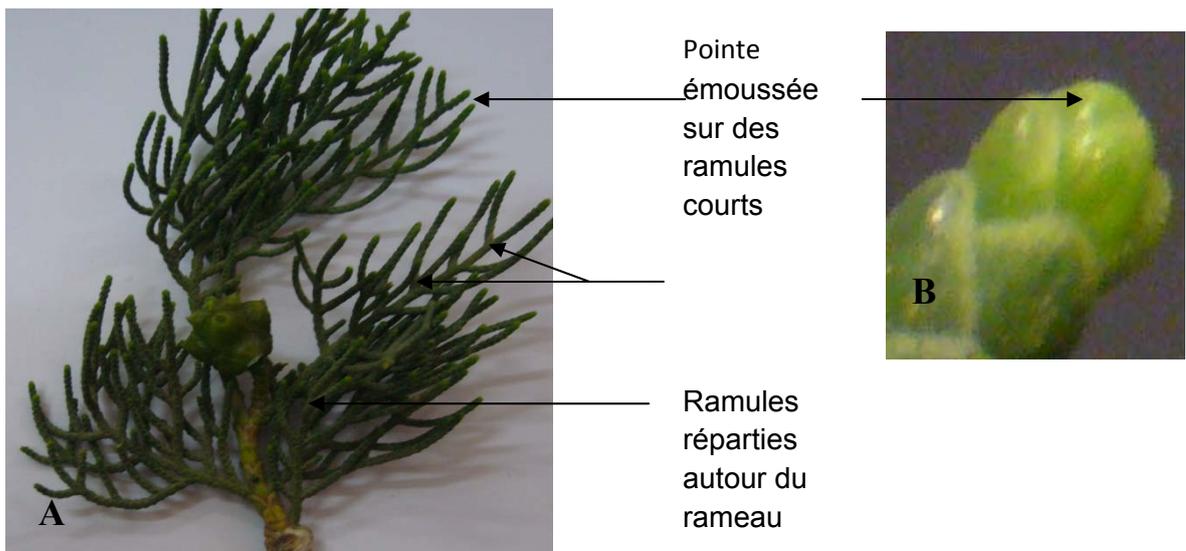


Figure 3.3 : A) Différents types de rameaux de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* ; B) Partie terminale du ramule observé sous loupe (originals).

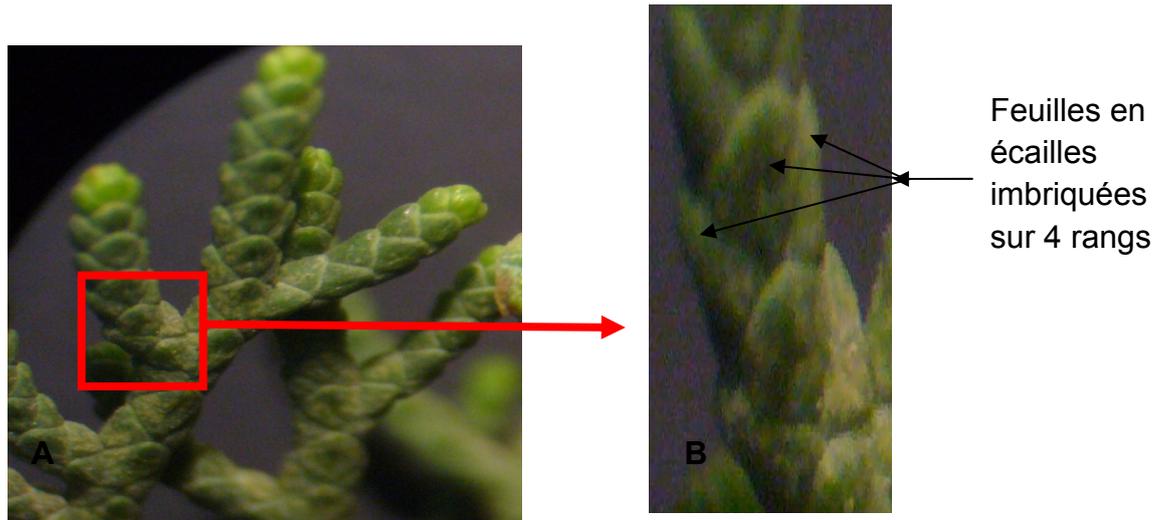


Figure 3.4 : A) et B) Feuilles de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* observées sous loupe (originals).

Appareil reproducteur : Nous retrouvons deux types d'organes reproducteurs qui ne sont pas portés par des fleurs, mais par des cônes. Cette espèce est monoïque : les organes mâles et femelles sont séparés, mais s'épanouissent sur le même pied (Figure 3.5).



Figure 3.5 : Organes reproducteurs de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (original).

les organes reproducteurs mâles forment de petits cônes. Ce sont considérés comme des structures composés. Ce sont de petits cônes jaunâtres , avec une forme cylindrique, sont constitué uniquement d'étamines insérées en spirale sur un petit axe court. Elles portent sur leur face inférieure des grains de pollen (Figure 3.6, Figure3.7).



Figure 3.6 : Cônes mâles de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (original).

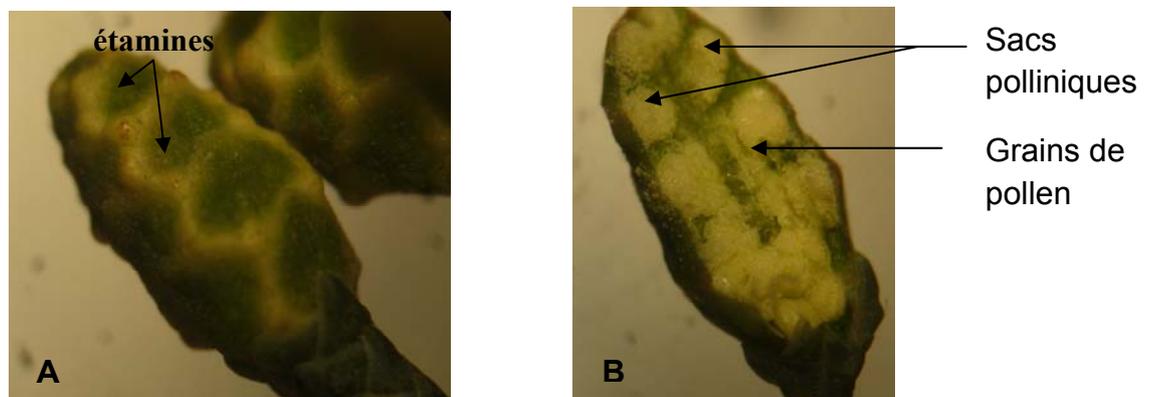


Figure 3.7: A) Cône mâle de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* ; B) Coupe longitudinale au niveau du cône mâle, observés sous loupe (originals).

Les organes reproducteurs femelles sont des petits cônes fructifères. Le cône femelle est un ensembles d'écailles dont chacune correspond à une fleur, ce qui nous a laissé dire que chaque cône femelle est une inflorescence. Ces cônes sont

subglobuleux, verts, brun à maturité, à 12 écailles polygonales jointives au tour d'un axe central, compte-tenu de leurs caractère clos (Figure 3.8).

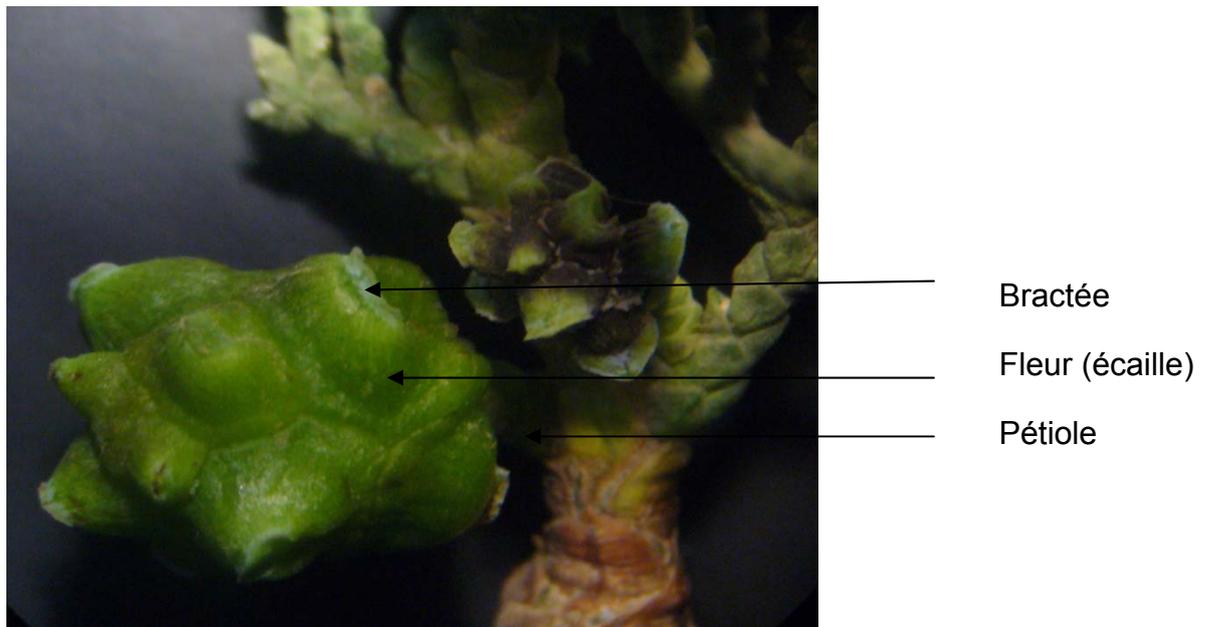


Figure 3.8 : Cône femelle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* observé sous loupe (original).

Les écailles s'insèrent en spirale sur l'axe du cône et chacune est constituée d'une bractée qui est en conrescente avec elle, à l'aisseille de la quelle se trouvent des ovules (Figure 3.9).

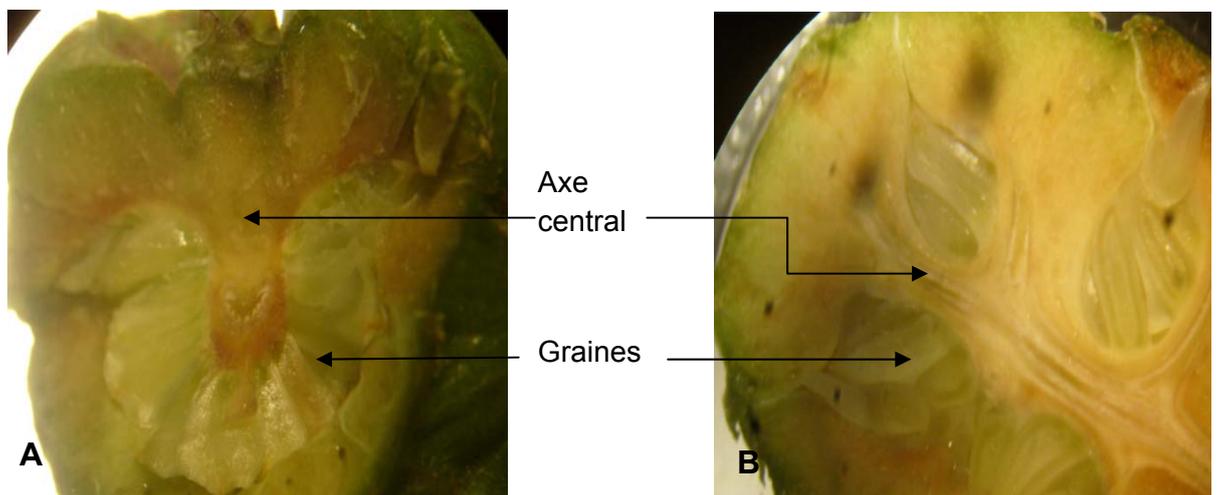


Figure 3.9 : A) Coupe transversale au niveau du cone femelle, B) Coupe transversale de ce cone observé sous loupe (originals).

- le volume de ces cônes accroît durant la maturation (figure 3.10).



Figure 3.10 : Fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* à différentes tailles (original).

Les graines :

Quand les fruits deviennent mûrs, libèrent de très petites graines, de couleur brun clair, et de forme irrégulière.



Figure 3.11: Graines obtenues à partir des cônes mûrs ligneux de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (original).

3.1.2. Etudes histologiques et localisation des sites sécréteurs

➤ **A l'état vital :**

L'observation morphologique des coupes histologiques des cônes femelles à l'état vital (sans double coloration), nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Notre plante présente au niveau des fruits des structures de conductions : faisceaux cribrovasculaires, de soutien : des fibres de sclérenchymes, et de sécrétion de type canaux excréteurs (Figure 3.12) . Ces canaux sont bien

observés dans les coupes longitudinales sous forme de cavités allongées, et ceci confirme la structure des ces éléments de sécrétion (Figure 3.13).

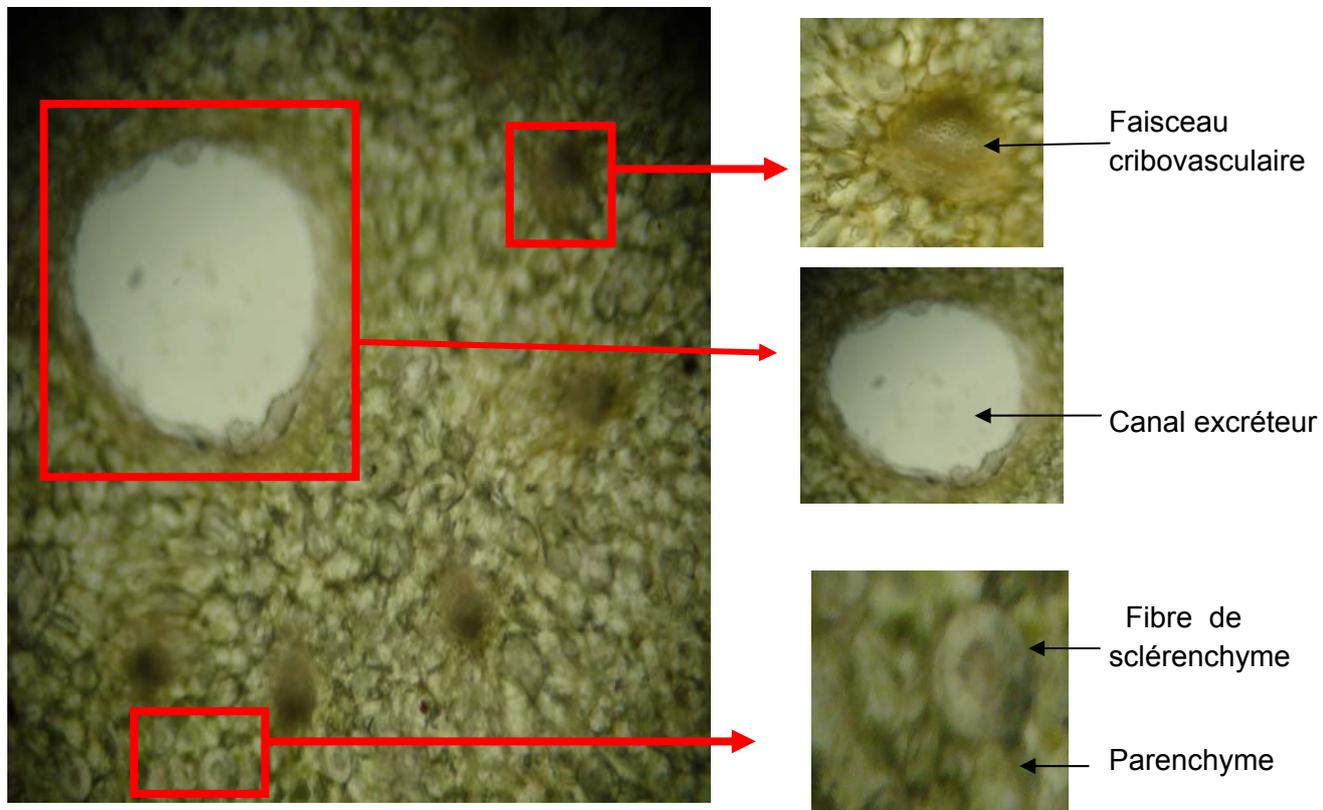


Figure 3.12: Coupe transversale au niveau du cône femelle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (état vital) (original).



Figure 3.13 : Coupe longitudinale au niveau du canal sécréteur au niveau du cône femelle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* observé sous MP×100 (original).

-Dans nos coupes qui ont été faites entre deux écailles, nous remarquons l'existence d'une structure spécifique qui relie les écailles entre elles (Figure 3.14).



Figure 3.14 : A) Deux écaillées observées sous loupe ; B) Observées au MP×40 (originals).

➤ **Avec double coloration :**

Pour une meilleure localisation des structures particulières (de soutien, de sécrétion), des coupes histologiques minces ont été accomplies par la technique de double coloration et ce en parallèle avec des observations microscopiques au niveau non seulement des fruits objet d'étude, mais aussi au niveau des feuilles et des tiges, c'est pour un bon savoir pour cette plante.

Le Cône femelle qui joue le rôle de fruit de cyprès, présente de la périphérie vers le centre (figure 3.15):

- **Un épiderme** qui contient de nombreux stomates. Ces stomates possèdent deux cellules stomatiques qui entourent un ostiole (figure 3.16).

- **Un parenchyme** qui est tapissé par des **fibres de sclérenchymes**. Ces fibres se caractérisent par des parois secondaires et une lumière cellulaire au centre. Les ponctuations qui se trouvent dans le plan des coupes se présentent comme minces canaux traversant la paroi secondaire (figure 3.19).

