

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et De La Recherche Scientifique*



*Université Blida-1-*  
*Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie*  
*Département de Biologie des Populations et des Organismes*  
*Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du*  
*Diplôme de Master En Biologie*  
*Option:*  
*Phytothérapie et Santé*  
*Thème:*

**Etude phytochimique et Evaluation thérapeutique  
d'une plante médicinale *Tetraclinis articulata*  
(Le Thuya de Berbérie)**

**Présenter par:**

M<sup>lle</sup> TAHRAOUI Nacéra

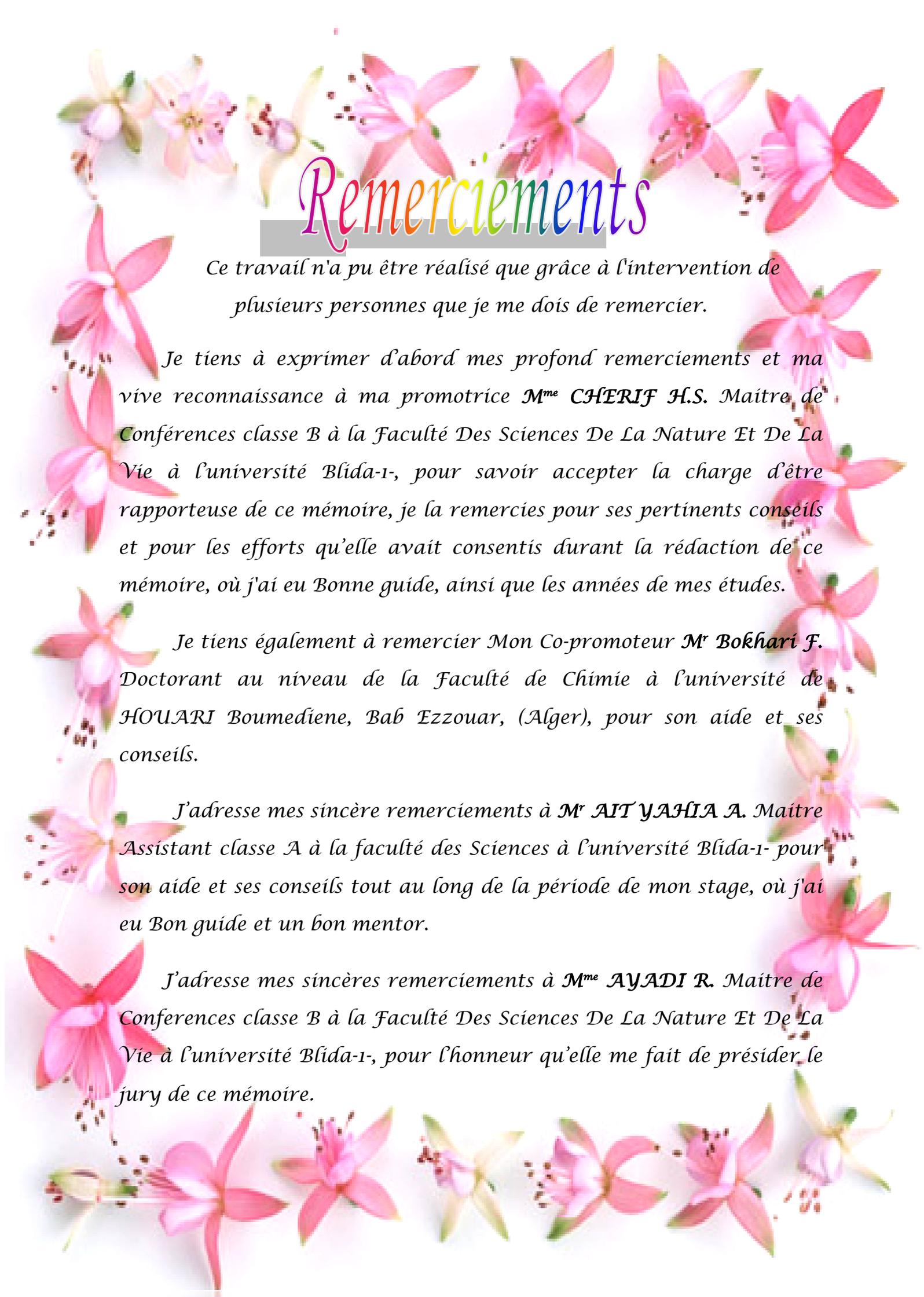
**Date de soutenance:**

15-10 -2014

**Devant le jury:**

M <sup>me</sup> AYADI R.	MCB	UB-1-	Présidente
M <sup>me</sup> KEBBAS S.	MAA	UB-1-	Examinatrice
M <sup>r</sup> ROUIBI A.	MCA	UB-1-	Examineur
M <sup>me</sup> CHERIF H.S.	MCB	UB-1-	Promotrice
M <sup>r</sup> BOUKHARI F.	Doctorant	USTHB	Co-promoteur
M <sup>r</sup> AIT YAHIA A.	MAA	UB-1-	Invité

*Promotion: 2013/2014*



# Remerciements

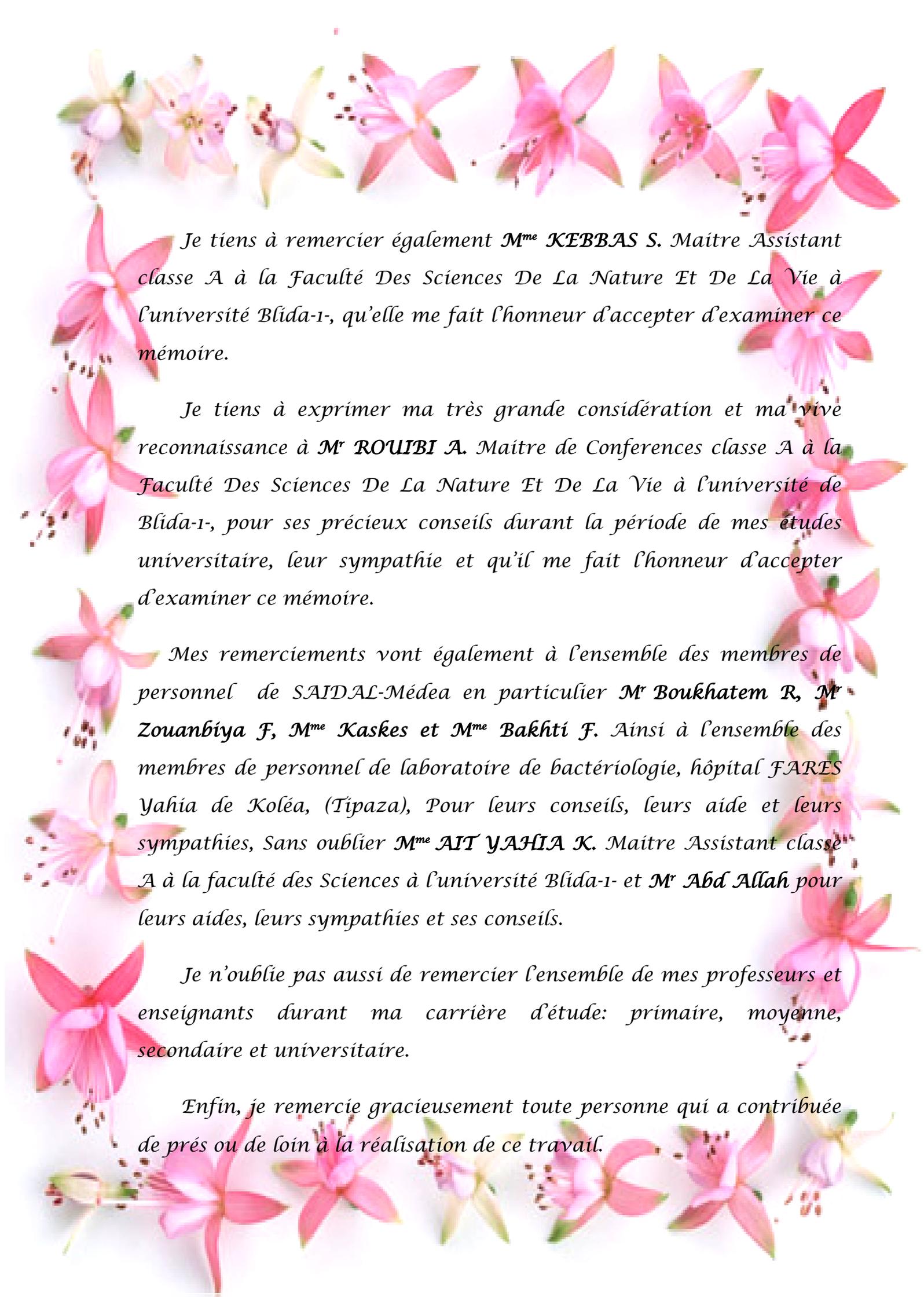
*Ce travail n'a pu être réalisé que grâce à l'intervention de plusieurs personnes que je me dois de remercier.*