- **Des canaux excréteurs** situés proches de l'épiderme et sont distribués irrégulièrement dans le parenchyme. Elles sont constitués par des cellules sécrétrices tapissant la paroi interne d'un canal cylindrique dans lequel s'écoule et s'accumule l'oléorésine. (figure 3.17)

-**tissu conducteur** qui se caractérise par la structure secondaire : dont le bois est de type homoxylé composé d'une seule sorte d'éléments, des **trachéides**. Les tracheides sont des cellules allongées dans le sens de l'axe de l'arbre, de section quadrangulaire. Elles présentent des ponctuations aréolées pour assurer la communication entre les trachéides. malheureusement, nous n'avons pas pu observés les ponctuations dans non coupes. Cependant, nous observons l'apparition parmi les fibres de trachéides des cellules de **parenchyme ligneux** (figure 3.18).

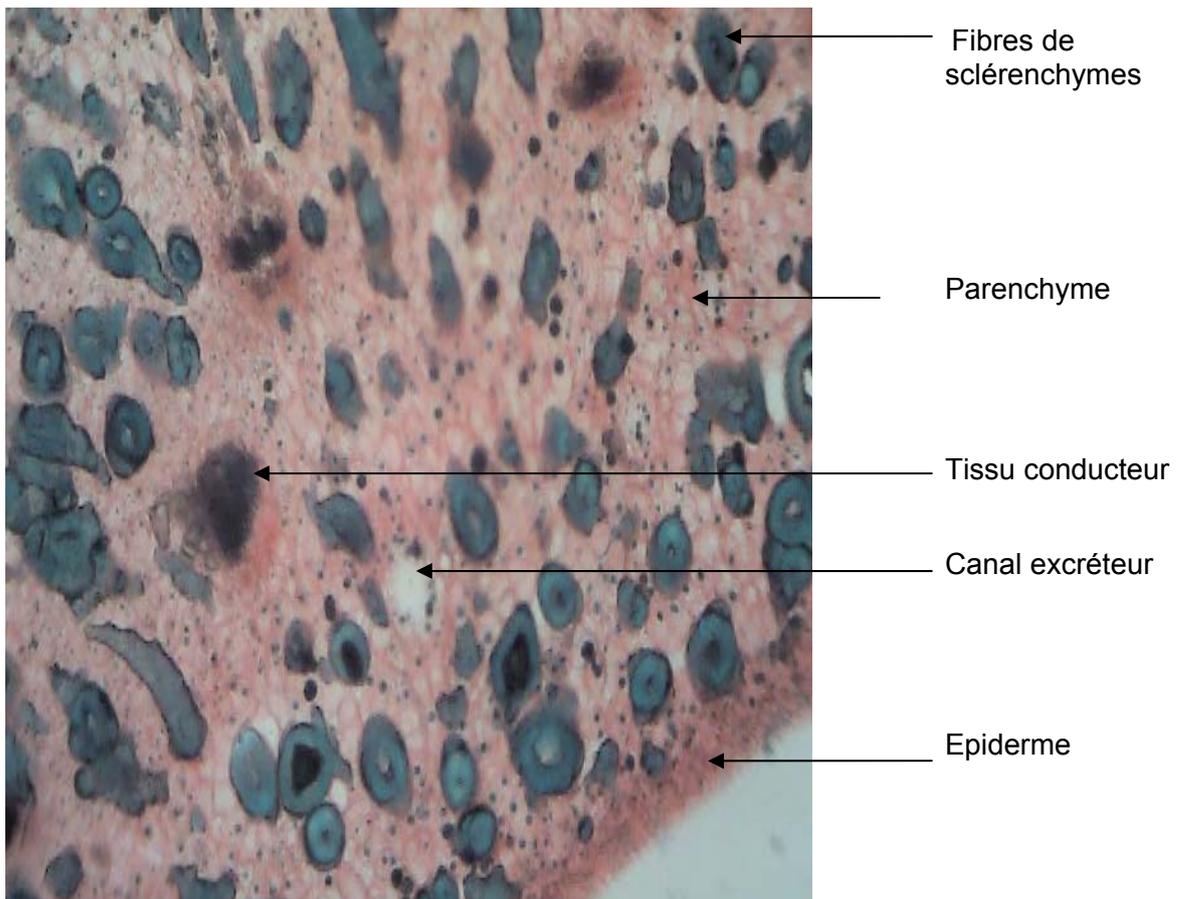


Figure 3.15: Coupe transversale au niveau d'un cône femelle avec double coloration MP×40 (original).

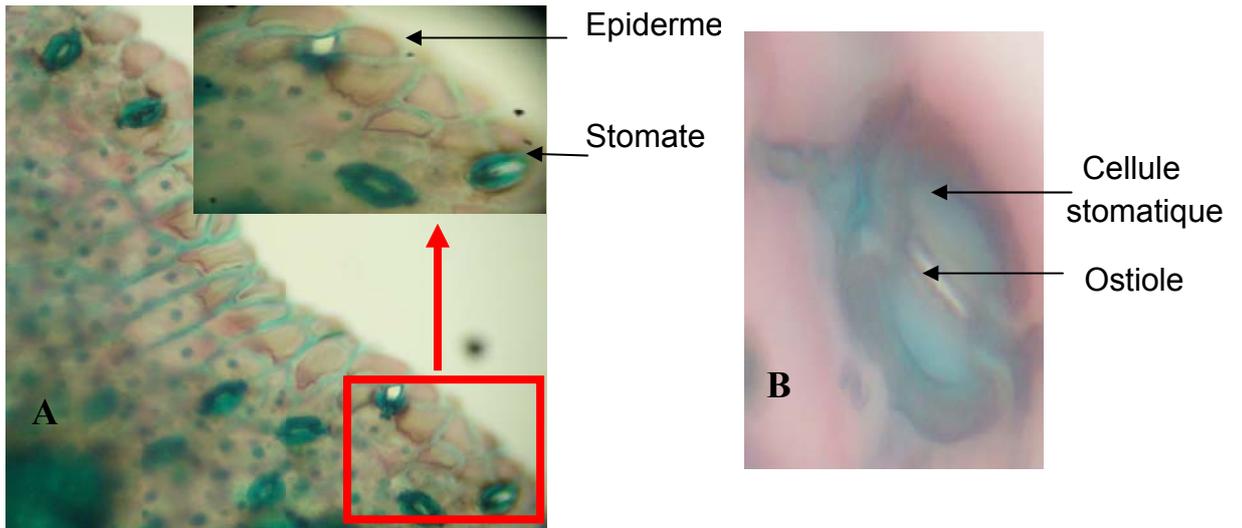


Figure 3.16 : A) Epiderme du cône femelle ; B) Structure d'une stomate au MP×400 avec double coloration (original).

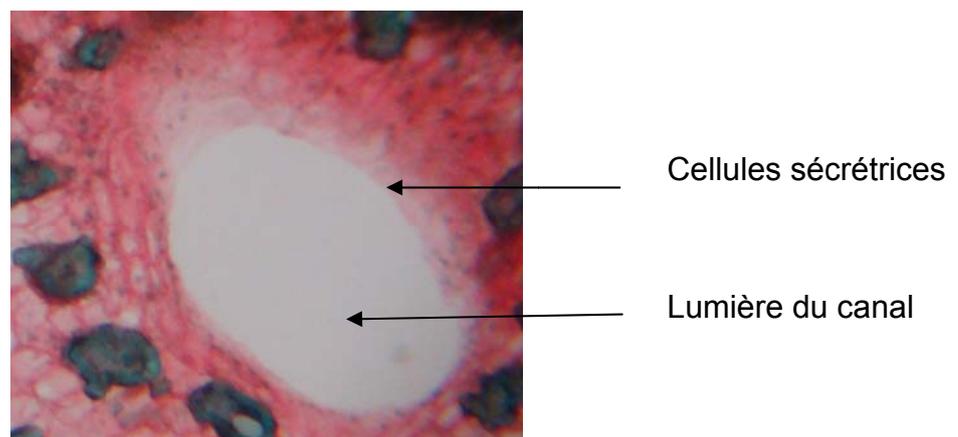


Figure 3.17: Canal excréteur observé au MP×40 (original).

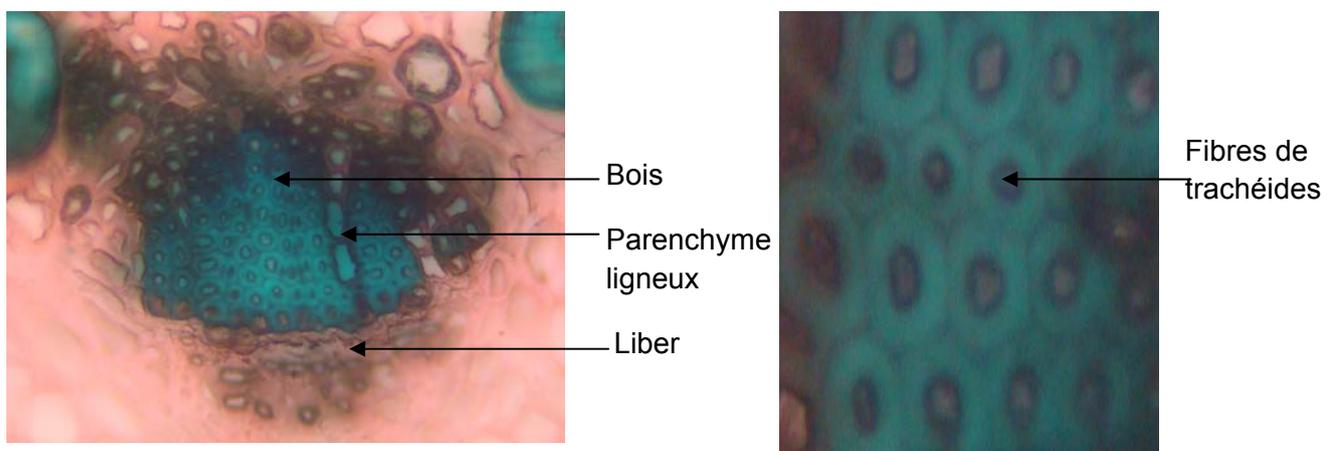


Figure 3.18 : A) Tissu conducteur au niveau d'une coupe transversale d'un cône femelle MP×100; B) fibres de trachéides au MP×400 (originals).

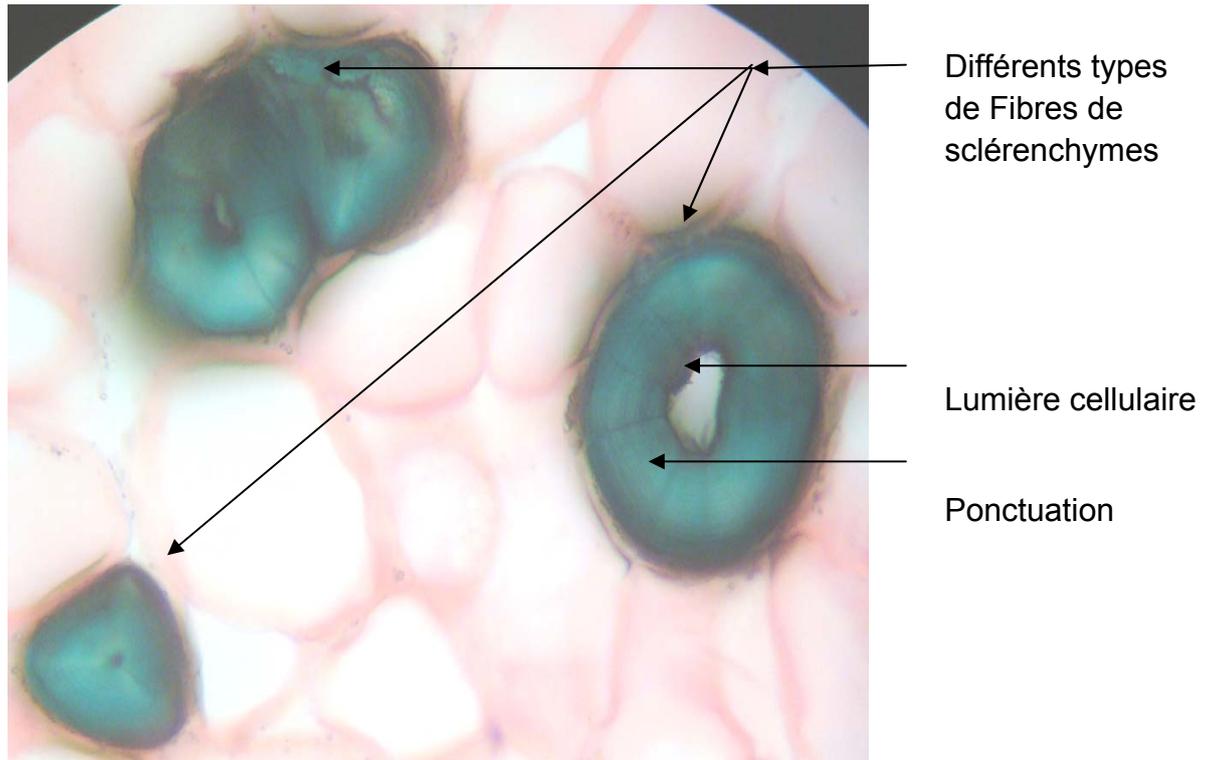


Figure 3.19: Fibres de sclérenchymes au niveau d'une coupe transversale d'un cône femelle au MP×100 avec double coloration (original).

Les feuilles :

La coupe transversale dans une écaille montre qu'elle est constituée de tissus différenciés :

- Une cuticule qui protège et imperméabilise la surface des écailles ;
- Un épiderme protecteur en périphérie, est muni de stomates qui assure les échanges ;
- Un seul canal excréteur existant au sommet du faisceau cribro-vasculaire ;
- Un parenchyme pallissadique vers la face inférieure, et un parenchyme médullaire vers la face supérieure;
- Un sclérenchyme qui se situe de part et d'autre d'un tissu conducteur (il existe un seule tissu conducteur au milieu de la feuille).

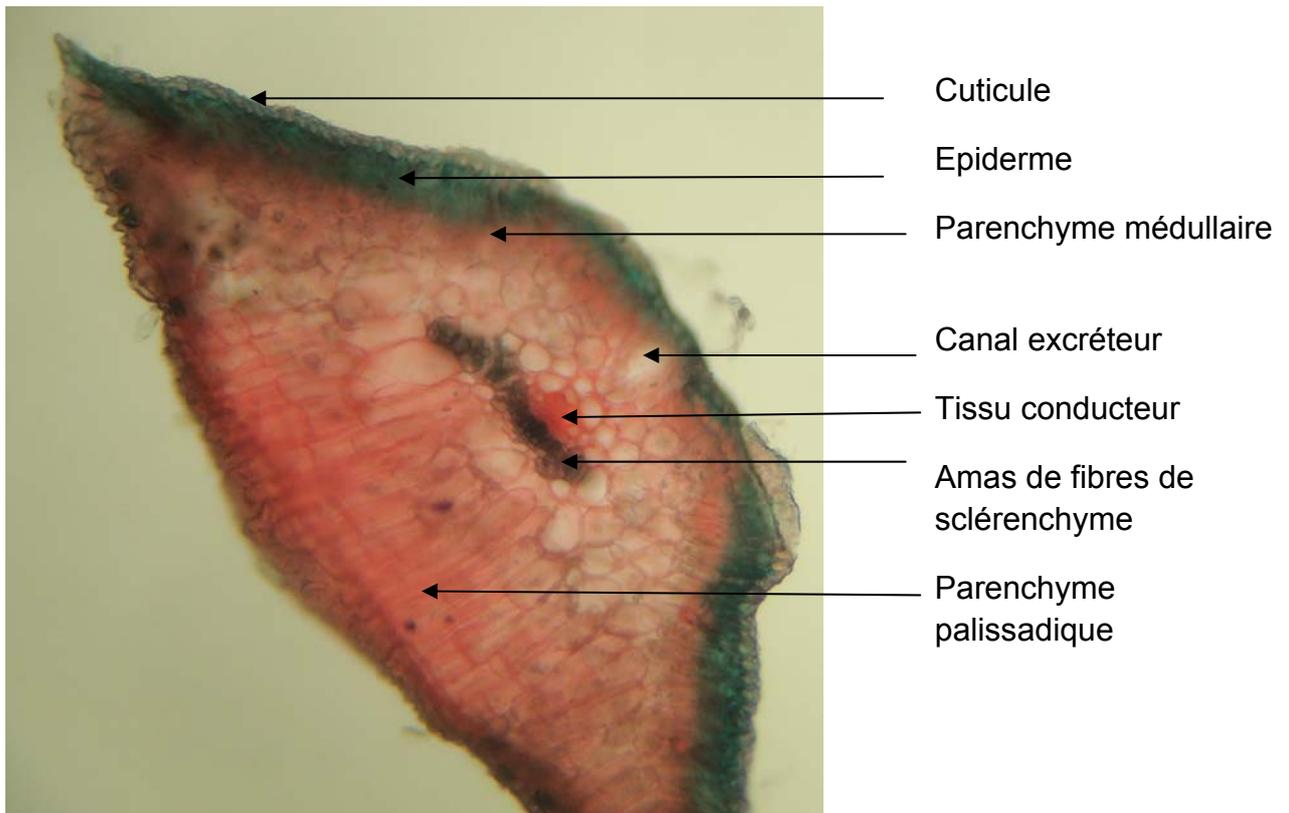


Figure 3.20: Coupe transversale d'une feuille de *cupressus sempervirens* var *horizontalis* au MP×40 avec double coloration (original).

les tiges : La coupe transversale d'une tige montre de l'extérieur vers l'intérieur :

-Une couche subéreuse, sous la quelle se trouve des canaux excréteurs de différentes tailles.

Parenchyme corticale.

-Tissu conducteur, constitué vers l'extérieur par le liber qui contient des fibres extra-xylémiennes qui sont présentés en minces bandes alternant régulièrement avec d'autres éléments du liber ; en coupe, elles apparaissent de forme rectangulaires, avec une lumière cellulaire très réduites. Et vers l'intérieur le bois homoxylé qui constitue essentiellement des trachéide, en plus des rayons ligneux appelé souvent rayon médullaire, dont l'épaisseur en section tangentielle est ordinairement d'une seule cellule (rayons unisériés).