*Je tiens à exprimer d'abord mes profond remerciements et ma vive reconnaissance à ma promotrice **M<sup>me</sup> CHERIF H.S.** Maître de Conférences classe B à la Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie à l'université Blida-1, pour savoir accepter la charge d'être rapporteuse de ce mémoire, je la remercie pour ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle avait consentis durant la rédaction de ce mémoire, où j'ai eu Bonne guide, ainsi que les années de mes études.*

*Je tiens également à remercier Mon Co-promoteur **Mr Bokhari F.** Doctorant au niveau de la Faculté de Chimie à l'université de HOUARI Boumediene, Bab Ezzouar, (Alger), pour son aide et ses conseils.*

*J'adresse mes sincère remerciements à **Mr AIT YAHIA A.** Maître Assistant classe A à la faculté des Sciences à l'université Blida-1- pour son aide et ses conseils tout au long de la période de mon stage, où j'ai eu Bon guide et un bon mentor.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **M<sup>me</sup> AYADI R.** Maître de Conférences classe B à la Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie à l'université Blida-1-, pour l'honneur qu'elle me fait de présider le jury de ce mémoire.*



*Je tiens à remercier également **M<sup>me</sup> KEBBAS S.** Maître Assistant classe A à la Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie à l'université Blida-1, qu'elle me fait l'honneur d'accepter d'examiner ce mémoire.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à **Mr ROUBI A.** Maître de Conférences classe A à la Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie à l'université de Blida-1, pour ses précieux conseils durant la période de mes études universitaires, leur sympathie et qu'il me fait l'honneur d'accepter d'examiner ce mémoire.*

*Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de personnel de SAIDAL-Médeca en particulier **Mr Boukhatem R,** **Mr Zouanbiya F,** **M<sup>me</sup> Kaskes** et **M<sup>me</sup> Bakhti F.** Ainsi à l'ensemble des membres de personnel de laboratoire de bactériologie, hôpital FARES Yahia de Koléa, (Tipaza), Pour leurs conseils, leurs aides et leurs sympathies, Sans oublier **M<sup>me</sup> AIT YAHIA K.** Maître Assistant classe A à la faculté des Sciences à l'université Blida-1- et **Mr Abd Allah** pour leurs aides, leurs sympathies et ses conseils.*

*Je n'oublie pas aussi de remercier l'ensemble de mes professeurs et enseignants durant ma carrière d'étude: primaire, moyenne, secondaire et universitaire.*

*Enfin, je remercie gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



# Dédicaces

*Je dédie humblement ce manuscrit :*

*À l'esprit de mon très cher père.*

*À ma très chère mère, pour leur encouragement, présence et sacrifice et leur soutien tout au long de mes études, j'espère qu'elle trouvera dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*À mes chers frères: Mohamed, Abd El-Kader, Amhamed, Ibrahim, Ismail et tous son épouses.*

*À tous mes oncles et leurs épouses.*

*À ma tante Yamina et son époux El-Hadj.*

*À ma très chère promotrice M<sup>me</sup> CHERIF H.S.*

*À mes amis (e) : Bahia, Cherifa, Rahma, Chaïma, Assia, Amina, lina, Khawla, bouchra, Sara, Afef, Imen, Mohamed, Mahfoud, Abd El-Hamid, Hmidat, Youcef et Mahdi.*

*À toute la famille : TAHRAOUI.*

*Et enfin à tous les étudiants de ma promotion sans exception.*

# Nacéra





# Résumé

*Tetraclinis articulata* communément appelé en Algérie Aaraar (عرعار), est une plante spontanée à caractère thérapeutique, très répandue dans l'Afrique du nord.

Cette étude porte sur une analyse phytochimique et des examens pharmacologiques et microbiologiques, effectués sur deux extraits (Huile essentielle et l'infusé) des feuilles et des cônes de *T. articulata* (Thuya de Berbérie).

La teneur en eau est de 65% pour les feuilles et 68% pour les cônes, le screening phytochimique, nous a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires tels que: les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tanins, les flavonoïdes, les coumarines, les alcaloïdes et les saponosides. L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de l'infusé de *T. articulata* a montré la présence de l'acide gallique pour les acides phénols, vanilline pour les tanins et la quercétine pour les flavonoïdes.

La composition chimique de l'huile essentielle (H.E) extraite des cônes de *T. articulata* a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM). Trente constituants, représentant 93.072% de l'huile essentielle ont été identifiés. Les composés majoritaires sont :  $\alpha$ -Pinène (41,513%), D-Limonene (23,5%), Germacrene D (7,715%),  $\alpha$ -Myrcene (4,616%).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose, a montré que l'huile des feuilles est très active contre *B. subtilis* et *S. epidermidis*, active contre *C. albicans* et *S. cerevisiae*, modérément active contre *E. coli*. Alors que l'H.E des cônes est active contre *B. subtilis*, moyennement active contre *S. epidermidis*. En effet, l'infusé présente une activité inhibitrice moyenne sur la croissance de certains germes microbiens comme *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* et *S. aureus*.

L'H.E des feuilles testée par la méthode de Micro-atmosphère, s'est révélée active contre *B. subtilis* et *S. epidermidis*. Contrairement, l'H.E des cônes ne possède aucune activité inhibitrice vis-à-vis toutes les souches microbiennes.

En outre, l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) de l'infusé a montré que ce dernier possède un pouvoir antioxydant modéré. Cependant par la méthode de DPPH, l'infusé et l'H.E de *T. articulata* montrent un fort pouvoir antioxydant.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire a montré que l'infusé de *T. articulata* est efficace pour les doses administrées aux souris contre les inflammations causées par la Carraghénine.

De même, l'infusé de *T. articulata* a montré un bon effet antispasmodique contre les douleurs causées par l'injection de l'acide acétique.

**Mots clés :** *Tetraclinis articulata*, analyse phytochimique, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, effet antispasmodique.

# ملخص

*Tetraclinis articulata* يعرف في الجزائر باسم عرعار (Aaraar), نبات عفوي ذو طابع علاجي ينتشر على نطاق واسع في شمال أفريقيا.

تشمل هذه الدراسة تحليلا كيميائيا نباتيا، و اختبارات صيدلانية و ميكروبيولوجية، أجريت على محلولين (الزيت الطيار والمستخلص المائي).

كمية الماء هي 65% بالنسبة للأوراق و 68% بالنسبة للمخاريط، الفحص الكيميائي اثبت لنا وجود عدة مركبات ثانوية مثل: انتوسيان، لوكو انتوسيان، التانين، الفلافونويد، الكومارين، الكلويد، الصبونين. أظهر تحليل أجرته عالية الأداء اللوني السائل (HPLC) من المستخلص المائي *T. articulata* وجود حمض الغال بالنسبة للأحماض الفينولية، فانيليا بالنسبة، التانين وكيرسيتين بالنسبة الفلافونويد.

التركيب الكيميائي للزيت الأساسي المستخرج من المخاريط من *T. articulata* بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا الغازية الى جانب قياس الطيف الكتلي تم تحديد ثلاثين مكون تمثل 93.072% من الزيت الأساسي المركبات الرئيسية هي:  $\alpha$ -Pinène (41,513%), D-Limonene (23,5%), Germacrene D (7,715%),  $\alpha$ -Myrcene (4,616%).