-Au centre se trouve le parenchyme médullaire où se trouve le xylème primaire.

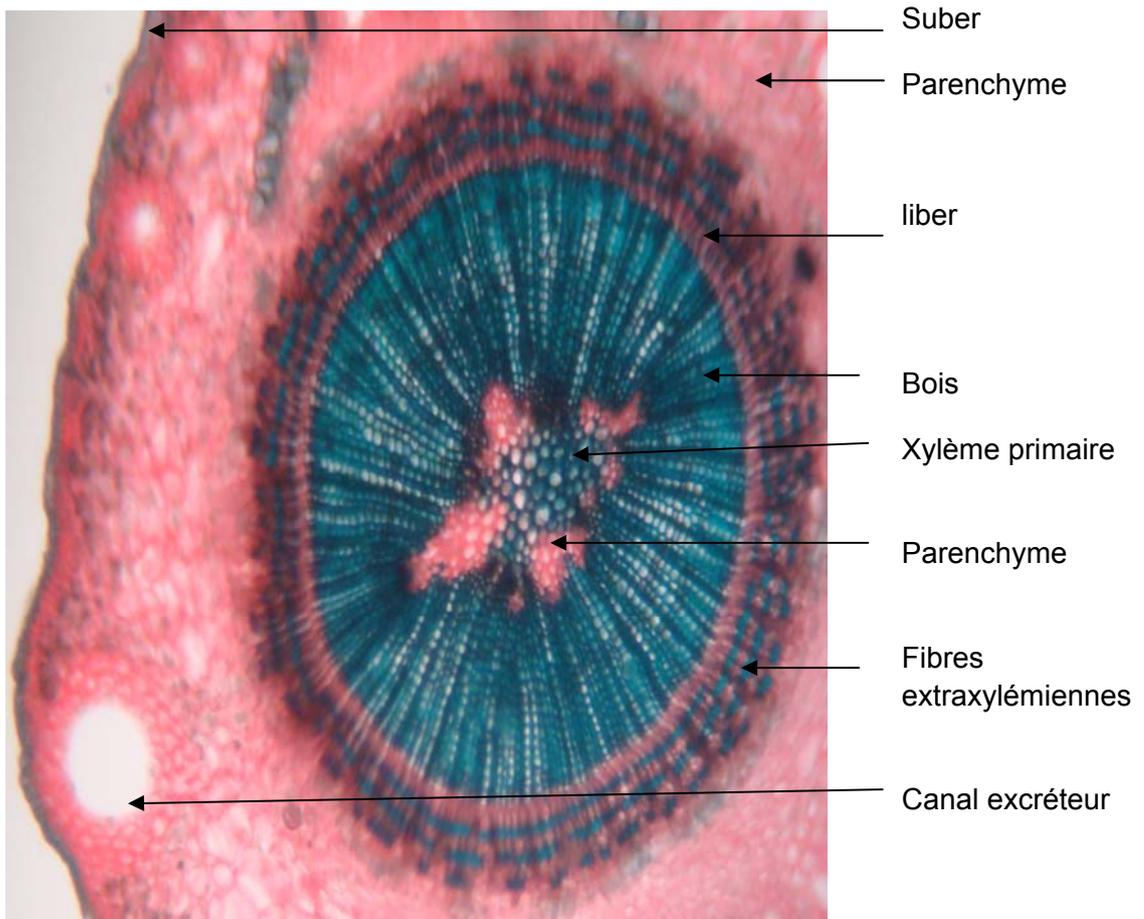


Figure 3.21: Coupe transversale d'une tige de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* au MP×40 avec double coloration (original).

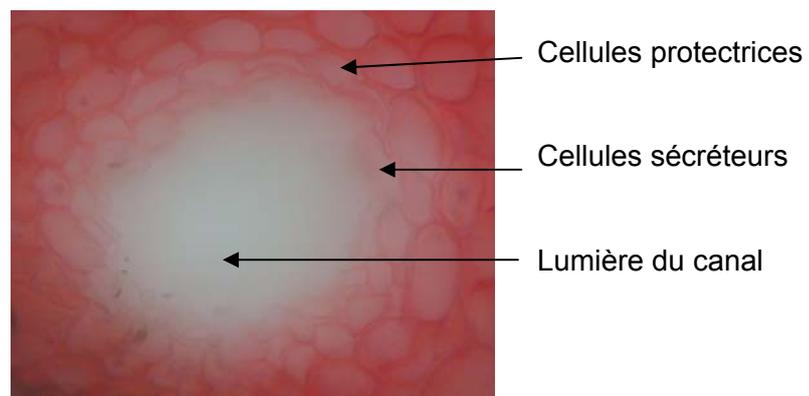


Figure 3.22: Structure du canal excréteur au MP×400 avec double coloration (original).

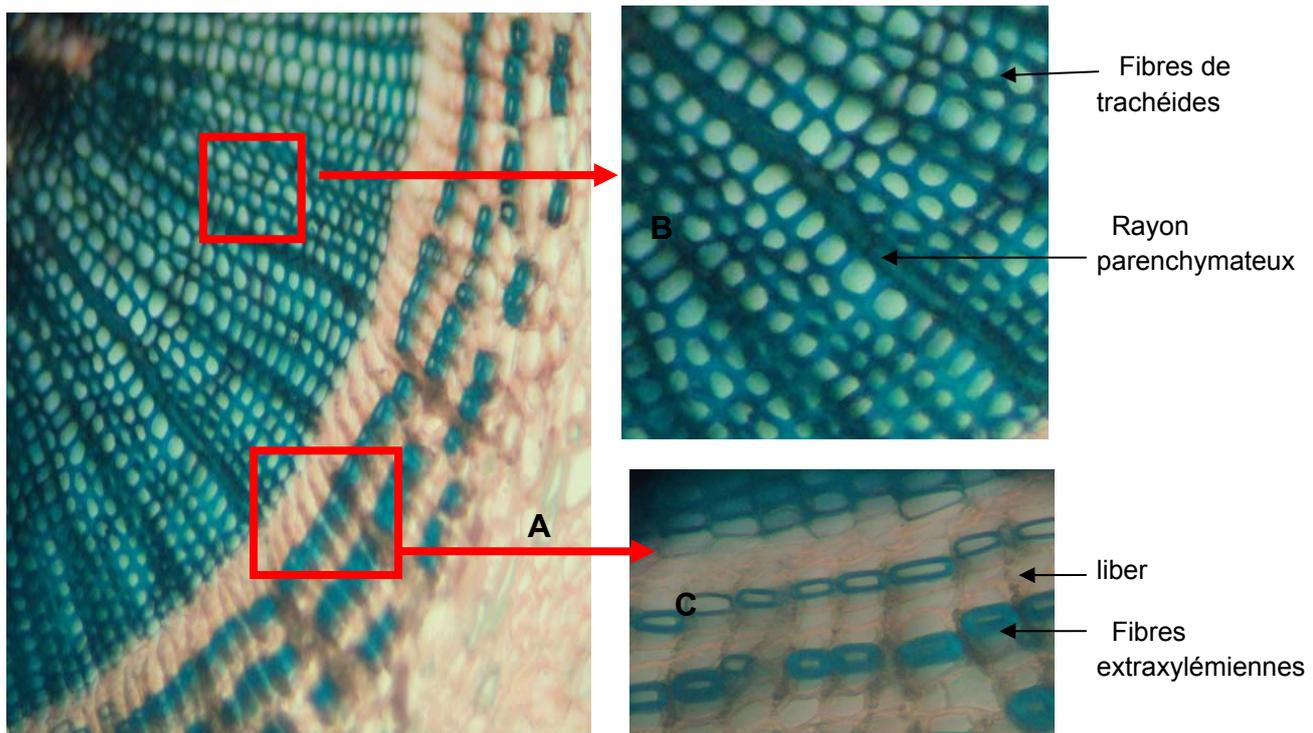


Figure 3.23 : A) Coupes transversales au niveau des tissus conducteurs au MP×100, B) Bois au MP×400 ; C) liber au MP×400 (avec double coloration) (original).

- Des coupes longitudinales montrent la structure des trachéides qui sont de type aréolés

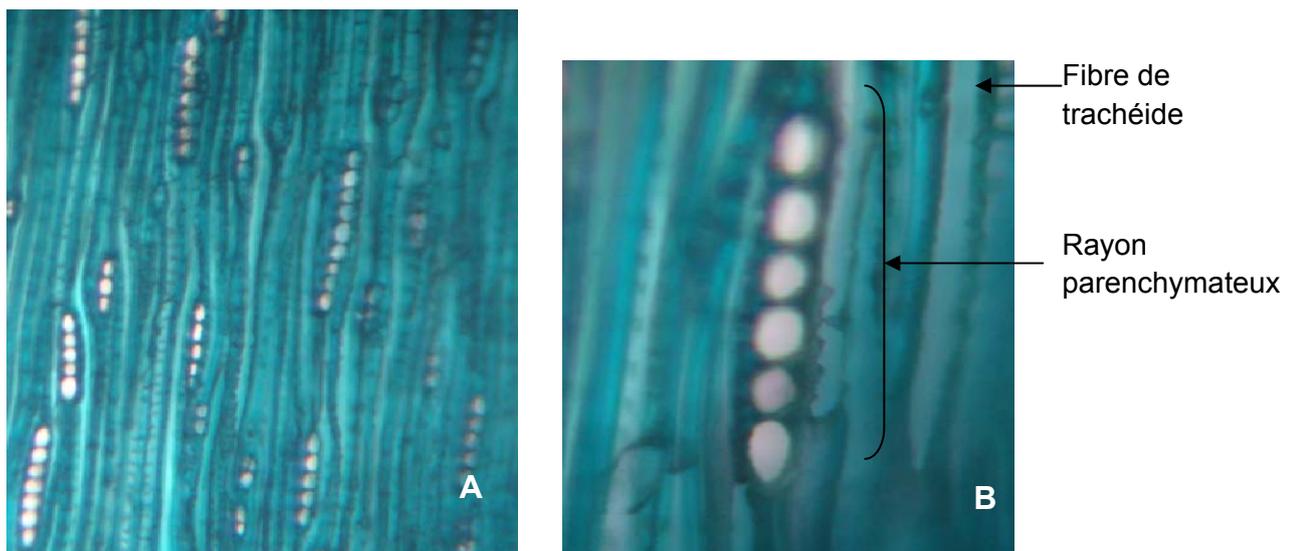


Figure 3.24: Bois en coupes tangentielles des tiges de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* dont A) observé au MP× 100 et dans B) observé au MP×400(original).

3.2. Détermination de la teneur en matière sèche

De par leur richesse en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau [191]. La détermination de la matière sèche et la teneur en eau sont mesurées par séchage jusqu'à obtention une masse constante dans une étuve à 60°C. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1: Résultats des pesées de *Cupressus sempervirens L. var horizontalis* après dessiccation pendant 96h.

Prise d'essai (g) (j_0) plante fraiche	Pesée j_1 (24h)	Pesée j_2 (48h)	Pesée j_3 (72h)	Pesée j_4 (96h)	Teneur en eau en % de poids frais
12,9185	4.8110	4,811	4,6871	4,6387	64.0925
14,9003	5.6117	5,4554	5,4098	5,3901	63.8255
13,5389	5.0169	4,8843	4,8438	4,823	64.3767
14,3597	5.4970	5.3387	5.2953	5,2748	63.2666
13,358	5,2593	5.1148	5.0708	5,0438	62.2413

Les résultats ont révélé une teneur moyenne en eau de $63.56\% \pm 0,84352$, ce qui correspond à plus de la moitié du poids des cônes frais (Figure 3.25), le reste représente la matière sèche ($36.47\% \pm 0,7582$).

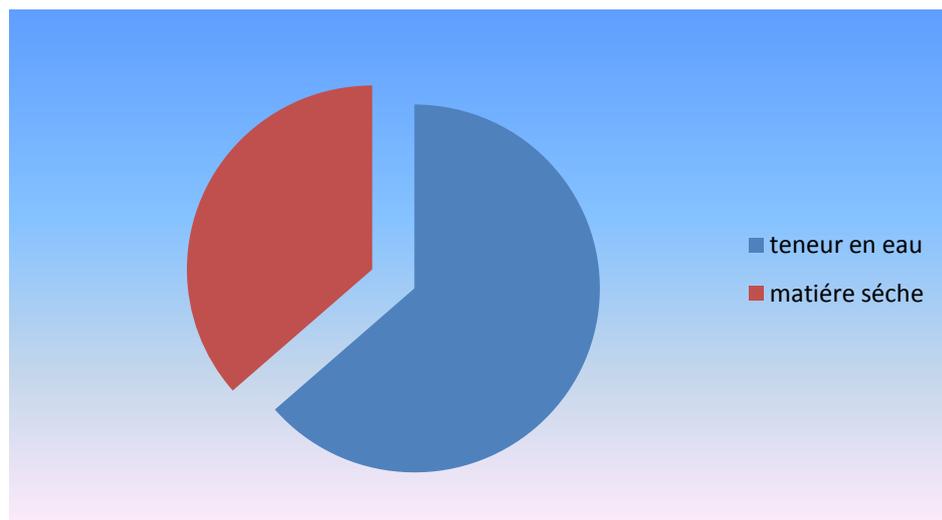


Figure 3.25 : Teneur en eau et en matière sèche des fruits frais de *Cupressus sempervirens var horizontalis*.

3.3. Détermination de la teneur en cendres

Le taux des cendres nous renseigne sur la quantité totale en sels minéraux présents dans les fruits de cyprès horizontalis. Le reste est constitué de matières volatiles et combustibles à cette température.

La calcination totale d'une prise d'essai de 2 g de poudre végétale nous a permis d'obtenir les résultats consignés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Teneur en cendres totales de la poudre des fruits de cyprès *horizontalis*.

Poids de la capsule d'incinération (g)	Poids de la prise d'essai (g)	Poids de la capsule + cendres (g)	Taux des cendres %
16.4436	2.0017	16.5532	5.47
52.1535	2.0006	52.2613	5.38
66.4321	2.0011	66.5461	5.69

Les résultats font ressortir un taux moyen de cendres de $5.51\% \pm 0.1594$, ce qui représente la fraction minérale du fruit. Ces valeurs indiquent que les fruits de cyprès *horizontalis* sont riches en matières organiques ($94.49\% \pm 0.1594$).

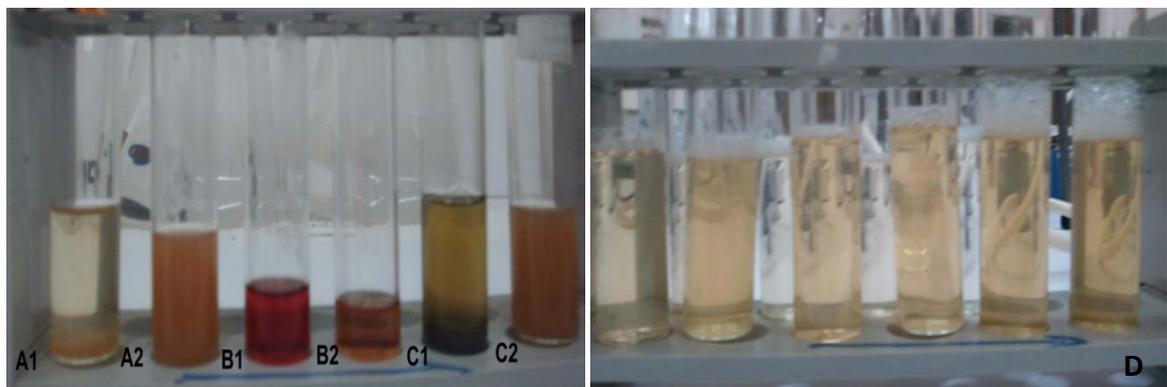
3.4-Etudes des principes actifs

3.4.1. Réactions de caractérisation de la plante

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* nous a permis d'obtenir des résultats consignés dans le tableau 3.3 et la figure 3.26.

Tableau 3.3: Résultats des réactions en tubes sur la poudre des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*.

Familles chimiques	Observations	Résultats
Tanins	Coloration verdâtre	Présence de tanins cathéchiques
flavonoïdes	Coloration orange	Présence de flavonoïdes
saponosides	Im= 166.66	Im=166.66
mucilages	Précipité floconneux	Présence de mucilage



Légende :

Test de mousse: A1: tube de tests

A2 : témoin

Test des flavonoïdes: B1: tube de test

B2 : témoin

Test des tanins: C1: tube de test

C2: témoin

Test des saponosides: D

Figure 3.26: Réactions de caractérisation de la poudre des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* (photo).

L'ensemble des réactions en tubes montre que celle relative aux tanins a été la plus franche avec une prédominance des tanins cathéchiques. Ces réactions ont mis en évidence également la présence des saponines en abondance, et des flavonoïdes dans les fruits. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par

Emmami et al., (2006) [192] et **Emammi et al ., (2007)** [193] sur les fruits de la même variété.

3.4.2. Etudes des composés volatiles

3.4.2.1. Rendement de l'extraction

L'huile essentielle extraite à partir de la matière végétale fraîche par hydrodistillation, se caractérise par une faible teneur de l'ordre de 0.4%. Ce rendement est le même que celui rencontré par **Emmami et al., (2006)** sur une même variété d' Iran (192) et il est voisin de ceux trouvée par **Emmami et al., (2007)** (0.38%) [193] et **Maldan et al., (1997)** (0.45%) [161].

3.4.2.2. Caractérisation de l'huile essentielle

a)-Caractéristiques organoleptiques :

Les caractères organoleptiques d'une huile essentielle sont liés à la composition de l'huile, étant donné que la plupart des constituants volatils de cette dernière sont odoriférants (tableau 3.4).

Tableau 3.4. : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis*.