تقييم نشاط الميكروبات عن طريقة نشر جيلوز، بين أن زيت الأوراق جد فعال ضد *S. epidermidis* و *B. subtilis* فعال ضد *C. albicans* و *S. cerevisiae* معتدل الفعالية ضد *E. coli*, بينما زيت المخاريط فعال ضد *B. subtilis* متوسط الفعالية ضد *S. epidermidis*, و فيما يخص المستخلص المائي بين انه يحتوي على نشاط متوسط على نمو بعض الكائنات الميكروبية مثل: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* et *S. aureus*.

بين الزيت الأساسي للأوراق المختبرة بتقنية مايكرو-الغلاف الجوي انه فعال ضد، في المقابل فان الزيت الأساسي للمخاريط ليس له فاعلية ضد في مواجهة كل السلالات الميكروبية.

بالإضافة إلى ذلك، أظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة عن طريقة إرجاع الحديد (FRAP) للمستخلص المائي أنه يحتوي على مضادات الأكسدة. و من خلال طريقة DPPH، للمستخلص المائي و الزيت الأساسي م *T. arti culata* تظهر مضادات الأكسدة القوية.

أظهرت دراسة النشاط المضاد للالتهابات للمستخلص المائي عن فعالية الجرعات المعطاة للفئران ضد الالتهابات الناجمة عن الكاراجينان.

و بالمثل، اظهر المستخلص المائي تأثير جيد للتشنج ضد الألم الناجم عن حقن حمض الخليك.

**الكلمات المفتاحية:** *Tetraclinis articulata*, التحليل الكيميائي النباتي، النشاط المضادة للجراثيم، النشاط المضادة للأكسدة، المضادة للالتهابات، مضاد للتشنج.

# Abstract

*Tetraclinis articulata* commonly called in Algeria Aaraar (عرعار), is spontaneous plant therapeutic character, very widespread in North Africa.

This study focuses on phytochemical and pharmacological analysis and microbiological examinations performed on two extracts (essential oil and infused) leaves and cônes of *Tetraclinis articulata* (Arbor-vitae).

The water content is 65% for leaves and 68% for cônes, the phytochemical screening allowed us the presence of secondary metabolites such as : anthocyanins, leuco anthocyanins, tannins, flavonoids, coumarins, alkaloids and the saponins. Analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) of infused *T. articulata* showed the presence of gallic acid to the phenolic acids, tannins for vanillin and quercetin for flavonoids.

The chemical composition of the essential oil (E.O) extracted from the cones of *T. articulata* was studied by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). Thirty constituents, representing 93,072% of the essential oil were identified. The major compounds are:  $\alpha$ -pinene (41.513%), D-Limonene (23.5%), germacrene D (7.715%),  $\alpha$ -myrcene (4.616%).

The evaluation of the antimicrobial activity by the agar diffusion method, showed that the oil from the leaves, is very active against *B. subtilis* and *S. epidermidis*, active against *C. albicans* and *S. cerevisiae*, moderately active against *E. coli*. While essential oil for cônes is active against *B. subtilis*, moderately active against *S. epidermidis*. Indeed, the brewed inhibitory activity has an average growth of certain microbial organisms such as *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. epidermidis*.

The essential oil tested by the method of Micro-atmosphere leaves, proved active against *B. subtilis* and *S. epidermidis*. In contrast, the essential oil cônes has no inhibitory activity against a-vis all the microbial strains.

In addition, the evaluation of the antioxidant activity by the method of reducing iron (FRAP) of brewed showed that it has a moderate antioxidant. However, by the method of DPPH, infused and essential oils of *T. articulata* show a strong antioxidant.

The study of anti-inflammatory activity showed that the infused *T. articulata* is effective doses administered to mice against inflammation caused by Carraghénine.

Similarly, infused *T. articulata* showed good antispasmodic effect against pain caused by the injection of acetic acid.

**Keywords:** *Tetraclinis articulata*, phytochemical analysis, antimicrobial activity, antioxidant activity, anti-inflammatory, antispasmodic effect.

# Glossaire

**Anti-catarrhale** : qui lutte contre une inflammation des muqueuses entraînant des écoulements (nez, bronches, toux). Une huile essentielle anti-catarrhale aide à éliminer cet écoulement par une action mucolytique et expectorante.

**Astringent** : substance qui provoque la contraction des tissus et des vaisseaux sanguins et stimule la coagulation du sang. Il permet de resserrer les tissus.

**Contraction musculaire** : La contraction musculaire désigne une contraction involontaire et coordonnée d'un ensemble de fibres et de cellules musculaires au sein d'un muscle. Elle intervient généralement dans le cadre d'une activité sportive et se présente comme une sensation de raideur douloureuse au niveau d'un muscle. Elle se distingue de la simple crampe musculaire par une gêne ressentie sur une durée plus longue. Le muscle doit alors être mis au repos et les douleurs peuvent être traitées par des étirements, des massages ou l'application de pommades et compresses chaudes.

**Hydrolats** : se sont des eaux aromatiques parfois appelées eau florale, qui contiennent des molécules d'H.E. à l'état de traces. C'est l'eau qui reste après la séparation entre l'H.E. et l'eau qui a été chargée en molécules aromatiques.

**Maladie infectieuse** : est une maladie provoquée par la transmission d'un microorganisme, virus, bactérie, parasite.

**Monoïque** : Plante monoïque, plante qui porte des fleurs mâles et des fleurs femelles séparées les unes des autres, mais sur un même pied.

**Principe actif** : Le principe actif d'une plante médicinale est les composants présents dans cette plante, il lui donne son activité thérapeutique. Ces composants sont souvent en quantité extrêmement faible dans la plante: ils représentent quelques pourcent à peine du poids total de celle-ci, mais ce sont eux qui en sont l'élément essentiel.

**Squamiforme** : En forme d'écaille. Du latin *Squam* : écaille.

D'après Brosse, (2004) ; Lambinon et al. ( 2004) ; Marouf et Reynaud, ( 2007).

# *Liste des abreviations*

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**CG-SM** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

**CNRC** : Centre National du Registre de Commerce.

**DPPH** : 2-2- diphenyl picryl-1-hydrazyl.

**ENSA** : Ecole Nationale des Sciences Agronomiques.

**ENSE** : Ecole Nationale Supérieure d'Enseignement.

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure féérique.

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxydant Power.

**H.E** : Huile Essentielle.

**HPLC** : High-Performance Liquid Chromatography.

**I<sub>A</sub>** : Indice d'acide.

**I<sub>E</sub>** : Indice d'ester.

**I<sub>R</sub>** : Indice de réfraction.

**I<sub>S</sub>** : Indice de saponification.

**LPS** : Lipo-Polysaccharide.

**M.H** : Muller Hinton.

**M.S** : Matière sec.

**ONAB** : Office National des Aliments du Bétail.

**PSM** : Postes de Sécurité Microbiologique.

**S.M**: Solution mère.

**S.A** : Soja agar.

**TSA** : Trypticase Soy Agar.

**Vit C** : Vitamine C.

**% d'I** : Pourcentage d'inhibition.

# liste des figures

<b>Figure 1</b> : Aire de répartition de <i>T. articulata</i> en région méditerranéenne .....	9
<b>Figure 2</b> : Allure générale de <i>T. articulata</i> .....	10
<b>Figure 3</b> : Branches de <i>T. articulata</i> .....	12
<b>Figure 4</b> : Ecorce de <i>T. articulata</i> .....	12
<b>Figure 5</b> : Rameaux feuillés de <i>T. articulata</i> .....	12
<b>Figure 6</b> : Feuilles de <i>T. articulata</i> .....	12
<b>Figure 7</b> : Cônes de <i>T. articulata</i> (A : Cônes verts, B : Cônes à maturité) .....	12
<b>Figure 8</b> : Schéma général de la procédure expérimentale effectuée sur le <i>T. articulata</i> .....	22
<b>Figure 9</b> : Montage d'hydrodistillation (Clevenger).....	Annexe II
<b>Figure 10</b> : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri .....	34
<b>Figure 11</b> : Illustration de la méthode micro-atmosphères sur boîte de Pétri .....	35
<b>Figure 12</b> : Protocole de détermination du pouvoir réducteur .....	37
<b>Figure 13</b> : Forme libre et réduite du DPPH .....	38
<b>Figure 14</b> : Différentes étapes d'essai de l'activité anti-inflammatoire.....	41
<b>Figure 15</b> : Résumé des différentes étapes de l'activité antispasmodique .....	43
<b>Figures 16</b> : Teneur en eau des organes végétaux du <i>Tetraclinis articulata</i> .....	44
<b>Figure 17</b> : Test de l'identification colorimétrique de quelques métabolites secondaires de <i>T. articulata</i> .....	Annexe III
<b>Figure 18</b> : Profil chromatographique des composés présents dans le <i>T. articulata</i> détecté par H.P.L.C .....	47
<b>Figure 19</b> : Huile essentielle de <i>T. articulata</i> (A : L'H.E des feuilles, B : L'H.E des cônes).....	Annexe III
<b>Figure 20</b> : Profil chromatographique d'analyse par CG/MS de l'H.E. des cônes de <i>Tetraclinis articulata</i> .....	51
<b>Figure 21</b> : Activité inhibitrice vis-à-vis les bactéries à Gram (-): <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	55