Caractéristiques	Description de l'huile essentielle étudiée	Description selon la littérature [197,198]
Aspect	liquide	Liquide
Couleur	Incolore	Incolore ou faiblement jaunâtre
Odeur	Boisée, puissante de résine	Balsamique et boisée
Saveur	Piquante, amère	Acerbe, amère, très prononcé

b)-Caractéristiques physico-chimique :

Les propriétés physico-chimiques constituent des données utiles pour son appréciation tant sur le plan économique et scientifique. Ainsi, elles sont considérées comme un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Nos essais sont réalisés selon un protocole précis et déterminés par des méthodes normalisées **AFNOR** (Tableau 3.5).

Tableau 3.5: Les indices physicochimiques de l'huile essentielle étudiée.

Paramètres	Résultats	Méthodes
L'indice d'acide	1.68	Titrimétrie
L'indice de saponification	262.12	Titrimétrie
L'indice d'ester	15.73	Titrimétrie
L'indice de réfraction	1.46	Réfractométrie
Densité	0.86	Pycnomètre

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide indique le taux d'acides libres, il permet de d'évaluer l'état de détérioration d'une huile essentielle. Un indice d'acide inférieur à 2 (faible quantité d'acides libres) correspond à une bonne conservation de l'essence [194]. Nos résultats ont montré que cet indice est relativement faible, prouvant ainsi que l'huile essentielle est stable et ne provoque pas d'oxydation. En effet, l'huile en s'oxydant se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acide. L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes entraîne un indice élevé. Selon **Kanko et al., (2004)**[194] le faible indice de réfraction de l'huile essentielle

indique sa faible réfraction de la lumière ce qui favorise son utilisation dans les produits cosmétiques. L'huile essentielle de notre plante présente un faible indice de réfraction, ce qui s'explique probablement par sa faible teneur en monoterpènes oxygénés.

La valeur du taux de saponification indique le poids moléculaire moyen, plus l'indice de saponification est élevé plus la masse molaire est faible [195]. Nos résultats ont montré que l'huile essentielle étudiée présente un indice très élevé.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire cependant insuffisante pour caractériser une 'huile essentielle. Il est donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

3.4.2.3. Analyse qualitative et semi quantitative de l'huile essentielle par CG/MS

L'analyse par CG/MS de l'huile essentielle des fruits de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* selon les conditions opératoires citées précédemment a fourni 50 pics dont 46 ont été identifiés (84%) (Figure 3.27).

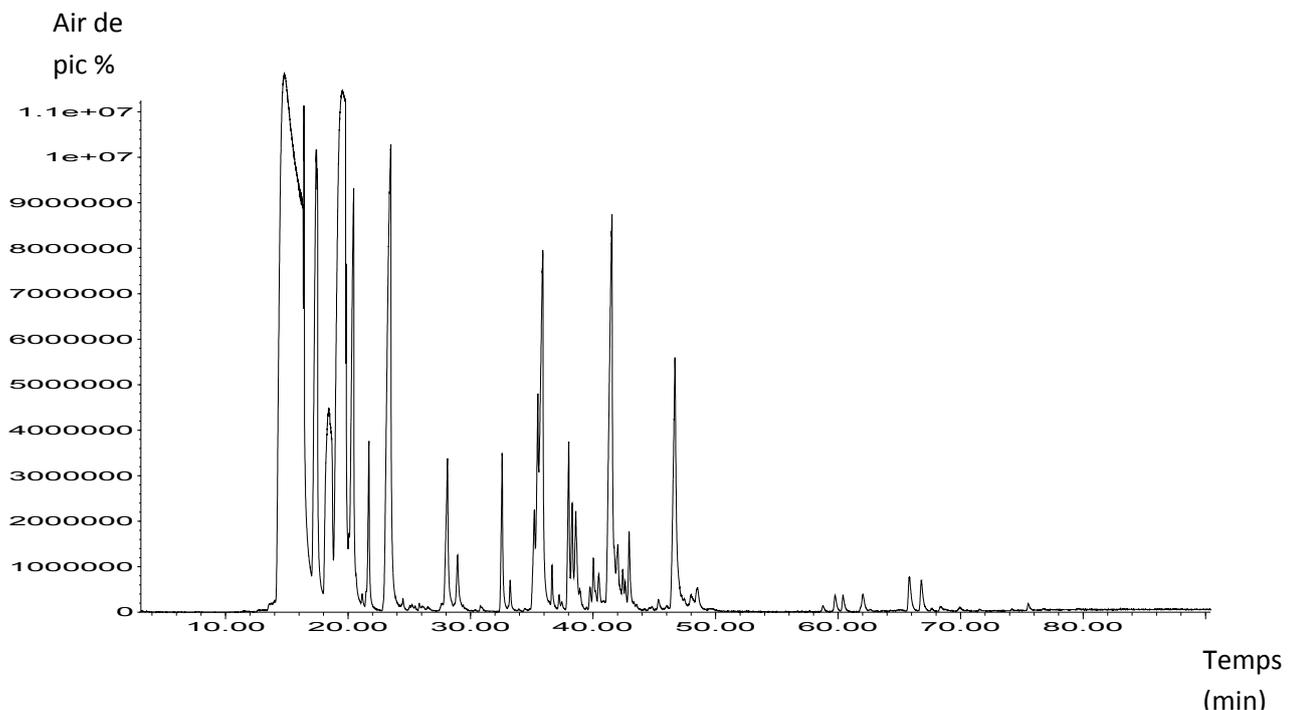


Figure 3.27 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*.

L'identification des composés de l'huile essentielle par CG/MS s'est basée essentiellement sur la comparaison du spectre de masse de la molécule inconnue et par leur IK calculé avec le type de colonne capillaire HP5-MS à celui d'un composé pur fourni par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse (Tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis*.

N°	Composé	TR(min)	%	IK	Qual
1	α-Pinène	14.8	36.05	931	96
2	β-Phellandrène	17.42	5.92	977	91
3	β-Myrcène	18.43	4.51	995,	80
4	3-Carène	19.55	15.90	1016	96
5	Limonène	20.41	4.36	1032	96
6	4-Carène	21.16	0.12	1046	97
7	δ -terpinène	21.69	1.05	1055	94
8	α-terpinolène	23.44	6.63	1088	97
9	Non identifié	24.48	0.09	1107	50
10	Trans-p-menth-2-en-1ol	25.22	0.07	1122	95
11	Non identifié	25.47	0.02	1127	60
12	Camphor	25.83	0.04	1134	97
13	Non identifié	26.09	0.03	1139	25
14	terpinen-4-ol	28.10	1.44	1179	95
15	α -terpinèol	28.94	0.58	1195	94
16	Thymol methyl ether	30.82	0.05	1239	90
17	Bornyl acétate	32.57	0.94	1281	98
18	Tricyclène	33.23	0.21	1297	87
19	Tricyclène	35.21	0.75	1337	87
20	α- Cubebène	35.49	1.47	1343	98
21	Terpinyl acétate	35.86	3.95	1350	91
22	Copaène	36.66	0.28	1366	99
23	Gamma-murolène	37.23	0.09	1377	96
24	B-Elemène	37.45	0.07	1382	97
25	(+)-Longifolène	38.01	1.01	1393	99
26	Cedrène	38.29	0.68	1398	95
27	B-Caryophyllène	38.59	1.00	1405	99
28	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrène	39.76	0.15	1432	72
29	α -caryophyllène	40.03	0.41	1438	98
30	B-cubebène	40.47	0.29	1449	94
31	Germacrène D	40.82	0.10	1457	97
32	Germacrène D	41.51	4.89	1473	96

33	Isoledène	42.01	0.67	1484	97
34	α -Terpinène	42.43	0.41	1494	81
35	(+)- Δ -Cadinène	42.95	0.66	1507	97
36	Nerolidol	44.81	0.05	1556	90
37	Caryophyllène oxide	45.35	0.10	1571	72
38	Epiglobulol	46.01	0.05	1588	47
39	Cédrol	46.68	3.06	1606	94
40	Tau.-cadinol	48.00	0.21	1641	99
41	α -cadinol	48.51	0.28	1655	93
42	Non identifié	58.77	0.05		35
43	Manoyl oxide	59.76	0.15		91
44	Non identifié	60.41	0.14		72
45	Epi-manool	62.03	0.18		86
46	Non identifié	65.82	0.35		30
47	Non identifié	66.81	0.31		83
48	Non identifié	68.38	0.06		46
49	Totarol	69.94	0.04		99
50	fleximel	75.54	0,05		90
	Total identifié		84		
	Monoterpènes hydrocarbonés		24		
	Monoterpènes oxygénés		14		
	Sesquiterpènes hydrocarboné		26		
	Sesquiterpènes oxygéné		12		
	Diterpènes oxygéné		8		
	Non identifié		8		

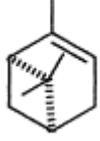
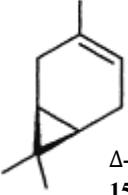
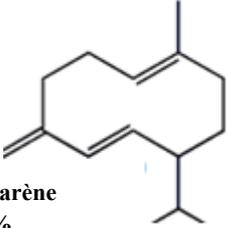
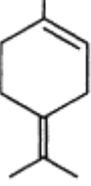
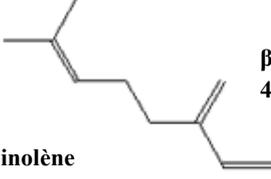
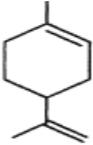
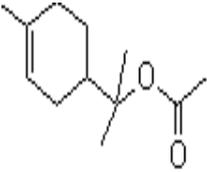
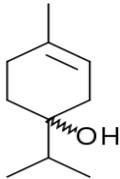
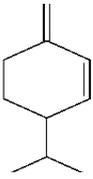
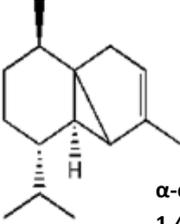
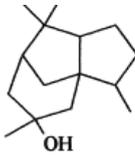
Les composés sont classés en ordre de leur élution sur la colonne HP5-MS en utilisant des homologues des séries de n-alcanes.

TR : temps de rétention.

IK : indice de Kovats relatifs aux n-alcanes - sur la colonne HP5-MS.

Le tableau suivant présente les 11 composés majoritaires, il s'agit du α -pinène (N°1; 36.05%) qui est le premier composé majoritaire, suivi de Δ -3-carène (N° 4; 15.90%) qui représente le deuxième composé important. Les autres composés majoritaires sont α -terpinolène (N°8 ; 6.63%), B-phellandrène (N°2; 5.92%), germacrène-D (N° 32; 4.89%), β -myrcène (N° 3; 4.51%), limonène (N°5 ; 4.36%), terpinyl acétate (N°21, 3.95%), et cédrol (N°39 ; 3.06%), α -cubebène (N°20 ; 1.47%) et terpinène-4-ol (N°14 ; 1.44%).

Tableau 3.7: Composés majoritaires, proportions et familles.

Composés	Proportions	Familles
	α-pinène 36.05%	Hydrocarbures monoterpéniques
	Δ-3-carène 15.9%	
	Germacrène-D 4.89%	
	α-terpinolène 6.63%	
	β-myrcène 4.51%	
	Limonène 4.36%	Monoterpènes Oxygénés
	Terpinyl-acétate 3.95%	
	Terpinen-4-ol 1.44%	
	B-phellandrène 5.92%	
	α-cubébène 1.47%	Hydrocarbures sésquiterpéniques
	Cédrol 3.06%	Alcool sésquiterpénique

D'après ces résultats, il apparaît que l'huile essentielle des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* se caractérise par un équilibre entre les composés monoterpéniques et sésquiterpéniques, avec existence de quelques composés diterpéniques.

Nous remarquons que parmi les 38% des composés monoterpéniques et 63.16% de ces composés sont des hydrocarbures en particulier : α -pinène, Δ -3-carène, α -terpinolène, Germacrène-D, B-myrcène, Limonène et qui sont considérés comme produits majoritaires. Ils représentent 24% de la totalité des constituants de cette huile essentielle. Le reste, représenté par les monoterpènes oxygénés représentent 36.84% et que sont constitués majoritairement par : Terpényl-acétate et cédrol (8.35 % de la totalité des constituants identifiés) (tableau3.6).

Nous constatons l'existence aussi de 38% des sesquiterpènes parmi les 46 constituants identifiés, les hydrocarbures constituent 68.42%. Parmi les alcools sesquiterpéniques mis en évidence, le cédrol qui s'avère majoritaire avec 3.06% de la totalité des constituants de cette huile essentielle (tableau3.6). Nous avons également observé la présence de quatre diterpènes faiblement représentés (8%).

Les résultats obtenus relatifs aux composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens var horizontalis* sont comparés avec ceux des autres huiles essentielles de la même variété et également avec celles de la variété *pyramidalis* dans certains pays (tableau3.8).

Comparés à certains travaux [192,196] rapportés dans le tableau 3.8, nos résultats montrent que nous avons identifié plus de constituants dans l'huile essentielle de cette variété. Nous avons noté certaines compatibilités notables de proportions de certains constituants dans l'huile par rapport à celles extraites de la même variété du Mexique. Cependant, il existe des différences par rapport à celle de la variété d'Iran.

Que ce soit pour la variété *horizontalis* ou *pyramidalis* la présence de α -pinène a été révélé comme composé majoritaire dans l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* L. présente dans différents pays cités dans le tableau 3.8. Cependant, leur pourcentage dans l'huile essentielle étudiée (36.05%), ainsi que celle du Mexique (49.81%), et de l'Egypte (48.2%) est inférieur à ceux des huiles essentielles des variétés iranienne (59.2%), tunisienne (64.1%), et croatienne (69.9%).

Tableau 3.8: Principaux constituants de l'huile essentielle des cônes femelles de *Cupressus sempervirens* L. selon l'origine.

Composés majoritaires	<i>C.semper var horiz</i> [présente étude]	<i>C.semper var horiz</i> (Mexique) [196]	<i>C.semper var horiz</i> (Iran) [192]	<i>C.semper var pyram</i> (Croatia) [161]	<i>C.sempers var pyramid</i> (Egypte) [197]	<i>C.semperviren var pyrami</i> (Tunisie) [198]
α -pinène	36.05%	49.81%	59.2%	69.9%	48.2%	64.1%
Δ -3-carène	15.90%	17.94%	-	11.7%	19.1%	7.8%
α -terpinolène	6.63%	3.44%	-	3.6%		2.6%
β -phellandrène	5.92%	6.21%	-			-
Germacrène-D	4.89%	-	2.1%			2.5%
B-myrcène	4.51%	6.185%	3.4%			2.6%
Limonène	4.36%	5.55%	2.4%			1.5%
Terpényl-acétate	3.95%	-	3.2%			2.4%
cédrol	3.06%	-	-			3.1%
α -cubebène	1.47%	0.04%	-	1.9%		-
Terpinène-4-ol	1.44%	0.32%	-			
N° de composés identifiés	46	20	9	16	49	47

Le Δ -3-carène s'est révélé comme le deuxième composé le plus important de toutes les huiles essentielles extraites des variétés de différents pays avec des taux assez comparables. Cependant, la variété *horizontalis* d'Iran ne renferme pas ce composé, mais contient comme second composé majoritaire le Δ -2-carène (14.9%).

Pour les variétés *horizontalis*, on constate que notre plante présente la particularité d'être la seule parmi les variétés étudiées de différentes origines qui possède des composés ditéropéniques.

Selon **Senatore et al.**, les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs tels que le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante, et la présence de chémotypes [199].

3.4.3 Etude des composés non volatiles

3.4 3.1. Rendement de l'extraction de la fraction non volatile

La teneur en substances non volatiles miscibles dans les solvants apolaires (éther de pétrole) est de 8.279% ce qui correspond à 1.66 g /20 g de la poudre des fruits étudiés. En ce qui concerne les substances non volatiles miscibles dans les solvants polaires, la teneur est de 16.43% correspondant à un résidu de 3.28 g pour 20 g de la même poudre comme illustré dans la figure 3.28.

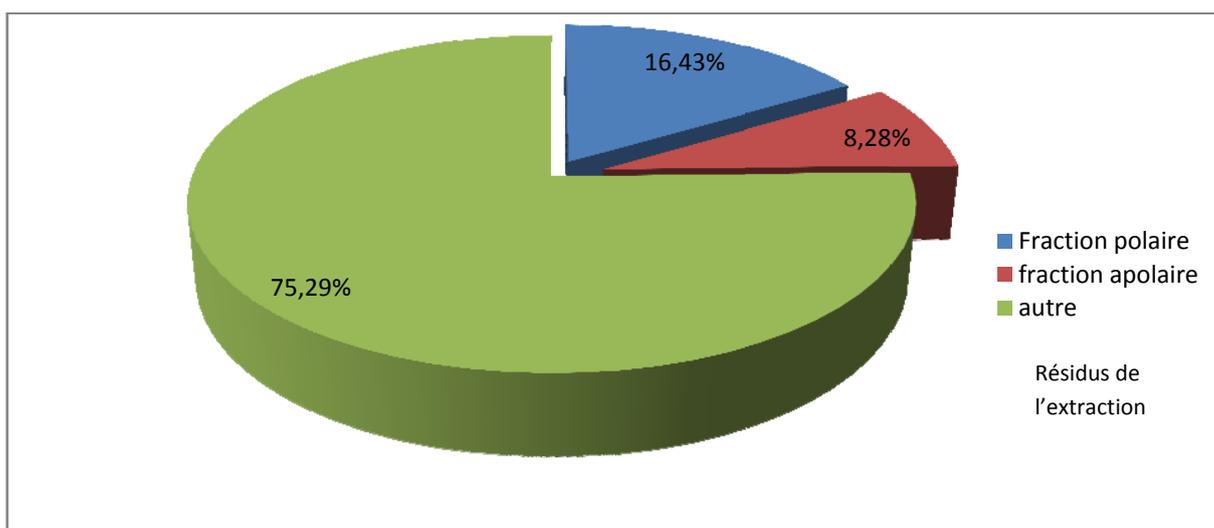


Figure 3.28: Teneur des cônes femelles de *Cupressus sempervirens.L. var horizontalis* en substances polaires et apolaires.