<b>Figure 22:</b> Activité inhibitrice vis-à-vis les bactéries à Gram (+): <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
<b>Figure 23:</b> Activité inhibitrice vis-à-vis les levures: <i>Candida albicans</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	57
<b>Figure 24 :</b> Tubes contenant des réactions d'activité antioxydante par la méthode de FRAP.....	Annexe III
<b>Figure 25:</b> Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et l'extrait aqueux en fonction des différentes concentrations.....	60
<b>Figure 26 :</b> Solution de DPPH.....	Annexe III
<b>Figure 27 :</b> Tubes contenant des réactions d'activité antioxydante par la méthode de DPPH (A : avant d'ajouter la solution de DPPH, B : après d'ajouter la solution de DPPH).....	Annexe III
<b>Figure 28 :</b> Pourcentage d'inhibition des échantillons testés en fonction de différentes concentrations.....	61
<b>Figure 29 :</b> Moyenne des pattes gauches et droites pour les quatre lots.....	62
<b>Figure 30 :</b> Pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les quatre lots.....	63
<b>Figure 31 :</b> Moyenne du nombre de spasmes pour chaque lot pendant 10 minutes...	64
<b>Figure 32 :</b> Pourcentage de réduction du nombre de spasmes chez les souris traitées par rapport aux témoins.....	65

# Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Composition chimique de certaines essences de <i>T. articulata</i> étudiées ultérieurement.....	Annexe I
<b>Tableau II</b> : Caractéristiques de la cueillette (récolte).....	19
<b>Tableau III</b> : Souches utilisées.....	21
<b>Tableau IV</b> : Conditions opératoire d'H.P.L.C .....	27
<b>Tableau V</b> : Teneur en eau de <i>T. articulata</i> .....	Annexe III
<b>Tableau VI</b> : Résultats du test colorimétrique de quelques métabolites secondaires existants chez <i>T. articulata</i> .....	45
<b>Tableau VII</b> : Caractéristiques chromatographiques des composés détectés chez <i>T. articulata</i> à 254 nm.....	48
<b>Tableau VIII</b> : Rendement en huile essentielle du <i>T. articulata</i> .....	48
<b>Tableau IX</b> : Caractères organoleptiques de l'H.E. du <i>T. articulata</i> .....	49
<b>Tableau X</b> : Indices chimiques de l'H.E. du <i>T. articulata</i> .....	50
<b>Tableau XI</b> : Composition chimique de l'H.E. des cônes de <i>T. articulata</i> .....	52
<b>Tableau XII</b> : Diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes.....	54
<b>Tableau XIII</b> : Méthode de FRAP de <i>T. articulata</i> .....	Annexe III
<b>Tableau XIV</b> : Méthode de DPPH de <i>T. articulata</i> .....	Annexe III
<b>Tableau XV</b> : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot témoin (l'eau distillée).....	Annexe III
<b>Tableau XVI</b> : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot produit de Référence.....	Annexe III
<b>Tableau XVII</b> : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot de l'infusé (50mg/ml).....	Annexe III
<b>Tableau XVIII</b> : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot de l'infusé (100mg/ml).....	Annexe III
<b>Tableau XIX</b> : Nombre de spasmes et le pourcentage de réduction du nombre de spasmes.....	Annexe III

# Table de Matières

## Introduction

## *Chapitre I : Partie bibliographique*

### **I.1. Plantes médicinales et phytothérapie**

I.1.1. Historique .....	3
I.1.2. Définition des plantes médicinales .....	4
I.1.3. Intérêt des plantes médicinales .....	4
I.1.4. Action des plantes médicinales.....	4
I.1.5. Définition de la phytothérapie.....	5
I.1.6. Avantages de la phytothérapie.....	5
I.1.7. Place de la phytothérapie en Algérie.....	6

### **I.2. Etude Botanique**

I.2.1. Généralités .....	7
I.2.2. Généralités sur le Thuya de Berbérie.....	7
I.2.3. Étymologie.....	8
I.2.4. Systématique.....	8
I.2.5. Répartition géographique.....	8
I.2.6. Description morphologique.....	9
I.2.7. Culture.....	13
I.2.8. Propriétés de Thuya de Barbarie.....	13
I.2.9. Composition chimique.....	13

### **I.3. Activités biologiques étudiées**

I.3.1. Activité antimicrobienne.....	14
I.3.2. Activité antioxydante.....	15
I.3.3. Activité anti-inflammatoire.....	17
I.3.4. Activité antispasmodique.....	18

## *Chapitre II : Matériel et méthodes*

### **II.1. Matériel**

II.1.1. Matériel biologique.....	19
II.1.1.1. Matériel végétal.....	19
II.1.1.2. Matériel animal.....	20
II.1.1.3. Microorganismes étudiées.....	20
II.1.2. Matériel non biologique.....	21

## II.2. Méthodes

<b>II.2.1. Etude phytochimique</b> .....	23
II.2.1.1. Détermination de la teneur en eau (humidité).....	23
II.2.1.2. Potentiel d'Hydrogène de l'extrait aqueux (pH).....	23
II.2.1.3. Identification colorimétrique de quelques métabolites secondaires....	24
II.2.1.4. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)...	26
<b>II.2.2.1. Extraction de l'huile essentielle de <i>Tetraclinis articulata</i></b> .....	27
II.2.2.1. Détermination du rendement.....	28
II.2.2.3. Etude analytique de l'huile essentielle.....	28
II.2.2.4. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).	31
<b>II.2.3. Evaluation des activités biologiques</b>	
II.2.3.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	32
II.2.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	35
II.2.3.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	39
II.2.3.4. Evaluation de l'activité antispasmodique.....	42

## Chapitre III : Résultats et Discussion

<b>III.1. Résultats de l'étude phytochimique</b> .....	44
III.1.1. Teneur en eau de la plante.....	44
III.1.2. Potentiel d'Hydrogène de l'extrait aqueux (pH).....	45
III.1.3. Identification de quelques métabolites secondaires.....	45
III.1.4. Résultats de l'analyse par chromatographie liquide à haute performance...	47
<b>III.2. Résultats du rendement et analyse physico-chimique de l'huile essentielle de <i>Tetraclinis articulata</i></b> .....	48
III.2.1. Rendement en huile essentielle de <i>Tetraclinis articulata</i> .....	48
III.2.2. Caractères physico-chimiques.....	49
III.2.3. Compositions chimiques de l'huile essentielle par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).....	51
<b>III.3. Résultats des activités biologiques</b> .....	53
III.3.1. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	53
III.3.2. Résultats de l'activité antioxydante.....	59
III.3.3. Résultats de l'activité anti-inflammatoire.....	62
III.3.4. Résultats de l'activité antispasmodique.....	64
<b>Conclusion</b> .....	66

## Références bibliographiques

## Annexes

## *Introduction*

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus, d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme (**Baba-Aissa, 2000**). De nos jours, plus de 10 000 espèces de plantes différentes sont utilisées à des fins thérapeutiques, et de nombreux médicaments sont élaborés à partir de leurs principes actifs (**Delille, 2007**). La valorisation de ces ressources naturelles passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles (**Naas, 1974 ; Bouzouita et al., 2008**).