Le rendement de l'extrait méthanolique obtenu est très proche de celui obtenu par Cariel et Jean [200]. Ces derniers ont obtenu un résidu de 33g pour 200g de la plante (cônes) soit un rendement de 16,5%.

3.5. Activités biologiques

Nous avons étudié les activités antimicrobiennes et anti-oxydantes des extraits préparés. Les résultats observés lors de l'évaluation d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque du produit, d'une part, et d'autre part, sa quantité relative dans l'extrait. Ainsi, l'activité marquée d'un extrait peut tout aussi bien provenir d'une faible quantité de constituants très actifs, que d'une grande quantité de constituants peu actifs. De plus, il se peut qu'une activité observée résulte de la somme d'activités de plusieurs constituants [201,202].

3.5.1. Activité antimicrobienne

Nous avons intéressé à étudier l'effet antimicrobien de notre plante, car dans les dernières années, les scientifiques ont mis l'accent sur l'augmentation des infections humaines causées par des bactéries pathogènes et des champignons. Malheureusement, les micro-organismes développent une résistance à de nombreux antibiotiques en raison de l'utilisation indiscriminée des antibiotiques commerciaux [203,204]. Actuellement, les gens se tournent vers des produits naturels. Par conséquent, l'utilisation des huiles essentielles est moins dommageable pour la santé humaine [205,206].

La détermination du pouvoir antimicrobien des fruits de la plante étudiée, s'est réalisée en appliquant la méthode de diffusion par des disques sur gélose. Cette méthode nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle ainsi que de celui de l'extrait méthanolique des fruits.

L'estimation de l'activité antimicrobienne des extraits est basée sur une échelle de mesure donnée par **Mutai et al., (2009)** [207]. Ils ont classé le pouvoir

antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 5 classes :

Très fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone est **supérieur à 30mm** ;

Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone **varie entre 21 et 28mm** ;

Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone **varie entre 16 et 20mm** ;

Intermédiairement inhibitrice lorsque le diamètre **varie entre 10 et 16mm** ;

Non inhibitrice lorsque le diamètre est **inférieur à 10 mm**.

Pour le control; Nous avons réalisé un antibiogramme pour estimer la sensibilité des souches testées à un ou plusieurs antibiotiques tableau 3.9.

Pour les extraits testés ; les diamètres des zones d'inhibition observés autour des disques imprégnés d'huile essentielle pure et d'extrait méthanolique (1mg/1ml dilué dans le méthanol) après 24 heures d'incubation à 37°C pour les bactéries et après 48 heures à 25°C pour les levures sont reportés dans le tableau 3.10.

Tableau 3.9. Résultats de l'antibiogramme (Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne en mm).

	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
Gentamicine	40	40	21	34	21	30	-
Ampicilline	32	13	42	26	42	12	-
Penicilline G	28	R	34	R	32	R	-
Cefazoline	44	R	40	26	40	30	-
Norfloxacine	30	17	30	40	30	26	-

Tableau 3.10 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).

souches		Huile essentielle	Extrait méthanolique
Gram+	<i>B.subtilis</i>	14	10
	<i>B.cereus</i>	18.5	14
	<i>S.aureus</i>	20	15
Gram-	<i>E. coli</i>	R	R
	<i>P. aeruginosa</i>	13,5	20
	<i>K. pneumonie</i>	R	R
Levure	<i>C.albicans</i>	R	R

Nos résultats ont montré la présence des zones d'inhibition obtenues par l'huile essentielle et même par l'extrait méthanolique sur trois souches de Gram positif testées. Ces résultats montrent l'efficacité de ces deux extraits naturels des fruits de *Cupressus sempervirens L. var horizontalis* (Figure3.29, Figure3.30, Figure3.31, Figure3.32).

L'huile essentielle s'est caractérisée par une activité modérément inhibitrice sur les souches *B.cereus* (18.5mm) et *S.aureus* (20mm), et par une activité légèrement inhibitrice sur les souches *B.subtilis* (14mm).

En ce qui concerne l'extrait méthanolique, son pouvoir inhibiteur vis-à-vis les trois souches de Gram positif testées est léger (*B.subtilis*=10mm ; *B.cereus*=14mm ; *S.aureus*=15mm).

En ce qui concerne l'action antimicrobienne de nos deux extraits sur les souches de Gram négatif, il en ressort que seule la souche *P. aeruginosa* qui s'est montrée globalement sensible. Cette espèce, selon nos résultats est considérée intermédiairement sensible et vis-à-vis de l'huile essentielle (13.5mm) et sensible à l'extrait méthanolique(20mm). Dans cette optique , on considère que l'huile essentielle présente un pouvoir modéré sur cette souche, tandis que l'extrait méthanolique se caractérise par un léger pouvoir.

Pour les autres espèces telles que *K.pneumonie* et *E.coli*, et de la levure *C.albicans* aucune zone d'inhibition n'a été observé autour des disques chargés que ce soit par l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique. Ces souches possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antimicrobienne de nos extraits.

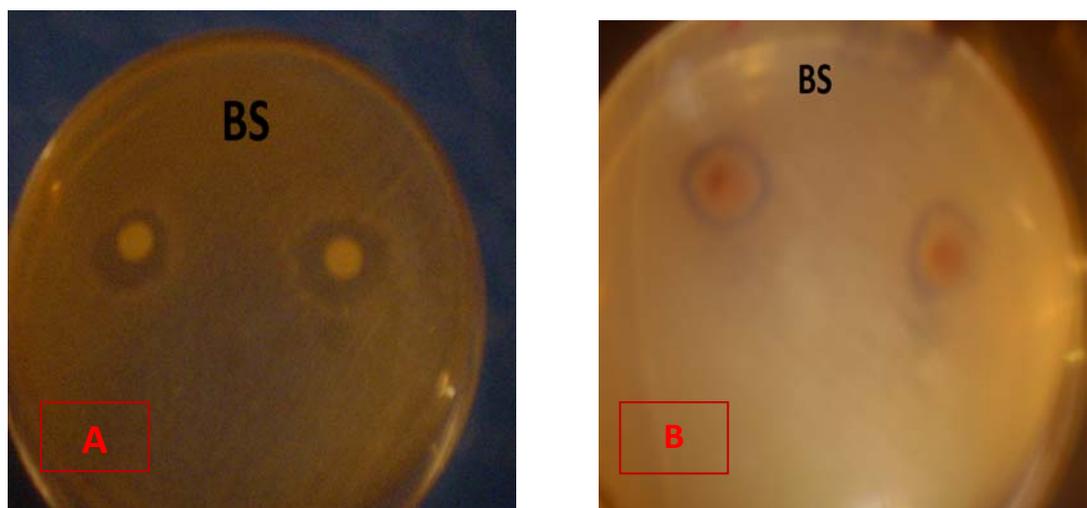


Figure 3.29: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique testés sur *Bacillus subtilis*.

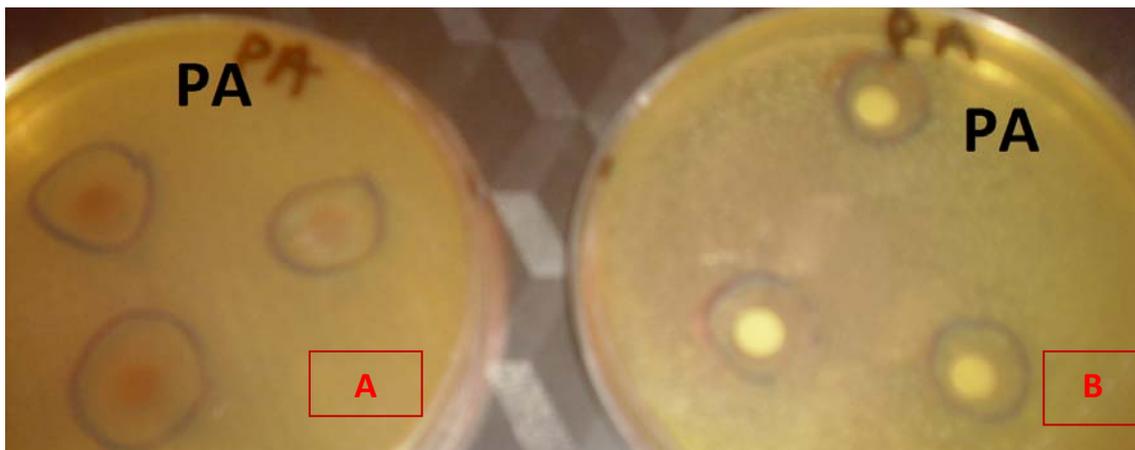


Figure 3.30: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique testés sur *Pseudomonas aeruginosa*.

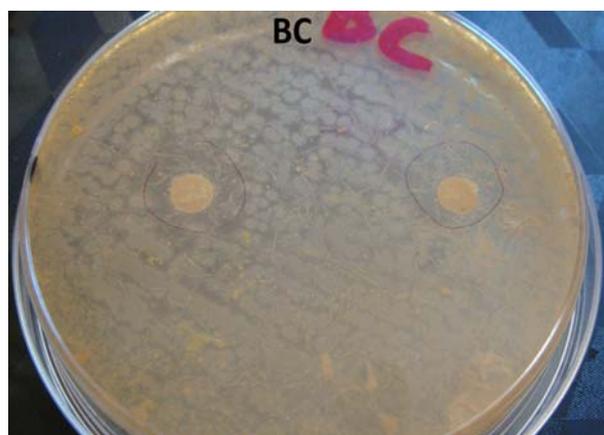


Figure 3.31: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle testée sur *Bacillus cereus*.



Figure 3.32: (A) Zones d'inhibition de l'huile essentielle et (B) de l'extrait méthanolique testés sur *Staphylococcus aureus*.

L'activité inhibitrice des extraits vis-à-vis la majorité des souches est très faible par rapport à celle des antibiotiques. Cependant, l'activité de l'huile essentielle vis-à-vis *B.cereus* avec une zone d'inhibition de 18.5mm s'est révélée plus élevée de celle exercé par Ampécilline (13mm) et par Norfloquine (17mm). Le même effet est observé vis-à-vis *P.aeroginosa* avec une zone d'inhibition de 20mm, valeur proche de la zone exercé par Gentamicine (21mm). L'extrait méthanolique, avec sa zone d'inhibition de 20mm a un effet voisin de celui de la Gentamicine (21mm). Il est à noter que le solvant utilisé pour dissoudre le résidu sec de l'extrait organique (méthanol) n'a donné aucune zone d'inhibition. Selon **Valero et Salmeron (2003)** [208], il est difficile de faire une comparaison entre les résultats obtenus avec ceux rapportés par la littérature en raison des problèmes suivants :

- .Nature du matériel végétal (l'espèce, extrait ou l'HE, origine géographique, saison de cueillette) ;
- .Procédé d'extraction ;
- .Niveau de pureté du produit final et sa conservation ;
- .Nature des souches testées ;
- .Méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne ;
- .Milieux de culture employés (milieu synthétique ou nature).

Les bactéries à Gram (-) possèdent une forte résistance, cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides ce qui rend cette membrane imperméable à la plupart des agents biocides [209,210].

Cependant, **Deans et Ritchie (1987)** [211] n'ont pas trouvé de différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram(-) et celle des bactéries (Gram+), tel que rapportés dans nos résultats. Les différentes bactéries Gram- et Gram⁺ testées présentent une activité variable à l'égard de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique employés puisque *Bacillus cereus*; bactérie à Gram(+) a été plus sensible que *Pseudomonas aeroginosa*; une bactérie Gram (-) vis-à-vis l'extrait méthanolique.

La qualité des souches tests est déterminante pour la valeur de l'essai, car celles-ci sont l'instrument de mesure dans la méthode de détermination de l'activité d'un produit antimicrobien [212].

Dans nos conditions expérimentales, l'huile essentielle et l'extrait méthanolique n'ont donné aucune activité inhibitrice sur la souche *Candida albicans*. Ceci pourrait être expliqué par l'absence de substances à activité antifongique comme les alcaloïdes [111]. Les études réalisées par **Emmami et al., (2006)**, confirment l'absence des alcaloïdes au niveau des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis*, ils ont également signalé la résistance de *C.albicans* à l'égard de l'huile essentielle de cette variété [192].

Pseudomonas aeruginosa qui a la réputation d'être très résistante à toute sorte d'agents antimicrobiens et antibiotiques [213], a montré dans cette étude une sensibilisation modérée vis-à-vis l'extrait méthanolique et légère à l'action de l'huile essentielle.

Budhiraja et al., (1999) ont montré que le composé terpinen-4-ol possède un effet inhibiteur contre *P.aeruginosa* [214], et l'huile essentielle testée contient 1.44% de ce composé. Donc nous pouvons en déduire que probablement ce composé a contribué à l'inhibition de cette souche.

Une étude réalisé par **Carlos Ramón et al.,(2012)** [196] ont montré que l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens var horizontalis* exerce un pouvoir antibactérien léger sur *P.aeruginose* avec une zone d'inhibition légèrement inférieure de celle que nous avons trouvé, et même sur la souche *Staphylococcus aureus*.

L'activité antibactérienne sur *C. sempervirens var horizontalis* de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants selon les résultats de screening phytochimique de la plante et CG/MS de l'huile essentielle, notamment les flavonoïdes, les tanins, les terpènes [111, 215, 216, 217, 218, 219].

Ces résultats suggèrent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est en relation avec l'activité de ces composants. Le terpène cyclique, l' α -pinène qui agit probablement sur la membrane en modifiant la liaison des phospholipides dans la bicouche lipidique des bactéries Gram positif. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus dans ce travail. Nous pouvons donc en déduire que le composé terpénique peut être le majoritaire en agissant sur les bactéries Gram (+) comme *S.aureus*.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C sempervirens var horizontalis* en plus de l' α -pinène pourrait, en partie, être associés aussi d'autres constituants majeurs tels que α - phellandrène, α -terpinyl acétate et cédrol. Ces composés ont été signalés par leurs effets antimicrobiens [219, 220, 221, 222]. Dans notre présente étude, ces constituants ont été révélés parmi les composés majoritaires. Ce que nous a laissé pensé que probablement ils participent à l'effet antimicrobien de cette huile essentielle testée.

Selon **Marino et al., (2001)**, les composants minoritaires peuvent également contribuer à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, impliquant probablement un certain type de synergie avec d'autres composés actifs [223].

3.5.2 Activité antioxydante

Il y a un besoin important en antioxydants efficaces à partir de sources naturelles comme alternatives aux additifs alimentaires de synthèse afin de prévenir la détérioration des aliments, médicaments et cosmétiques. Les extraits et les huiles essentielles de nombreuses plantes ont été étudiés pour leur activité antioxydante [224, 225, 226].

L'activité antiradicalaire de nos produits a été évaluée par la méthode de DPPH. Une solution méthanolique de DPPH• (2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl) présente une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant, la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance [227].

Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence de chacun des produits à tester a été mesuré à 517 nm, les résultats figurant dans les tableaux et les figures ci-après illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique isolés à partir des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* et vis-à-vis du radical libre DPPH. Ces résultats sont comparés entre eux et avec celle d'un antioxydant standard (α -tocophérol) (Tableau 3.11, Figure 3.33, Figure 3.34, Figure 3.35 et Appendice C).

Tableau 3.11: Pourcentages de l'activité antiradicalaire moyenne de l'huile essentielle (A) et l'extrait méthanolique; (B) des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* et du standard α -tocophérol (C) vis-à-vis du radical libre DPPH.