L'Algérie, de par son aire géographique et sa diversité climatique riche en flore naturelle, recèle d'une gamme importante de plantes médicinales et aromatiques, faisant partie du grand patrimoine végétal de ce pays (**Baba-Aissa, 2000**). Parmi ces plantes médicinales, il y a le Thuya de Berbérie « *Tetraclinis articulata* », un arbre endémique de l'Afrique du nord occidentale, et qui constitue un élément important de la végétation magrébine (Maroc, Algérie et Tunisie) (**Haddad et al., 2006**).

Le Thuya de Berbérie contient des huiles essentielles possédant plusieurs propriétés thérapeutiques à savoir : l'activité antioxydante et anti-inflammatoire (**Bourkhiss et al., 2010**), il est particulièrement utilisé pour ces propriétés anti-infectieuses (antibactériennes et antifongiques) (**Bourkhiss et al., 2007**). Il présente aussi des propriétés antivirale, anti-catarrhale, astringente, diurétique expectorante, hémostatique et sédatif urinaire (**Baba-Aissa, 2011**).

Plusieurs études ont porté sur la caractérisation de l'huile essentielle de Thuya de Berbérie et les activités biologiques dans différents pays du bassin méditerranéen notamment au Maroc (**Bourkhiss et al., 2007 ; Bourkhiss et al., 2010**), en Algérie (**Abi-Ayad et al., 2011**), en Tunisie (**Tékaya-Karaoui et al., 2007 ; Herzi et al., 2013**), et en Espagne (**Ait Igri et al., 1990**).

Dans le but de contribuer à la valorisation de la flore algérienne en vue d'identifier de nouvelles substances potentiellement intéressantes sur les plans biologiques et thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et à l'évaluation thérapeutique d'une plante médicinale *Tetraclinis articulata* (Le Thuya de Berbérie) qui est très répandue en Algérie. Pour ce faire les objectifs que nous nous sommes assignés sont:

- Etude phytochimique de *Tetraclinis articulata*.
- Obtention de l'huile essentielle et calcul du rendement.
- Etude de quelques activités biologiques à savoir : antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et antispasmodique.

## I.1. Plantes médicinales et phytothérapie

### I.1.1. Historique

Les plantes médicinales sont utilisées depuis la nuit des temps à des fins thérapeutiques et sont à l'origine de la médecine moderne (**Ernst et Pittler, 2005**). Depuis les temps les plus reculés et sur tous les continents, l'homme a cherché chez les végétaux sa nourriture et ses remèdes (**Iserin et al., 2001 ; Ollier, 2011**).

La première ordonnance connue au III<sup>ème</sup> millénaire avant Jésus-Christ, en Mésopotamie, prescrivait déjà des remèdes à base de saule blanc pour soigner les maux de tête. Les Chinois connaissaient, bien avant notre ère la préparation des extraits qui consistait à rassembler sous masse réduite tous les principes solubles des drogues en se débarrassant ainsi du volume fort encombrant des matières inertes (**Kassel, 1996**).

Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie tels que : **Abu Bakr al-Razi ou Rhazès (865-925)**. Il fut suivi par **Ibn Sina** et **Ibn al Baytar**. Ce sont les Arabes qui donnèrent à la pharmacie son caractère scientifique. Les traditions pharmaceutiques arabes passèrent en Europe et influencèrent profondément les grandes universités au 9<sup>ème</sup> siècle (**Fouché et al., 2000**).

Au XVIII<sup>ème</sup> siècle enfin, les plantes acquièrent leurs identités. En effet, un double nom latin indique le genre et l'espèce, grâce aux travaux de Carl Von Linné. Celui-ci systématise l'utilisation de la dénomination binominale (le genre suivi de l'espèce) (**Keller-Didier, 2004**).

Au début du siècle dernier, la médecine occidentale commence à influencer les pratiques traditionnelles en Chine et en Inde. A la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, le commerce de l'herboristerie commence à être réglementé (**Iserin et al., 2001**).

Actuellement, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité prouvée et les bienfaits incontestables de la phytothérapie pour la santé lui ont permis d'entrer dans la vie quotidienne (**Iserin et al., 2001**).

### **I.1.2. Définition des plantes médicinales**

Les plantes sont dites médicinales lorsqu'un de leurs organes (feuilles, fleurs, racines, tiges, graines et fruits) possèdent des activités pharmacologiques, ou possèdent au moins une partie ayant des propriétés médicamenteuses (Sallé, 1991 ; Bruneton, 1999). Ces dernières renferment un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (Schauenberg, 2005).

### **I.1.3. Intérêt des plantes médicinales**

Les plantes médicinales tiennent une place importante dans maints systèmes thérapeutiques (Grünwald et Janicke, 2004). D'après l'OMS, (2003), le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt à travers le monde. En Chine, 40% environ de l'ensemble des soins s'inspirent de la médecine populaire. En Amérique latine plus de 50% de la population ont recours à cette thérapie.

L'utilisation des plantes médicinales est très courante, non seulement dans beaucoup de médecine traditionnelles, comme la médecine chinoise et tibétaine, mais elle se trouve aussi chez la plupart des peuples dit « primitifs » d'Afrique et d'Océanie (Fintelman et Weiss, 2004).

De nos jours, l'usage des plantes médicinales est fréquent sur toutes les zones rurales des pays du Maghreb, notamment au Maroc où le recours à ces plantes atteint jusqu'à 70% de la population (Mohammedi, 2006).

### **I.1.4. Action des plantes médicinales**

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (Iserin et al., 2007).

En effet, les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (Hans, 2007). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il ya un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie (Farns et al., 1986). On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : les plante médicinales présentent, en effet, des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (Iserin et al., 2007).

Une plante médicinale est utilisée sous forme de poudre, d'extrait, de teinture, d'infusion, de décoction, de comprimés, crèmes ou pommades (**Sophie et Ehrhart, 2003; Sebai et Boudali, 2012**) (**Annexe I**). L'utilisation de la plante entière est très importante. A la différence du chercheur en pharmacie, l'herboriste n'isole pas certains principes actifs d'une plante, mais il les utilise en association avec tous les autres composants chimiques complexes trouvés dans la même plante (**Davis, 2006**).

### **I.1.5. Définition de la phytothérapie**

Selon **Roland, (2002)**, la phytothérapie est le traitement par les plantes. Etymologiquement, la phytothérapie vient du grec : **phyton** signifie plantes, et **thérapie** signifie soin et cure.

**Gahbiche, (2009)**, distingue deux types de phytothérapie :

- ❖ **Une pratique traditionnelle**, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. D'après l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.
- ❖ **Une pratique basée sur les avancées scientifiques**, qui recherche des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés.

La phytothérapie moderne est une ramification de la médecine classique. Elle est fondée sur l'emploi de substances actives d'origine végétale, en partie ou en totalité ; on parle alors de substance isolée (**Grünwald et Janicke, 2004**).

### **I.1.6. Avantages de la phytothérapie**

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. Le traitement par les plantes revient en premier lieu, pour lutter contre la résistance des bactéries aux antibiotiques (**Winckle, 2006**). De tout temps à l'exception de ces dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (**Iserin et al., 2001**).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car la phytothérapie propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme (**Hamdi et al., 2002**). La phytothérapie connaît de nos jours, un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans les maladies chroniques, comme l'asthme et l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers les soins les moins agressifs pour l'organisme (**Iserin et al., 2001 ; Fernandez, 2003**).

### **I.1.7. Place de la phytothérapie en Algérie**

L'utilisation des plantes médicinales fait partie intégrante de notre culture et de nos traditions. En Algérie, les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle, qui elle-même est largement employée dans divers domaines de la santé (**Sebai et Boudali, 2012**). Nos grands-parents ont beaucoup utilisé les plantes médicinales pour soigner différents maux et troubles. Actuellement, la population algérienne revient à la nature en particulier vers la phytothérapie qui est une thérapeutique connue pour son action douce et profonde sur l'organisme. Elle est donc la solution idéale aux problèmes et aux désordres secondaires à notre mode de vie actuel (**Hachaïchi, 2010**).

Des chiffres recueillis auprès du Centre national du registre de commerce (CNRC), montrent que vers la fin de l'année 2009, l'Algérie comptait 1926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales, dont 1393 sédentaires et 533 ambulants (**Sebai et Boudali, 2012**).

## I.2. Etude Botanique

### I.2.1. Généralités

La famille des Cupressacées (*Cupressaceae*), est une famille de plantes gymnospermes (**Chazel et Chazel, 2013**), représentée par 29 genres et 130 espèces différentes, formant une des familles les plus importantes de conifères ou résineux. Ses arbres et arbustes ont des feuillages et des écorces riches en composés aromatiques. La majorité de ces plantes sont persistantes. Les Cupressacées sont aujourd'hui abondamment utilisées en aromathérapie et en cosmétique (**Dobbertin et Häne, 2006**).

Parmi ces genres, on a le genre *Tetraclinis* qui appartient à la famille des Cupressacées, ordre des Coniférales (**Tassin, 2012**), ce genre fut créé par le botaniste anglais M. T. Masters (1833-1907). Très proche du genre *Callitris*, l'espèce en fut détachée en raison de la structure de ses cônes qui ont 4 écailles (**Brosse, 2004**).

### I.2.2. Généralités sur le Thuya de Berbérie

Le thuya de Berbérie ou *Tetraclinis articulata* appelé « Berbouch » en berbère, a été décrit par **Vahl** en 1791 sous le nom de *Thuya articulata*, il a été par la suite rattaché par **Benth** en 1883 au genre *Callitris* représenté par l'espèce : *Callitris quadrivalvis* ou au genre *Tetraclinis* (*Tetraclinis articulata*) (**Maire, 1952 ; Salette, 2014**).

Le Thuya de Berbérie « *Tetraclinis articulata* », encore appelé Thuya articulé est un arbre de 5-15m de hauteur (**Tassin, 2012**), Cet arbre est endémique de l'Afrique du nord occidentale, et constitue un élément important de la végétation magrébine (Maroc, Algérie et la Tunisie), puisque il couvre plus d'un million d'hectares (**Haddad et al., 2006**). Ses principaux peuplements se situent au Maroc (565798 ha), en Algérie (environ 143000 ha) et en Tunisie (près de 30000 ha) (**Mhirit et Blerot, 1999**).

Le nom botanique de Thuya de Berbérie est *Tetraclinis*, terme qui provient du grec « *Tetra* » qui signifie « quatre » et « *Cliniss* » signifie « lit » (fait allusion aux graines reposant sur les écailles), le mot latin « *articulata* » signifie « articulé » ; ce sont des ramules divisés en articles (**Brosse, 2004**).

### I.2.3. Étymologie

*Tetraclinis articulata* a plusieurs noms à travers le monde :

- **Nom commun (France) :** Thuya de Berbérie, Thuya articulé, Thuya d'Algérie, Sandarac (Bärtels, 1998 ; Brosse, 2004 ; Farjo, 2010).
- **Nom Arabe:** Aaraar, (عرعار) Sandarus (سنضروس), Aaraar berboush (عرعار بربوش), Shajrat el-hayat (شجرة الحياة) (Abi Faraj, 2005 ; Baba-Aissa, 2011).
- **Nom Latin :** « *Tetraclinis articulata* (Farjo, 2010 ; Farjon et Filer, 2013).

### I.2.4. Systématique

D'après Meyer et Manchester, (1997), la systématique de *Tetraclinis articulata* se présente comme suit :

<b>Règne :</b>	Plantae
<b>Sous-embranchement :</b>	Pinophyta
<b>Classe :</b>	Pinopsida
<b>Ordre :</b>	Pinales
<b>Famille :</b>	Cupessaceae
<b>Genre :</b>	<i>Tetraclinis</i>
<b>Espèce :</b>	<i>T. articulata</i>

### I.2.5. Répartition géographique

#### ❖ Dans le monde

Le Thuya de Berbérie « *T. articulata* » espèce résineuse de la famille des Cupressacées, constitue un élément important de la végétation Nord africaine, spontané sur les pentes sèches des montagnes en Algérie, en Tunisie, au Maroc, Malte, et près de Carthagène dans le sud-est de l'Espagne (Brosse, 2004) (Figure 1). Il est généralement localisé dans les étages semi arides entre le niveau de la mer et 1500 m d'altitude (White, 1986 ; Tassin, 2012).

## ❖ En Algérie

Le thuya de Berbérie « *T. articulata* » est surtout abondant dans la partie occidentale (Tell Oranais et Ouarsenis). Toutefois, il existe par pied isolés ou par petits bouquets jusqu'à l'entrée de la Kabylie (Dellys et Lakhdaria), dans la vallée de l'oued Sahel jusqu'au M'chdellah ainsi que dans les gorges de Kherrata. Il manque dans le Tell constantinois et dans la partie centrale et orientale du tell Algérois (Quezel et santa, 1963).



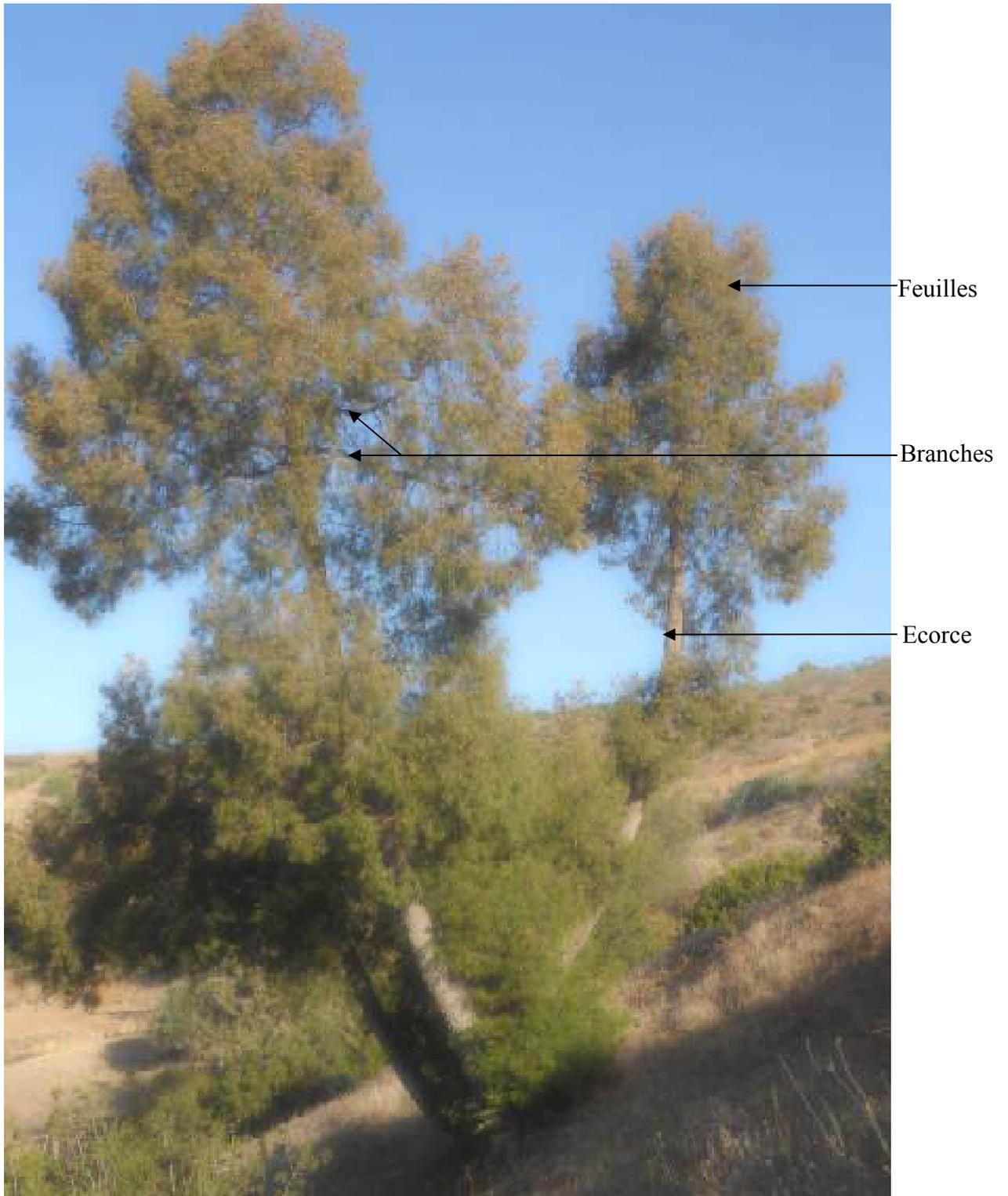
● *T. articulata*

**Figure 1:** Aire de répartition de *T. articulata* en région méditerranéenne (Farjon et Filer, 2013).

### I.2.6. Description morphologique

## ❖ Aspect générale

L'espèce de *T. articulata* est un arbre de 5-8m de hauteur et 0,30 m de diamètre en moyenne, parfois de 12-15m de hauteur pour 0,50 m de diamètre (Bärtels, 1998 ; Tassin, 2012), quelques vieux sujets peuvent aller jusqu'à 20 m de hauteur pour 1m de diamètre mais cela reste très rare. L'arbre possède souvent deux ou plusieurs troncs à la base (Hadjadj et al., 2009) (Figure 2). Le port est conique, aux ramifications érigées, aux ramilles écailleuses disposées sur un même plan et verticalement aplaties. Le tronc parfume fournit un bois marron clair finement strié de veines parallèles (Sibony, 2004). Ces branches sont denses, érigées et aux ramules divisés en articles aplatis (Figure 3).