(A) Concentrations (mg/ml)	activité de piégeur du radical DPPH (%)	(B) Concentrations (mg/ml)	activité de piégeur du radical DPPH (%)	(C) Concentrations (mg/ml)	activité de piégeur du radical DPPH (%)
15	6,1336	0,0001	8,62	0,005	36,2552
20	11,5036	0,001	25,0533	0,01	68,7462
30	16,4429	0,005	35,52266	0,02	76,0406
50	68,2519	0,01	59,9866	0,03	77,3665
75	70,569	0,05	73,03	0,04	77,6532
		0,2	88,5266	0,05	78,411

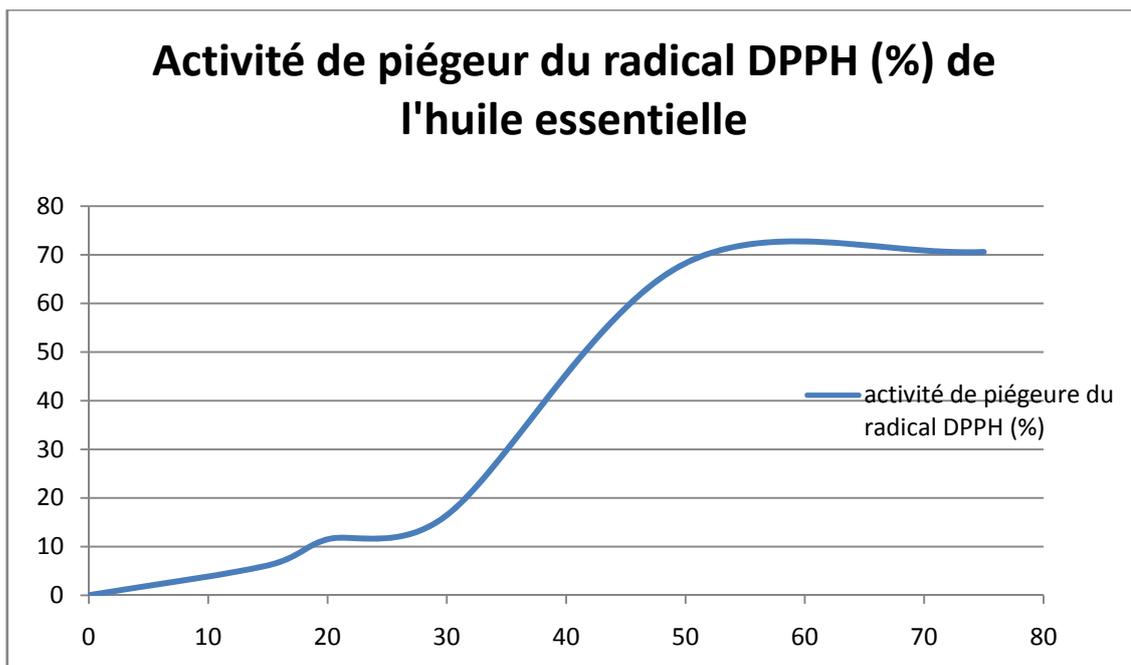


Figure 3.33: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

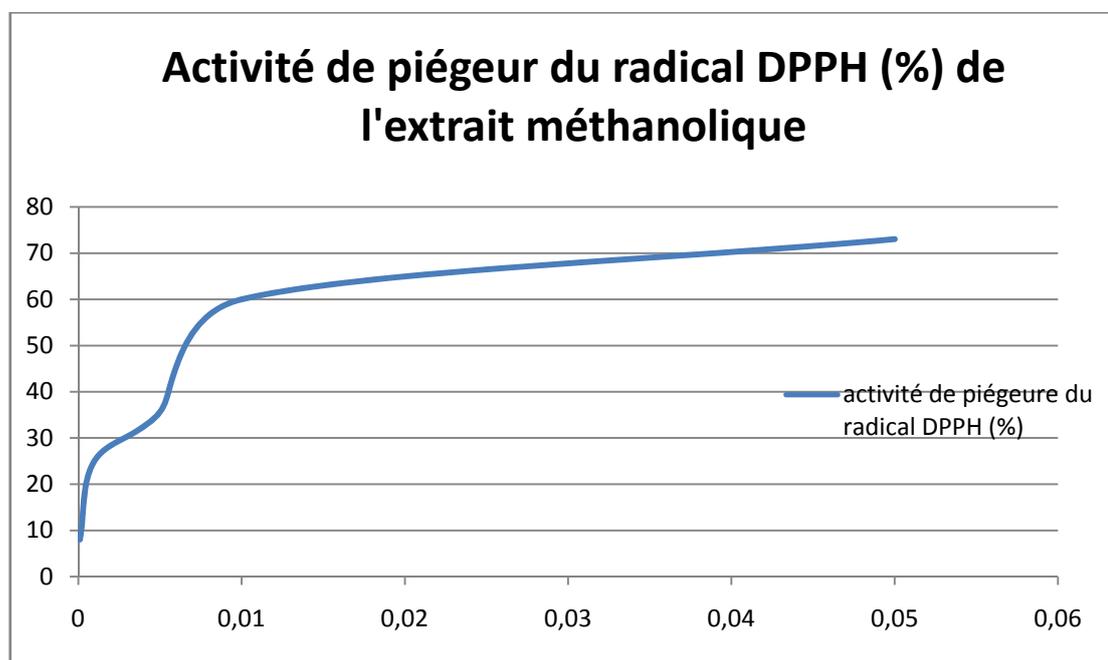


Figure 3.34: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

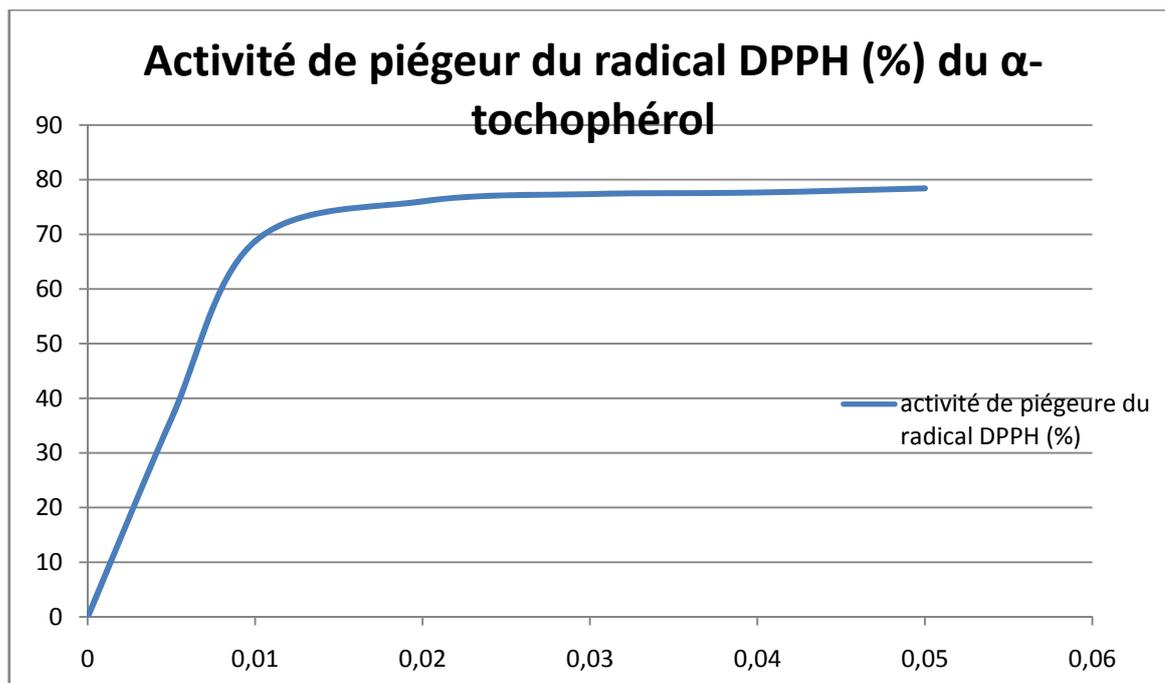


Figure 3.35: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de standard α -tocophérol des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

L'analyse de ces résultats montre que le pouvoir réducteur se différencie selon la nature de l'extrait isolé du même organe. On remarque que nos extraits présentent une activité antioxydante et que la faculté de piéger le radical libre DPPH est très importante avec l'extrait méthanolique qu'avec celle de l'huile essentielle.

Afin d'établir une comparaison entre les échantillons, nous avons déterminé l'IC50 de nos extraits (tableau 3.15), ce paramètre introduit par Brand-Williams et al., et utilisé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats. Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte 50% de l'activité de DPPH (couleur) [228].

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits :

- **Calcul de l'EC50** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, $EC50 = (IC50/mg \text{ de DPPH/ml})$].
- **Calcul du pouvoir antiradicalaire (APR)** qui est inversement proportionnel à l'EC50 ($APR = 1/EC50$) [229]. Plus ces valeurs ne tendent pas et s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente.

Tableau 3.12: Activité antiradicalaire des extraits des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* et du standard.

échantillons	IC50 mg/ml	EC50(mg/mg DPPH)	APR
Huile essentielle	43.370±0.9184	1084.3± 22.9608	0.0009±1.95.10 ⁵
Extrait méthanolique	0,0081±0.00085	0.2013±0.02125	5.0063±0.5315
α-tocophérol	0,0071±0.00023	0.1773±0.0056	5.645±0.1835

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique est un excellent antioxydant naturel. Il possède des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'il agit à faible dose, il inhibe l'oxydation de 50 % de DPPH avec seulement une concentration de 0.0081mg/ml et un APR de l'ordre de 5.0063.

En comparant le pouvoir de l'extrait méthanolique avec le standard α- tocophérol qui a inhibé 50% l'activité de DPPH à une dose de 0.0071 mg/ml et un APR de 5.645, se montre l'excellent pouvoir de l'extrait étudié.

En ce qui concerne l'huile essentielle, elle présente également une activité antiradicalaire, mais très faible (43.37mg/ml) par rapport l'extrait méthanolique ou au standard.

Ce résultat concorde avec celui trouvé par **Gianni et al., (2005)** [9], qui a montré que l'effet antioxydant de l'huile essentielle de cette plante est faible. Ce

chercheur [9] et **Ruberto & Baratta, (2000)** [230] ont noté que les huiles essentielles avec une plus grande abondance de monoterpènes hydrocarbonés sont presque inefficaces. Ainsi selon **Jukié et Miliš, (2005)** [231], l'activité antioxydante des huiles essentielles peut être liée au contenu phénolique. Et ont noté que l'étude comparative sur la faculté de réduction du radical DPPH par des chémotypes différents a prouvé que les chémotypes phénoliques montrent in vitro des capacités antioxydantes plus exprimées et plus fort que les chémotypes non phénoliques. Donc, nous pouvons expliquer ce faible pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de cette plante par leur richesse en composés monoterpéniques hydrocarbonés de l'ordre de (24%) et pauvreté en composés phénoliques (0.05%) qui ont été détectés par CG/MS.

En ce qui concerne l'extrait méthanolique, leur activité antiradicalaire pourrait s'expliquer par la présence des tanins et des flavonoïdes, qui sont détectés par les tests préliminaires réalisés dans cette étude. En effet les flavonoïdes et les tanins sont des piègeurs de radicaux libres [232]. Par ailleurs, **Uchida et ses collaborateurs** suggèrent que les tanins ont une action de piégeage radicalaire sur le radical 1-1 diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [233].

En rappel, cette même espèce s'est avérée riche en flavonoïdes tels que cupressuflavone, amenoflavone, rutine, quercitrine, myricitrine [234]. Certains de composés phénoliques (anthocyanidine, catechines flavones, flavonols and isoflavones) tannins (acide ellagique, acide gallique, isopropanoïds phenyl, acide caffeique, acide coumarique, acide ferulique) lignans, catéchol [235].

En comparaison avec les résultats de travail de **Emmami et al., (2007)** [193], Les extraits méthanoliques des feuilles et des fruits de toutes les variétés de *Cupressus sempervirens L.* ont également été prouvés posséder une activité antioxydante lorsqu'ils ont été testés en utilisant d'autres méthodes (FTC et TBA). Ils ont démontré que l'extrait méthanolique des fruits de *Cupressus sempervirens var horizontalis* a une forte activité antioxydante était même plus élevé que l' α -tocophérol.

Dans une autre étude réalisé par **Ibrahim., et al (2007)** [236], l'extrait méthanolique de cette plante à exercer une forte activité antiradicalaire contre le

radical 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) ainsi que certains des composés phénoliques isolés (par exemple, la quercitine, la rutine, l'acide caféique et l'acide p-coumarique) en comparaison avec α -tocophérol et butyle hydroxyle toluène (BHT) comme des antioxydants standards.

Compte tenu de ces résultats obtenus par rapport à la forte activité antioxydante des extraits méthanolique de cette plante et surtout de ces cônes femelles, nombreux chercheurs ont étudié le rôle important de cet effet dans la capacité hépatoprotecteur. Selon **Rizk et al., (2007)** et **Korim et al., (2009)** [237,63] le prétraitement avec l'extrait de méthanol à partir des graines et des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* respectivement a donné un effet hépatoprotecteur contre des substances défavorables (CCL4, acétate de plomb), qui peuvent, à leur tour, conduisent à la formation des radicaux libres et donc d'augmenter la susceptibilité à des dommages hépatiques. Ils ont suggéré que l'utilisation de cette plante médicinale dans la thérapie est recommandée, cet effet liée à ses constituants et ce résultat a été soutenu par des examens histologiques.

CONCLUSION

L'évolution des esprits et le refus du « tout chimique » qui se manifeste de plus en plus ouvrant un peu plus la porte au « retour », c'est-à-dire au respect de l'essentiel, la vie.

Ce travail a été mené dans le cadre de la valorisation de la flore spontanée dans la région de Blida et nous avons concerné à une plante médicinale ; *Cupressus sempervirens* L. et précisément à la variété *horizontalis* qui est moins étudiée par rapport à la variété *pyramidalis*.

Une étude macroscopique des différents organes de la plante a permis de faire une description de la plante étudiée. En outre des observations microscopiques photoniques des coupes histologiques ont montré l'existence des structures de sécrétions de type canaux excréteurs.

Un screening chimique de la plante a rapporté que les cônes de *Cupressus sempervirens* L. var *horizontalis* sont riches en tanins et saponines et en plus ils possèdent des flavonoïdes.

L'huile essentielle a été extraite par la technique d'hydrodistillation avec un rendement de l'ordre 0.4%. L'analyse qualitative de l'huile essentielle par CG/MS, a permis d'identifier quarante six composés (46), dont onze (11) sont majoritaires parmi les quels : α -pinène, Δ -3-carène, l' α -terpinolène et β -phellandrène.

L'analyse semi-quantitative a mis en évidence l'équivalence entre les composés monoterpéniques et sesquiterpéniques, avec une dominance des composés hydrocarbonés par rapport aux dérivés oxygénés.

L'étude analytique de l'huile essentielle de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* a présenté 11 composés majoritaires où l' α -pinène est le composé principal avec une teneur de 36.05%, suivie par le 3- Δ - caréne avec un teneur de 15,90%. Tandis que L'extrait méthanolique a présenté un rendement de 16.43%

L'effet antimicrobien des extraits naturels des *Cupressus sempervirens* L. var *horizontalis* est variable selon les souches microbiennes. D'après les résultats obtenus, la plus grande valeur d'inhibition enregistrée sur les souches est de l'ordre de 20mm, qui signifie une activité modéré de l'huile essentielle sur *S.aureus* et de l'extrait méthanolique sur *P.aeruginosa*. Tandis qu'aucune activité n'a été décelée vis-à-vis de *K.pneumonie* et *C.albicans*.

L'extrait méthanolique des fruits de la plante étudiée manifeste une forte activité antiradicalaire qui est très proche de celle du standard α -tocophérol. Cependant l'huile essentielle possède un faible pouvoir antiradicalaire.

Dans la perspective de poursuivre et approfondir ce travail, il serait nécessaire :

- De faire une étude phytohistologique.
 - De réaliser une identification à l'extrait méthanolique et tester les effets de ces composés.
 - De déterminer les Concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) pour chaque huile essentielle. -
- D'attacher une attention particulière pour l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de cette plante dans les études à venir, qui s'est avérée très importante.

APPENDICE A

PHOTOS DE L'APPAREILLAGE



Figure01 : Appareil de soxhlet (photo).



Figure 02 : Rotavapeur (photo).



Figure 03 : Four à moufle (photo).

APPENDICE B

TECHNIQUE DE LA DOUBLE COLORATION

Les phases de la coloration sont les suivantes :

- Un prétraitement dans l'éther est nécessaire pour vider les cellules de leurs contenus pendant 20 minutes.
- Un rinçage abondant à l'eau distillée.
- Les coupes ont été placées 10 à 15 min dans l'hypochlorite (destruction des structures cellulaires), suivie par un rinçage à l'eau pendant 15 à 20 min ;
- puis dans de l'acide acétique [0.1] (il a pour but d'augmenter l'affinité des colorants), toujours suivie par un rinçage à l'eau pendant 15 à 20 min.
- par la suite une coloration au vert de méthyle à 1 % durant 10 min; puis au rouge Congo à 2 % pendant 10 min ont été faites. Avec rinçage à l'eau pendant 15 à 20 min après chaque coloration.
- Un montage des coupes dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle. L'observation se fait immédiatement au microscope photonique doté d'un appareil photo et cela pour éviter le dessèchement des coupes.

APPENDICE C
TEST ANTIOXYDANT

(Capacité de réduction du radical libre mesuré à 517 nm)

Tableau 1: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

Concentrations (mg/ml)	Activité de piègeur du radical DPPH (%)		
	Abs1	Abs2	Abs3
5	2,1889	2,6565	/
10	/	4,1297	4,44
15	6,6141	6,478	5,349
20	/	11,5978	11,4094
30	17,078	17,6537	15,2093
50	69,0078	/	67,496
75	75,251	74,2894	62,1668

Tableau 2: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des cônes femelles de *Cupressus sempervirens var horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

Concentrations (mg/ml)	Activité de piègeur du radical DPPH (%)		
	Abs1	Abs2	Abs3
0,0001	/	10,34	6,9
0,001	23,4	21,81	29,95
0,005	36,39	37,9	32,29
0,01	53,53	65,12	61,31
0,05	75,12	72,31	71,66
0,2	87,5	89,13	88,95

Tableau 3 (suite Appendice C): Pourcentages de l'activité antiradicalaire de standard α -tocophérol des cônes femelles de *Cupressus sempervirens* var *horizontalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

Concentrations (mg/ml)	Activité de piègeur du radical DPPH (%)		
	Abs1	Abs2	Abs3
0,005	38,71	36,1668	33,889
0,01	69,536	66,8813	70,5358
0,02	76,1436	74,7005	77,2779
0,03	77,3872	76,5536	78,1587
0,04	77,8198	76,7192	78,4208
0,05	78,0656	/	78,7564

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Mogode, D.J., " Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad", Mémoire de l'université de Bamako, (2005).
- 2- Bérubé-Gagnon., "Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana* ",89 Mémoire de l'université de Québec, (2006).
- 3- Bernard, B., "Plantes médicinales du monde ", Croyances et réalités, (2001), 173 p.
- 4- Fabienne, F., "caractérisiques hydrauliques, régulation stomatiques et efficience d'utilisation de l'eau de quatre espèces de conifères méditerranéens (*Cupressus sempervirens*, *Cedrus atlantica*, *Pinus halepensis*, *Pinus nigra*)", mémoire de l'université de Henri Poincaré, (2002).
- 5- De Vilmorin, J.B., " Histoires d'arbres.", (2003), 56p.
- 6- Said, O., Khalil, K., Fulded, S and Azaizeh, H., "Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Israel, the Golan Heights and the West Bank region". J. Ethnopharmacol, (2002), 83: 251-265.
- 7- Madar, Z., E.Hugo, Miriam, C., Joseph,R., Zvi, S and Abraham, S., "Antifungal terpenoids produced by Cypress after infection by *Diplodia pinea* f. sp. *Cupressi*". J. Phytochem., (1995), 38: 351-354.