**Figure 2:** Aspect générale de *T. articulata* (Originale, 2014).

### ❖ Ecorce

L'écorce de *T. articulata* (**Figure 4**) est brune rougeâtre, épaisse résistante au feu, anguleux et partagée en compartiment réguliers (**Bärtels, 1998 ; Brosse, 2004**).

### ❖ Rameaux Feuillés

Les rameaux de *T. articulata* sont verts, aplatis et couverts par les feuilles, ils sont articulés, d'où le nom de *T. articulata* (**Quezel et Medail, 2003**) (**Figure 5**). Les feuilles sont squamiformes, aplatis et pointues et sont groupées par quatre, les feuilles latérales plus grosses que les feuilles basales, les pointes libres en forme d'écailles et aiguës (**Bärtels, 1998 ; Brosse, 2004**) (**Figure 6**).

### ❖ Fruit (Cônes)

Les cônes sont petits arrondis de 10-12mm de diamètre, glauques et cireux, formés de 4 écailles ligneuses triangulaires, mucronés sur le dessus (**Figure 7-A**). Les écailles s'écartent les unes des autres à maturités, libérant des graines ailées (**Bärtels, 1998 ; Brosse, 2004**). L'ouverture des cônes, qui reste comme pour beaucoup d'espèces conditionnée par la chaleur, n'a lieu qu'à la fin de l'été (**Hadjadj et al., 2009**) (**Figure 7-B**).

### ❖ Floraison

La plante est monoïque, elle fleurit au début du printemps (Mars), et fructifie en été (Juin-Juillet), la maturation des fruits est presque totale en Juillet (**Quezel et Medail, 2003**). Cette fructification démarre vers l'âge de 15 ans et se répète tous les deux à trois ans jusqu'à un âge très avancé (**Hadjadj et al., 2009**).



**Figure 3:** Branches de *T. articulata* (Originale, 2014).



**Figure 4:** Ecorce de *T. articulata* (Originale, 2014).



**Figure 5:** Rameaux feuillés de *T. articulata* (Originale, 2014).



**Figure 6:** Feuilles de *T. articulata* (Originale, 2014).



**Figure 7:** Cônes de *T. articulata* (A : Cônes verts, B : Cônes à maturité) (Originale, 2014).

### I.2.7. Culture

L'espèce de *T. articulata* est généralement localisée dans les étages semi arides et étages infra- et thermo-méditerranés (chaude et tempéré), il est installée dans les fentes larges des rochers, entre le niveau de la mer et 1500 m d'altitude. Il craint le froid et les précipitations supérieures à 800 mm/an (Tassin, 2012). On le trouve à la fois sur sol calcaire et sur sol siliceux (White, 1986).

### I.2.8. Propriétés de Thuya de Berbérie

En médecine populaire, le *T. articulata* est utilisé pour empêcher les hémorragies et pour traiter les maladies vénériennes, l'énurésie et l'hypertrophie prostatique. Il présente aussi des propriétés antivirale, anti-catarrhale, astringente, diurétique expectorante, hémostatique et sédatif urinaire (Baba-Aissa, 2011). L'H.E. de *T. articulata* possède plusieurs propriétés thérapeutique à savoir l'activité antioxydante, anti-inflammatoire (Bourkhiss et al., 2010), et l'activité antimicrobienne (Bourkhiss et al., 2007).

Le bois de *T. articulata* est surtout utilisé dans le secteur artisanal en menuiserie et comme bois de chauffage. En phytothérapie, différentes parties de la plante sont utilisées contre les fièvres infantiles, les douleurs gastriques, les fortes diarrhées, le diabète et l'hypertension (Bourkhiss et al., 2007). La résine parfumée est destinée à la fabrication des vernis et de l'encens. En outre, les rejets de *T. articulata* jouent un rôle important dans la protection des sols contre l'érosion pluviale ou éolienne (Bärtels, 1998 ; Brosse, 2004 ; Tassin, 2012).

### I.2.9. Composition chimique

Il existe de nombreux articles traitant la composition chimique en huiles essentielles des racines, branches, rameaux, feuilles et des cônes de *T. articulata* de l'Algérie (Abi-Ayad et al., 2012), du Maroc (Bourkhiss et al., 2007 ; Bourkhiss et al., 2009, Bourkhiss et al., 2010 ; Bourkhiss et al., 2012), La Tunisie (Tékaya-Karoui et al., 2007) et Malte (Buhagiar et al., 2000), Où sont rapportées quelques études réalisées sur les principaux composés en H.E. pour *T. articulata*, comme le montre dans le tableau I (Annexe I).

### I.3. Activités biologiques étudiées

#### I.3.1. Activité antimicrobienne

##### I.3.1.1. Introduction

L'homme vit dans un environnement peuplé d'un grand nombre de microorganismes. Ces derniers sont constitués par les bactéries, les virus, les champignons et les parasites (Khiati, 1998).

Les qualités antimicrobiennes des plantes médicinales et aromatiques sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début de XX<sup>ème</sup> siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Dorman et Deans, 2000).

Il est nécessaire de contrôler la multiplication des bactéries afin de prévenir ou traiter les maladies infectieuses ou pour limiter la croissance des micro-organismes indésirables (Arnie et Couplan, 2001).

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits de *T. articulata* ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne. Les constituants des huiles essentielles sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons (Buhagiar et al., 2000 ; Bourkhiss et al., 2007 ; Tékaya-Karoui et al., 2007 ; Abi-Ayad et al., 2011).

##### I.3.1.2. Mécanisme d'action des produits antimicrobiens

Le mécanisme d'action des produits antimicrobiens autres que les antibiotiques restent encore généralement peu connus (Flurette et al., 1995). Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des H.E. Il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Dorman et Deans, 2000).

L'action des H.E. sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie (Oussalah et al., 2006).

Le mode d'action des H.E. dépend du type de microorganisme. En générale, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatives est plus riche en lipo-Polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpène hydrophobes d'y adhérer (Cristani *et al.*, 2007).

### **I.3.1.3. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne**

Selon Guerin -Faublée et Carret, (1999) ; Eymard, (2003) ; Pibiri, (2005), l'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne, plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne : Aromatogramme, méthode de diffusion en puits, méthode de dilution et méthode de micro-atmosphère (Annexe I).

### **I.3.2. Activité antioxydante**

#### **I.3.2.1. Introduction**

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres. Ces derniers sont produit quotidiennement par l'organisme ; ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux (Bartosz, 2003), mais, ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (Pourrut, 2008), des acides nucléiques en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers et l'artériosclérose (Favier, 2003).

#### **I.3.2.2. Antioxydants**

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (Boyd *et al.*, 2003), se sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres, sans effet sur les propriétés sensorielles et nutritionnelle du produit alimentaire. (Vansant, 2004).

Les antioxydants permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit. En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni odeur indésirable, résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fini (**Poknory et al., 2001**).

#### ❖ **Antioxydants endogènes**

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase), élaborées par notre organisme. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mika et al., 2004**).