- 8- Karkabounas, S., D. Kiortsis, J., Zelovitis, P., Skafida and Demetzos, C., "Effects of *Cupressus sempervirens* cone extract on lipid profile in Wistar rats". *J. Atherosclerosis Supplements*, (2003), 3: 137-138.
- 9- Gianni, S., Silvia, M., Mariavittoria, M., Martina, S., Stefano, M., Matteo, R et Renato, B., "Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods", *Food Chemistry* 91, (2005), 621–632.
- 10- Giovannelli, A., De Carlo, A., "Micropropagation of mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L)", (2007), 93-105.
- 11- Gharbi, Z., "A Guide to medicinal plants in North Africa", 105p.
- 12- Yahiaoui, F., "Cypress. Projet Education et Conservation de la Biodiversité, Algérie".
- 13- Riou-Nivert, P., "Connaissance et reconnaissance", (2001), 215 p.
- 14- Dictionnaire encyclopédique Troussel, connu aussi sous le nom d'encyclopédie Troussel, Paris, (1886-1891).
- 15- Valmont-Bomare, M., "Dictionnaire raisonné universel de l'histoire naturelle", V.4, 179-430.
- 16- Panetsos, C.P., "Inherited differences between populations and individuals of *Cupressus sempervirens* L. (in Greek w. English summary)" . Ministry of Agriculture, Forest Research Institute", N° 17, (1967), 19 p.
- 17- Cornelisson, N., "Journal d'agriculture pratique, De Belgique", V.8, (1856), 529 p.
- 18- Jean-Claude, R., "Flore forestière française : région méditerranéenne" . Institut pour le développement forestier (France)", France, (2008), 299 p.

19- Désiré, C., "Nouveaux éléments d'histoire naturelle médicale", V.2, (1869), 75 p.

20- Copyright © 2005 Pharma-Sites.

21- Maurice, D., Jean-Marie, P., "Encyclopédie visuelle des arbres et arbustes", (2008), 118 p.

22- Maillard, C., Vaillant, J., Babadjamian, A., Diaz-Lanza, A.M., et Balansard, G., "Révision des structures des acides néocupressiques I, II et III des galbules vertes de *Cupressus sempervirens* L. Plantes médicinales et phytothérapie", V.26, n°1, (1993), 5-9.

23- Kherif, N.S., "Etude de la variabilité des températures extrêmes et pérennité des arbres urbains dans la région de Constantine", Mémoire de magister en écologie et environnement", (2006).

22- Dupont, F., "Guignard. J-L. Botanique: systématique moléculaire", (2007), 49 p.

23- Guibourt, N.J.B.G., "Histoire naturelle des drogues simples : au cours d'histoire naturelle professé à l'école de pharmacie de Paris", V. 2, (1869), 239 p.

24- Boullard, B., "Dictionnaire : Plantes et Champignons", (1997), 231 p.

25- Lanore, F., "Les huiles essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale", (2009), 134 p.

26- Stichmann.W., Stichmann-Marny.U., "Guide Vigot de la flore d'Europe". Editions Vigot, Paris, (2000),.447 p.

27- Moquin-Tandon, A., "Elements de botanique médicale : Contenant la description des végétaux utiles à la médecine et des espèces nuisibles à l'homme", (1861), 272 p.

28- Guibourt, N.J.B.G., "Histoire naturelle des drogues simples : au cours d'histoire naturelle professé à l'école de pharmacie de Paris", V. 2. (1869), 239 p.

29- Wikipédia l'encyclopédie libre.

30- Carrière, E.A., "traité général des conifères", (1855), 114 p.

31- Description de Coste (tome3, taxon n°3332) id, (1882), 9 p.

32- Farrar. J.L., "Les arbres du canada", (1996), 7 p.

33- Germain de Saint-Pierre, E., "Nouveau dictionnaire de botanique", (1870), 360 p.

34- Dupont. F., Guignard. J-L. Botanique: systématique moléculaire, (2007),49 p.

35- Boullard,B., "Plantes Médicinales Du Monde : Réalités et croyances", (2001),173 p.

36- Piotto B., Di Noi A, Seed propagation of Mediterranean trees and shrubs. © APAT. ISBN 88-448-0081-0, (2001).

37- Maurice, R., "Images de quelques arbres et arbustes communs en Lozère et ailleurs", (2010), 5 p.

38-CHAUMEIL, P., "Plasticité moléculaire de deux écotypes de pin maritime soumis à un stress osmotique. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I", (2006),12 p.

39- D'Orbign, C ., "Dictionnaire universel d'histoire naturelle", V.4. (1844), 550 p.

- 40- Dobr, J., " Cupressus dupreziana. Threatened Plants Newslett ", (1988), 8-20.
- 41- Henry Jhon Elwes, F.R.S.et Augustine Henry, M.A., "The tree of Great Britain and Ireland", V.5, (1844), 550 p.
- 42- Linnaeus, C., "Plantarum espèces 2", (1002), 1753.
- 43- Farjon, A., "Liste de vérification mondiale et Bibliographie des conifères", (1998).
- 44- Farjon, A., "A monograph of Cupressaceae and Sciadopitys". Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 1842460684", (2005).
- 45- Allemand, P., "Relations phyllogéniques dans le genre Cupressus (Cupressaceae)" . In : V. Grasso. E.P., Raddi (Eds), Il Cipresso Malattie e Difesa, Seminaire CEE du 23/24 novembre . Florence : Agrimed", (1979), 51-57.
- 46- Debazac, E.F., "Manuel des conifères. Gap: Imprimerie Louis-Jean", (1964),172 p.
- 47- Riou-Nivert, P., "Les résineux : Ecologie et pathologie", (2005), 36 p.
- 48- Axelrod, D.I., " Evolution of the Madro Tertiary geoflora. Botanical Review 24", (1958), 433-509.
- 49- Boscherini, G., Morgante, M., Rossi, P., Vendramin, G.G., "Allozyme and chloroplast DNA variation in Italian and Greek populations of *Pinus leucodermis*". Heredity 73, (1994), 284-290.
- 50- Vendramin ,G.G, Michelozzi ,M., Lelli ,L, Tognetti, R. " Genetic Variation in *Abies nebrodensis*: a case study for a highly endangered species. Forest Genetics 2", (1995), 171-175.

51- Larbi, H. et Belgherbi. B., " Les cyprès en Algérie : Historique, caractéristiques et valeurs". Institut de Biologie - Centre Universitaire de Mascara, Algérie. Projet MedCypre : le cyprès dans les pays Meda.Palermo", (2007),15 p.

52- Lemoine-Sebastian C., Rouane P., "La sexualité des Cupressacées: Observations sur la répartition des sexes chez *Actinostrobus pyramidalis* Miq. et chez *Cupressus sempervirens*. - 1978 - dendrologie, répartition sexe, *cupressus sempervirens*, *Actinostrobus pyramidalis*, localisation fleurs - 6 fig- Société Botanique de France", Bull. Soc. bot. Fr., Bull. Soc. Bot. Fr. (1904), 31-44.

53- Khatib. A., " Rôle des espèces ligneuses dans les systèmes agroforestiers (SAF) du nord de la syrie (Classification –Caractéristiques- Production)", Mémoire de Diplôme d'Etude Approfondie. Agriculture durable en milieu méditerranéen, (1999).

54- Danielle, R., " Conseil en aromathérapie. 2^e Édition", (2008), 105-106.

55- Danielle, R ., "Les nouvelles plantes qui soignent", (2005), 60 p.

56- Sarembaud, A et Poitevin, B., "Médicaments à usage homéopathique: dictionnaire pratique", (1996), 78 p.

57- Lelong, F., "Les belles et les bêtes : précis illustré de toxicologie botanique à usage vétérinaire. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes", (2008), 327 p.

58- Biaye, M., "Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de Docteur d'état en pharmacie", (2002), 38 p.

59- Quelques conseils et indications pratiques en aromathérapie.

60- Larousse, Encyclopédie des plantes médicinales "identifications, préparations, soins. 2nd Edition. Copyright © 1996, 2001 Dorling Kindersiey Limited, Londres".

- 61- Said, O.S., Khalil, M.et Fulder, H., "Ethno-pharmacological survey of medicinal plants in Israel, the Golan heights and the west Bank region. *Journal of Ethnopharmacology*", (2002), 83: 251-265.
- 62- Amouroux, P., Jean, D.et Lamaison, J.L., "Antiviral activity in vitro of *Cupressus sempervirens* on two human retroviruses HIV and HTLV". V.12, n°5, (1998), 367-368.
- 63- Koriem, K.M.M., "Lead toxicity and the protective role of *Cupressus sempervirens* seeds growing in Egypte", (2009).
- 64- Karkabounas, S., Kiortsis,D.N. , Zelovitis, J., Skafida, P., Demetzos,C., Malamas, M., Elisaf, M.et Evangelou,A., " Effects of *Cupressus sempervirens* cone extract on lipid parameters in Wistar rats. Laboratory of Physiology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina, Greece", (2003).
- 65- Emmami, S., Tayarani-Najaran,Z., Sabouri Ghannad,M., Khajeh Karamadini, P.et Khajeh Karamadini, M ., "Antiviral Activity of Obtained Extracts from Different Parts of *Cupressus sempervirens* against Herpes Simplex Virus Type 1. Iranian Journal of Basic Medical Sciences". Vol. 12, No. 3-4, Autumn , (2009), 133- 139.
- 66- Baudoux,D., "Guide Pratique d'Aromatherapie familiale et scientifique. Paris : Amyris ", (2008).
- 67- AFNOR, A., "Huiles essentielles, échantillonnage et méthode d'analyse. Ed. PARA Graphic ", T.1, (2000), 471 p.
- 68- AFNOR, B., "Huiles essentielles, Monographie relative aux huiles essentielles. Ed. PARA Graphic" , T.2, V. 1, (2000), 323 p.

69- AFNOR, C., "Huiles essentielles, Monographie relative aux huiles essentielles. Ed. PARA Graphic", T.2, V. 2,(2000), 663 p.

70- Funk and Wagnalls., " Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls. URL : <http://www.Funkandwagnalls.com>", (2004).

71- Reo, P.u., "Nutrient composition and biological evaluation of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds: Plant foods Hum. Nut" , (1996), 27-34.

72- SMITH, G.C et GRIVETTI L.E., " Cultural use of edible wild plants in Burkina Faso", West Africa. FASEB J., 8, (1994).

73- Loza-Tavera., "Herminia Monoterpenes in Essential oils: Biosynthesis and Properties". *Adv. Exp. Med. Biol "*. 464, (1999), 49-62.

74- Bruneton, J., "pharmacognosie. Phytochimie, Plantes médicinales", (3ème éd.). Paris : Editions médicales internationales. Editions Tec And Doc Lavoisier", (1999), 1120p.

75- Rasooli , L.et Mirmostafa , S.A., "Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*". 73, (2002), 244 – 250.

76- Cowan ,M.M., " Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*" 12, (1999), 564-582.

77- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*". 88, (2000), 308-316.

78- Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Abdelouahid D.E., "Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie- *Phytothérapie*" ; V.6, (2008), 160-164.

79- Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF., "Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne- *Phytothérapie*" ; V.6 ; (2008), 160-164.

- 80- Rota, M.C., Herrera,A., Martine,R.M., Sotomayor,J.A., Jordan,M.J., "Antimicrobial activity and chemical composition of *Tymus vulgaris*, *Tymus zygis* and *Tymus hyemalis* essential oils- Food Control"; V.19, (2008), 681-687.
- 81- Bekkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., "Review MI-Biological effects of essential oils- A review Food and Chimical Toxicology"; V. 46, (2008), 446-475.
- 82- Lahlou, M., "Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils- Phytotherapy research"; V.18,(2004), 435-448.
- 83- Anton, R., Lobstein, A., "Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles" ; TEC & Doc, Paris,(2005), 522 p.
- 84- Vandermoten, S., Cusson, M., Francis, F., Haubruge, E., "La biosynthèse des isoprénoides chez les pucerons : une cible potentielle de nouveaux bio-insecticides-Biotechnol "; Agron. Soc. Environ ; V.12 ; (2008), 451-460.
- 85- Bernad, M., "Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles, Editions Dangles". (2000).
- 86- Fleuriet, A., Jay-Allemand,C. et Macheix,J.J., "Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*", (2005),121-216.
- 87- Lugasi , A., Hovari , J.,Sagi, K.V.et BsL., "the role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*". 47(1-4), (2003), 119-125.
- 88- Urquiaga, L et Leighton, F., "Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*, 33 (2) : 55-64. Van Den Broucke C. O., Dommissse R. A., Esmans E. L. et Lemli J. A. 1982. Three methylated flavones from *Thymus vulgaris*. *Phytochemistry*", 21 (10) : (2000), 2581-2583.
- 89-Macheix, J.J., Fleuriet, A., et Jay–Allemand, C., " Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes", (2005), 4-5.

- 90- Fkih, S., " Etude de l'effet de l'irradiation ionisante sur certains polyphénols alimentaires et résidus pesticides". Diplôme Universitaire de Technologie (D.U.T) : Biologie Industrielle "(2007), 3-4.
- 91- Guignard, J.L., " Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris", (1996), 160 p.
- 92- Malagas, D., " Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT – Karthala", (1992), 232 p.
- 93- Chitindingu, K., Ndhlala, A.R., Chapano, C., Benhura. M.A. et Muchuweti, M., "Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus* (pigweed), *Brachiaria Brizantha* (*Upright Brachiaria*) and *Panicum maximum* (*guinea grass*), *Journal of food Biochemistry*", V.31, n°2, (2007), 206-216.
- 94- Stalikas, C.D., "Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*", (2007), 30:3268-3295.
- 95- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Tan, T.G., Ma, C., VanHung, N., Cuong, N.M., Bunyaphatsara, N., Soejarto, D.D et Fong, H.H.S., "Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry*", (2005), 66:2745-2751.
- 96- Kim, D.O., Chum, O.K., Kim, Y.J., Moone, H.Y. et Lee, C.Y., " Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums, *J-Agric Food Chem*", 51, (2003), 6500-6515.
- 97- Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y. et Fujisawa, S., "Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*", (2005), 66: 2108 –2120.
- 98- Ampopo, O., " Plants that heal. *World Health*", (1977), 26 - 30.

- 99- Addy, M.E and Awumeye, M.K., "Effects of the extracts of *Desmodium adscendens* on anaphylaxis. *Journal of Ethno pharmacology*",(1984), 11: 283 - 292.
- 100- <http://www.rain-tree.com/ethnic.htm> [consulté le 12.10. (2009)].
- 101- Verhoeyen , M.E., Bovy ,A., Collins, G., Muir ,S., Robinson, S., De Vos C.H.R. et Colliver, S., "Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany*"., 53 (377) , (2002), 209 -210.
- 102- Perret, C., " Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*, *Article de thèse, université de Neuchatel*", (2001).
- 103- Karayana, R,. Spiral,R., Chaluvadi,M et Krichna,D., "Bioflavonoids classification pharmacological Biochemical effects and therapeutic potentiel, *Indian,J.,Pharm*". (2001).
- 104- Ghestem, A., Segun., Paris,M.et Orecchioni, A.M., "Le préparateur en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, Paris", (2001) ,273 p.
- 105-Atefeibu, E.S.I., " Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne d'*Acacia Nilotica* Var *Andesonii* .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop de Dakar" .,(2002),33 p.
- 106- Peronny, S., "La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie", (2005),151 p.
- 107- Gonzalez, A.G., Estevez-Braun,A., Coumarins." *Nat. Prod. Reprod*".14, (1997), 465-475.
- 108- Starvic, B., et Matula ,T.I., "Flavonoides in food. Their significance for nutrition and health. In : ONG ASH et Packer L eds. *Lipid soluble and antioxidants: Biochemistry and clinical applications*. Basel: Birkhauser Verlag", (1992), 274-294.

- 109- Das, H.C., Wang, J.H., et Lien, E.J., "Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoides: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. P. 133 – 136. In: Jucker E ed. Progress in Drug Research. Basel: Birkhauser Verlag. Das H. C. et Weaver G. M. 1972. Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. J. Chromatogr", (1994), 67:105-111.
- 110- Bidet D., Gagnault, J.C., Girard, P., et Trotin, F., "Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: les flavonoides. L'actualité chimique", (1987), 89-97.
- 111- Bruneton, J., "Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier", (1993), 278-279.
- 112- Aruoma, O.L., Spencer, J.P.E., Bulter, J. et Halliwell, B., "Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidant with trichloromethylperoxyl radicals. Free Rad. Res", (1995), 22: 187-190.
- 113- Meddleton, E., Kardasami, J.C., "The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London", (1993), 617-652.
- 114- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M. and Gazin, M., "Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation". *Arzneim Forsh / Drug Res*", (1996), 1-6.
- 115- De Oliveira, M.M., Sampaio, M.R.P., Simon, F., Gibert, B. et Mors, W.B., "Antitumor activity of condensed flavonols. *An. Acad. Brasil*", (1972), 44; 41-44.
- 116- Brownlee, H. E., Hedger, J. et Scott, L. M., "Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Phys. Mol. Plant Pathol*", (1992), 40; 227-232.
- 117- Kreofsky, T., Schlager, J. W., Vuk-Pavlovic, Z., Abraham, R.T. et Rohrbach, M.S., "Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. *Am.J., Resir. CELL. Mol. Biol*", (1992), 7;172-181.

118- Okuda ,T., Kimura,Y., Yoshida ,T., Hatano ,T., Okuda, H. et Arichi ,S., "Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver. Chem. Pharm. Bull",(1983) , 31;1625-1631.

119- Okamura ,H., Mimura ,A., Yakou ,Y., Niwano ,M. et Takahara, Y., "Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. Phytochem", (1993) ,33;557-561.

120-Milal., Scalbert, A and Expert, D., " Iron wth-holding by plant polyphénols and resistance to pathogens and rots. Phytochemistry" ,(1996),42: 1551-1555.

121- Kim, J.Y., Lim, H.J., Lee, D.Y., Kim, D.H., Jeon, R., Ryu, J.H., "In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*", (2009), 19: 937 -940.

122- Roulier, G., "Les huiles essentielles pour votre santé. Editions Dangles". (1999).

123- Luu, C., "Les essences majeures anti-infectieuses, l'aromatogramme. *Votre diététique*", N° 53,(2002).

124- El Kalamouni,C., " Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées". Thèse de Doctorat de l'Université de TOULOUSE, (2010).

125- Aravodis ,E., " Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*", 4 (2), (2005), 128-133.

126- Favier, A., "Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique ", (2003), 108-115.

127- Vansant, G., "Radicaux libres et antioxydants : Principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation »", (2004).

- 128- Novelli, G.P., Rok., "Role of free radicals in septic shock. *J physical pharmacol*", ,(1997), p48, 517-527.
- 129- Bartosikova , L., necas ,J., Suchy ,V.et Kubinova ,R., " Antioxydative effects of morine". in ischemia, reperfusion of kidney in the laboratory .*Drug and Chemical Toxicology*, (2003), 72:87-94.
- 130- Potterat, O., "Antioxydant and free radical scavengers of natural origin. *Curent Organic Chemistry*", 1, (1997), 415-440.
- 131- Catalano, A., Rodilossis, S., Caprari ,P., Coppola ,V.et Procopio ,A., "Lipoxygenase regulates senescence like growth arrest by promoting Ros-dependent p53 activation. *EMBOJ*", 4, (2005),17-179.
- 132- Hosein, S.R., Lytle,M., " Les antioxydants. Traducteur : Alaine Boutilier. *Catie Feuillet d'information*", (2001),50 p.
- 133- Hennebelle, T., "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamiles productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de doctorat. Lille", (2006) ,304 p.
- 134- Fridovich, L., "Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase,*J Biol Chem*", 231,(1970), 899-911.
- 135- Panda, K., Chatopardhayaya, R et Fhosh, M.K., " Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damae of proteins and increased proteolysis. *Free Radicals. Biol Med*", 27, (1999), 1064-1079.
- 136- Pincemail, j., Bonjean, K., Cayeux, K et defraigne, J.O., " Physiological action of antioxydant defences. *Nutrition Chimique et Metabolisme*", 16, (2002), 233-239.

137- Fiorucci, S., "Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice", (2006), 211 p.

138- Les antioxydants et les radicaux libres dans le corps humain © 2008 Copyright EuroNaturomFormation.

139- Justine, Odile, Carole PASTRE., "Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat en Vétérinaire. L'Université Paul-Sabatier de Toulouse", (2005).

140- Abuja, P.M and Albertini, R., "Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clinica Chimica Acta" 306 (2001). 1-17.

141- Durackova, Z., Djrolo, F., Houngbe, H., Avode, G., Attoulou, V., Addra, B., Kodjoh, N et Avimadj, M., "Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdjakova A (ed)", (2008), 19-43.

142- Le Perche, P., " Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection. Ed Nathan, Paris", (1994), 142 p.

143- Mielal, J.J., "Mechanism of enzyme like reactions involving human hemoglobin, Bioorganic chemistry, vol IV, Van Tamelen. Acad. Press, New York", (1978), 315-348.

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

145- Potterat, O., "Antioxydant and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*", 1, (1997), 415-440.

- 146- Madhavi, D.L., Deshpandle, S., et Salunkle, D.K., "Food antioxidants technological, Toxicological and health perspectives. Marcel Dekker, New York", (1996), 101 p.
- 147- Anderson , C.M., Hallberg , A., et Hogberg , T., " Advances in development of pharmaceutical antioxidants. Adv. Drug. Res.28", (1996), 65-180.
- 148- Krinsky, N.I., " Antioxidant functions of carotenoids. Free rad. Biol. Med". 7, (1989), 617-635.
- 149- Ekoumou, C., "Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako", (2003), 145 p.
- 150- Prat, R. ; « Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations ». Edition QUAE, Herman éditeurs, Paris 2007, 56 p.
- 151- Bouquet, A et Paris, R., "« Note sur le *Dionchqbyllum thollonii* baill. », Plantes médicinales et phytothérapie, Tome I", n° 4, (1967), 214- 220.
- 152- Linard, A., Jacquemin,H., et Paris, R. « plantes malgaches n° XXI sur les flavonoides du *Xyris semifuscata* (Xyriadacées) » Plantes médicinales et phytothérapie, Tome X, n°4, (1976), 267-275
- 153-Belkacem Debbou., "Extraction et caractérisation biochimique de l'huile d'argan (*Argania spinosa* L. Skeels), Institut National Agronomique (Alger)", (2002-2003).
- 154- Boubakar Souley Amadou., "Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* perr. Ex DC (Combretacea),Thèse de docteur en pharmacie".(2004),
- 155 - WILLEM, J.P., "Les huiles essentielles, médecine d'avenir", (2004), 318 p.

156- Rakotondramasy, V.C., "Isolement et détermination de structure de deux constituants majoritaires de l'huile essentielle d'une plante endémique de Madagascar : *Plushea aphanantha* Back.(Asteraceae). Diplôme d'Etudes Approfondies en Chimie organique option « Produits Naturels »", (1999).

157- Mimica-Dukic,N., Bozin, B., Sokovic, M. et Simin, N. "Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. Journal Of Agriculture and Food Chemistry",(2004), 52: 2485-2489.

158- Kabouche, A., Kabouche, Z., Bruneau., " Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (poiret) from Algeria. Flavour and Fragrance Journal", (2005), 20:235-236.

159- Kiran, B., Singh, G., "Essential oil composition of damask rose distilled under different pressures and temperature. Flav. Frag". 1, 17,(2002) , 136-140.

160- KOEDAM, A., "The influence of some distillation conditions on essential oil composition in aromatics plants: Basic and applied aspects. Martinus Nijhoff Publishers Netherlands", (1982), 229-236.

161- Mladen, M., Josip, M et Ani, R., " Free and Glycosidically Bound Volatile Compounds from Cypress Cones (*Cupressus Sempervirens* L.). *Faculty of Technology, Laboratory of Organic Chemistry, Teslina 10/V 21000 Split, Croatia* ", (1997).

162- Pingot, A., "Les huiles essentielles. Ed: Tec et Doc", Paris(1998), 230-236.

163- Bendriss Houari., "*Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales : « Ruta chalepensis et Marrubium vulgare ».. thèse de Magister en Génie des procédés Option : Génie chimique*", (2002-2003).

164- AFNOR, "Recueil des normes françaises. Huiles essentielles 2ème édition " Paris, (1986).

165- AFNOR, "Corps gras, graines Oléagineuses, produits dérivés. Recueil des Nonnes Françaises. 5 ème Edition", (1993).

166- "Les huiles essentielles", AFNOR, NFT75 – 104 Juin (1994).

167- Cavalli, J.F., " Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar", Thèse de doctorat en chimie Organique et Analytique ; Université de Corse Pascal Paoli. (2002).

168- Loziene, K., Venkutonis, P.R., "Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*- Biochemical Systematics and Ecology", V.33, (2005), 517-525.

169- Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L.M.I., Hamamouchi, M., " Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers": Fr-Journal of Ethnopharmacology, V.89, (2003) ,165-169.

170- Rasooli, I., Abyaneh, M.R., " Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*", Food Control; V.15; (2004), 479-483.

171- Buckle, J., "Clinical Aromatherapy ". 2nd edition. .Copyright , Elsevier Science, (2003), 72-73.

172- Ackman, R.G., "Some old and problems in capillary gas chromatography (in proceeding of the International Conference on oils, fats and Waxes-fats for the future). Duromark Publishing, Auckland", 171-181.

173- Rouessac, F., Rouessac, A., " Analys chimique, Méthods et Techniques Instrumentales 2ème Edition Masson", (1982).

174- Sandra, P., Bicchi, C., "Capillary gas chromatography in essential oil analysis, Huething, New York", (1987), 31-32, 267-274.

175- Tranchant, J., Gardais. J-F., Borin, P.R., Prevot, A., Serpinet, J., Uniz, G., "Manual Pratique de Chromatographie en phase gazeuse 3éme édition", Paris, (1982).

176- "Wikipedia, encyclopédie en ligne".

http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:Soxhlet_extractor.png.

177- Amrani, O., "Valeur nutritive du Chardon marie (*Silybum marianum*).», Mémoire de magistère Agronomie, université de Batna, (2006).

178- Bauer, S.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Thurck, M., « Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. » *American Journal of Pathology*., V.45, (1966), 493-6.

179- Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumou, C., Bougoudogo, F., " « Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au mali. Ed. Mali Médical", T XXI N° 1, (2006), 18-23

180- Fattouch, S., Caboni, P., Coreneo, V., Tuberness, C., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P., "Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia Oblonga miller*) pulp and peel phenolic extracts, *J.Agr.food.chem*", (2006).

181- Dulger, B., et Gonuz, A., "Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences.*, "7 (9) ,(2004), 1559-1562.

182- Mohammedi, Z., "Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen", (2005), 54-55

183- Parekh, J et Chanda, S., "*In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology.*", V .31 (2007),53-58.

- 184- Rota, M. C., Herrera, A., Martinez, R. M., Sotomayor, J. A. et Jordán, M. J., "Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control.*", 19 , (2008), 681-687.
- 185- "Standardisation de l'antibiogramme En médecine humaine à l'échelle Nationale. Selon les recommandations de l'OMS 5ème édition", (2008).
- 186- Chikhoume, A., "Huiles de thym et d'origan". Thèse de magister en agronomie,(2007).
- 187- Sanchez-Moreno, C., "Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International.* ", 8 (2002). 121-137.
- 188- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S and Altundag, S., " Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten.", (2009).
- 189- Panichayupakaranant, P., et Kaewsuwan, S., "Bioassay-guide isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves". Songklanakarin, J., Sci. Technol. 26(1). (2004), 103-107.
- 190- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitao, G.G., Reis, A .S., Santos, T.C., Coube ,C.S et Leitao, S.G., "Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy-tother. Res.*". 15, (2001), 127-130.
- 191- Paris. R. et Moyse. M., " Précis de matière médicale ". Edit. Masson. Paris, (1965), 412.
- 192- Emmami, S., Asilia, J., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B., Hassanzadeh-Khayyat, M., "Chemical and Antimicrobial Studies of *Cupressus sempervirens* L. and *C. horizontalis* Mill. Essential Oils, (2006)" . Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. Spring, (2006): 2(2): 103-108.

193- Emmami, S.A., Asili, J., Mohagheghi, Z et Hassanzadeh, M.K., "Antioxidant Activity of Leaves and Fruits of Iranian Conifers". Université de sciences médicales, Iran, (2007).

194- Kanko, C., Sawaliho, BE., Kone, S., Koukoua, G., N'guessan, YT., " Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*." , Comptes rendus Chimie 7, (2004),1039–1042

195- Ali, O., Med Salem, O., Boukhary., Ahmedou Ould Houmeida., "Travaux pratiques de biochimie structurale, Deuxième Année Biologie-Géologie". Université de Nouakchott, (2007).

196- Carlos Ramón, V., Francisco, C., José Ramón, V., Javier, V., Oscar, R., Elsa, B., "Actividad antimicrobiana del aceite esencial de bellotas de Ciprés (*Cupressus sempervirens* var *horizontalis*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*". Thèse de magister en Biotechnologie. Mexique, (2010).

197- Kassem, FF., Harraz, FM., El-Sebakhy, NA., Depooter, HL., Shawp, NM., Abou Schleib, H., "Composition of the essential oil of Egyptian *Cupressus semipervirens* L". Flav Frag J (1991), 6: 205-7.

198- Chéraif , I., Ben Jannet, H., Hammami, M., Mighri, Z., "Composition chimique de l'huile essentielle des cones du *Cupressus sempervirens* L." , Poussant en Tunisie. Journal de la Société Algérienne de Chimie. J.Soc.Alger.Chim., (2006), 91-98

199- Senatore, F., D'Agostino, M., and Dini, I., "Flavonoid Glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae)" . Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(7), (2000), 2659-2666.

- 200- Cariel, L et Jean, D., "Proanthocyanidol, Based Composition and its Pharmacological Application". Publication : AT126439T T , (1995).
- 201- Cavin, A.L., " Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains du genre *Detarium* (Fabaceae-Caesalpinioideae) : *D. microcarpum* Guill. Et Perr. Et des formes comestibles et toxiques de *D. seneegalense* J.F.Gmel." ,Thèse de doctorat. Genève, (2007),277.
- 202- Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J., wojdylo, A., "Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap". Food chemistry, (2007), 103: 853-859.
- 203- Service, R.F., "Antibiotics that resist resistance.", Science (1995), 270: 724-727.
- 204- Mukherjee, PK., Saritha, GS., Suresh, B., "Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India (1995)" ., *Phytother. Res.*(2002). 16: 692-695.
- 205- Isman, M.B., "Plant essential oils for pest and disease management". *Crop Prot.* (2000), 19: 603-608.
- 206- Misra, G., Pavlovstathis, S.G., " Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid soil-slurry systems". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*(1997) 7: 572-577.
- 207- Mutai, C., Vagias, C., Abatis, D., Roussis, V., "Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes- *Journal of Ethnopharmacology*", doi: 10.1016/j.jep.02.007.2009.
- 208- Valero, M et Salmeron, M.C., "Antifungal activity of different cinnamon extracts. *Journal de Mycologie Médicale*"; Vol.15; (2009), 220-229.

- 209- Faucher, J.L., Avril, J.L., "Bactériologie générale et médicale". Tome1. Ellipses (Ed). Paris,(2002), 214 p.
- 210- Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N.S., Abrini, J., "Thymus essential oils : Chemical composition and in vitro antioxydant and antibacterial activities.", Congr  international de Biochimie, Agadir. (2006).
- 211- Deans, S.G et Ritchie, G., "Antibacterial proprieties of plant essential oils". International Journal of Food Microbiology,(1987), 5,162-180.
- 212- Fleurette, J., Freney, J., Reverdy, M.E., "Antiseptique et d sinfection.", ESKA, (1995), 199-221.
- 213- Pibiri, M.C., "Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles". Thèse Doctorat, Lausanne, Canada, ,(2006). 177 p.
- 214- Budavari, S (ed)., "The Merck Index, 12th ed.Whitehouse Station, NJ: Merck & Co Ltd ". (1996).
- 215- Scalbert, A., "Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* ", (1991), 30:3875-3883.
- 216- Elegami, A.A., Elnino, E.I., Eltohami, M.S., Muddathist, K.,. " Antibacterial activity of some species of family Combretaceae ". *Phytotherapy research*, (2002), 16:555-561.
- 217- Hatano, T., Kusuda, M., inada, K., Ogawa,T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T.,. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, (2005), 66:2047-2055.

218- Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumon, C., Bougoudougou, F., "Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali.", *Mali Medical*, (2006), 1 :18-24.

219- Surveswaran, S., Cai, Z.Y., Cark, H., Sun, M., "Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 indian medicinal plants. ",*Food chemistry*, (2007), 102: 938-953.

220- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E and Plmas, F., "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils-Letters in Applied Microbiology "; V.29, (1999), 130-135.

221- Yang, J.K., Choi, M.S., Seo, W.T., Rinker, D.L., Han, S.W., Cheong, G.W., "Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtusa* leaf essential oil". *Fitoterapia*, (2007), 78: 149-152.

222- Demirci, B., Kosar, M., Demirci, F., Dinc, M., Baser, K.H.C., " Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss et Kotschy. *Food Chem.*(2007). 105:1512-151

223- Marino, M., Bersani, C., Comi, G., "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae". *Int.J.Food Microbiol*, (2001),67: 187-195.

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

225- Amakura, Y., Umino, Y., Tsuji, S., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., "Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. ",*Food Chem*, (2002), 77:47–56.

226- Da Silva, J.M.R., Darmon, N., Fernandez, Y., Mitjavila, S., "Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. ", *J Agric Food Chem*, (1991), 39:1549–52.

227- Pére ,M.B., Calderón, N. L. et Croci, C. A., "Radiation–induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary (*Rosmarinus officinalis L*).", *Food chemistry.*, (2007), 104 :585-592.

228- Molyneux, P., "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity ". *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2), 211-219.

229- Parakash, D., Upadhyay, G ., Brahma, N., Singh, H.B., " Singh antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*) ". *Food Chemistry*, (2007), 104:783-790.

230- Ruberto, G., et Baratta, M. T., "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems ". *Food Chemistry*, 69, (2000), 167–174.

231-Jukié, M et Miloš, M., "Catalytic Oxidation and properties of thyme essential oils (*Thymus vulgarae L.*) ". *Croatia Chemica Acta.* 78 (1), (2005), 105-110.

232- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traré, A., Coulibaly, K., Maïga, A. (2004). "Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* lam.(Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali." , *C.R.Chimie*,7 :1073-1080.

233- De Bruyne, T., Pieters., Deelstra, H., Vlietink., "A Condensed vegetable tannins :Biodiversity and biological activities." , *Biochemical Systematics and Ecology*,(1999).27 :445- 459.

234- Harborne, J.B., "The flavonoids advances in Research." , Chapman and Hall, London,(1993). 460-463.

235- Kassem, F. F., Harraz, F. M., El-Sebakhy, N. A., De Pooter, H. L., Schamp, N.M., Abu-Shleib, H., "Composition of the essential oil of Egyptian *Cupressus sempervirens* L. cones." , *Flavour Fragmentation Journal* 6, (1991): 205-207.

236- Ibrahim, N.A., El-Seedi, H.R., et Mohammed, M.M., "Phytochemical investigation and hepatoprotective activity of *Cupressus sempervirens* L. leaves growing in Egypt." , *Nat Prod Res* 21, (2007), 857p.

237- Rizk, M.Z., M.S., Abdallah, H.M., Sharara, S.A., Ali, N.A., Ibrahim and M.M. Moustafa., "Efficiency of *Cupressus sempiverens* L. and *Juniperus phoenicea* against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats". *Trends Med. Res.*, (2007), 2: 83-94.