#### ❖ **Antioxydants exogènes**

Ils sont présents dans l'alimentation tels que les vitamines A, C, E et les polyphénols en particulier les flavonoïdes. Ces antioxydants nutritionnels sont indispensables mais leur action est limitée jusqu'à ce qu'ils soient régénérés.

- **La vitamine E** : C'est le principal antioxydant nutritionnel, liposoluble et puissant (**Njus et Kelley, 1991**).
- **L'ascorbate ou vitamine C** : est l'antioxydant hydrosoluble majeur elle est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E (**Pourrut, 2008**).
- **Les caroténoïdes** : sont des pigments végétaux lipophyles, précurseurs de la vitamine A (**Marc et al., 2004**).
- **Les flavonoïdes** : peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant (**Lahouel et al., 2006**).

#### **I.3.2.3. Mécanismes d'action**

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatique, cas des dérivés du phénol (**Berset et Cervelier, 1996**).

Leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la décoloration par résonance et par manque de position appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire (Berset et Cervelier, 1996).

Les antioxydants sont en fait, des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dériver ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires (Berset et Cervelier, 1996).

### **I.3.3. Activité anti-inflammatoire**

#### **I.3.3.1. Introduction**

Une inflammation est l'une des réactions du corps défensive non spécifique importante. Elle est provoquée par des bactéries, une blessure ou un contact avec des produits irritants (Prescott et al., 2003 ; Davis, 2006). La réaction inflammatoire est la réponse normale de l'organisme à des agressions d'origine immunitaire ou non. C'est une réaction du tissu conjonctif et des vaisseaux (Touitou, 2003).

#### **I.3.3.2. Action anti-inflammatoire**

Elle inhibe la réponse inflammatoire quel que soit l'agent pathogène responsable, entraînant une réduction de la vasodilatation et de l'œdème en diminuant le chimiotactisme et la migration leucocytaire vers le foyer inflammatoire (Pieri, 1992).

#### **I.3.3.3. Effet anti-inflammatoire des plantes**

Benoit et al., (1976) ont étudié 163 espèces de plantes supérieures et de champignons, choisis au hasard et évalué leur activité anti-inflammatoire dans le test de l'œdème de la patte de rat induit par la Carraghénine. De ces échantillons, 73 espèces inhibaient l'inflammation de 25% ou plus à des doses de 5- 1000 mg/kg, 17 montraient une inhibition entre 30 et 39%, 21 exerçaient une inhibition de 40 à 49%, 15 entre 50 et 59%, 4 entre 60 à 69% et 2 espèces inhibaient l'inflammation de 70 à 79% (Sofowora, 2010).

#### **I.3.3.4. Signaux de l'inflammation**

La réaction inflammatoire est caractérisée par quatre signaux cardinaux (rougeur, douleur, tumeur, chaleur), mais peut aussi entraîner de multiples effets biologiques et cliniques généraux qui sont d'intensité plus importante en cas de persistance de la réaction inflammatoire (**Bonnotte et al., 2003 ; Prescott et al., 2003**).

#### **I.3.4. Activité antispasmodique**

##### **I.3.4.1. Définition**

Un spasme est une contraction musculaire, qui peut toucher un groupe de muscles, un muscle seul, voire même un faisceau isolé (**Blanc et Siproudhis, 2006**). Les spasmes peuvent toucher les muscles à commande volontaire responsables de crampes ou de convulsions, mais ce terme est parfois réservé aux muscles à commande involontaire comme les muscles digestifs notamment. Le spasme est involontaire et de courte durée (**Hordé, 2014**).

##### **I.3.4.2. Médicaments antispasmodiques**

Un médicament antispasmodique est un médicament qui agit directement sur les spasmes des muscles lisses et supprime les contractions au niveau des muscles lisses ou des sphincters (**Blanc et Siproudhis, 2006**).

##### **I.3.4.3. Types des spasmes**

Selon **Hordé, (2014)**, il existe différents types de spasmes :

- Le spasme cynique au niveau du visage.
- les spasmes abdominaux généralement responsables de crampes ou de douleurs.
- les spasmes en flexion faisant partie d'un syndrome épileptique de l'enfant.

## Lieu de stage

Notre travail a été réalisé durant la période allant du début de mois d'Avril à la fin de Juillet 2014, au niveau de quatre structures scientifiques:

- ✓ Les analyses physicochimiques, microbiologiques et études pharmacologiques, ont été réalisées au niveau des différents laboratoires de SAIDAL-Filiale ANTIBIOTICAL-SAIDAL de Médéa.
- ✓ L'extraction de l'H.E. a été faite au niveau de deux laboratoires : le laboratoire de chimie du Département de chimie, Faculté des Sciences à l'université de Blida-1- et le laboratoire de recherche à l'Ecole Nationale Supérieure d'Enseignement (ENSE) de Kouba, (Alger).
- ✓ L'évaluation de l'activité antimicrobienne au niveau du laboratoire de bactériologie, hôpital FARES Yahia de Koléa, (Tipaza).

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel biologique

#### II.1.1.1. Matériel végétal

L'étude a concerné la partie aérienne de *Tetraclinis articulata* (feuilles et cônes). Les conditions et lieu de cueillette (récolte) sont mentionnés dans le tableau II.

**Tableau II** : Caractéristiques de la cueillette

Lieu de la récolte	Koléa-Wilaya de Tipaza
Altitude	130 m
Date de la récolte	13 Mars, 7, 21 Avril et 5, 23 Mai 2014
Heure de la récolte	12h – 19h
Climat	Méditerranée
Température	15 – 27 °C
Quantité	7 kg de matière fraîche et 1kg de matière sèche.
Parties récoltés	Feuilles et cônes

L'identification botanique a été faite au niveau du département de botanique à l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques (ENSA), El Harrach, (Alger).

Les feuilles ont été séchées pendant 15 jours à température ambiante  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière et dans un endroit bien aéré (pour éviter la prolifération des moisissures), et conservés dans des sacs en papier.

➤ **Broyage de la plante sèche**

Les feuilles sont broyées à l'aide d'un mortier puis mis dans un mixeur et conservés à sec dans des boîtes en verre, à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité.

### **II.1.1.2. Matériel animal**

Nous avons travaillé sur 40 souris *Albinos*, de souche *NMRI*, sexe mâle et femelle, de 18g à 22g de poids corporel, fournis par l'élevage de SAIDAL-Médéa.

➤ **Conditions d'élevage**

- **Température ambiante** :  $20^{\circ}\text{C}$  à  $24^{\circ}\text{C}$ .

- **Taux d'humidité** : 50%.

- **Eclairage** : 10h/j.

➤ **Régime alimentaire**

- **Nourriture** : granulés d'ONAB.

- **Boisson** : eau de ville.

### **II.1.1.3. Microorganismes étudiés**

Les souches utilisées ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie, Filiale ANTIBIOTICAL- SAIDAL de Médéa et le laboratoire de bactériologie, à l'hôpital FARES Yahia de Koléa, (Tipaza). Ces souches, ont été identifiées et caractérisées à l'institut PASTEUR d'Algérie (IPA), (Tableau III).

Tableau III: Souches utilisées

Souches utilisées		ATCC	Source
<b>Bactéries à Gram (-)</b>	<i>Escherichia coli</i>	10536	SAIDAL
	<i>Escherichia coli</i>	25922	EPH de Koléa
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	EPH de Koléa
<b>Bactéries à Gram (+)</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	SAIDAL
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	SAIDAL
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	EPH de Koléa
	<i>Staphylococcus aureus</i>	43300	EPH de Koléa
<b>Levures</b>	<i>Candida albicans</i>	10231	SAIDAL
	<i>Candida albicans</i>	43433	EPH de Koléa
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	EPH de Koléa

**SAIDAL** : Laboratoire de Microbiologie, Filiale ANTIBIOTICAL- SAIDAL de Médéa.

**EPH de Koléa** : Laboratoire de bactériologie, l'hôpital FARES Yahia, Koléa, (Tipaza).

### II.1.2. Matériel non biologique

L'appareillage, la verrerie et accessoires, en plus des réactifs et produits chimiques divers sont mentionnés en annexe II.

## II.2. Méthodes

Le plan général du protocole adopté pour la réalisation de la partie pratique de notre étude est illustrée par la **Figure 8**.

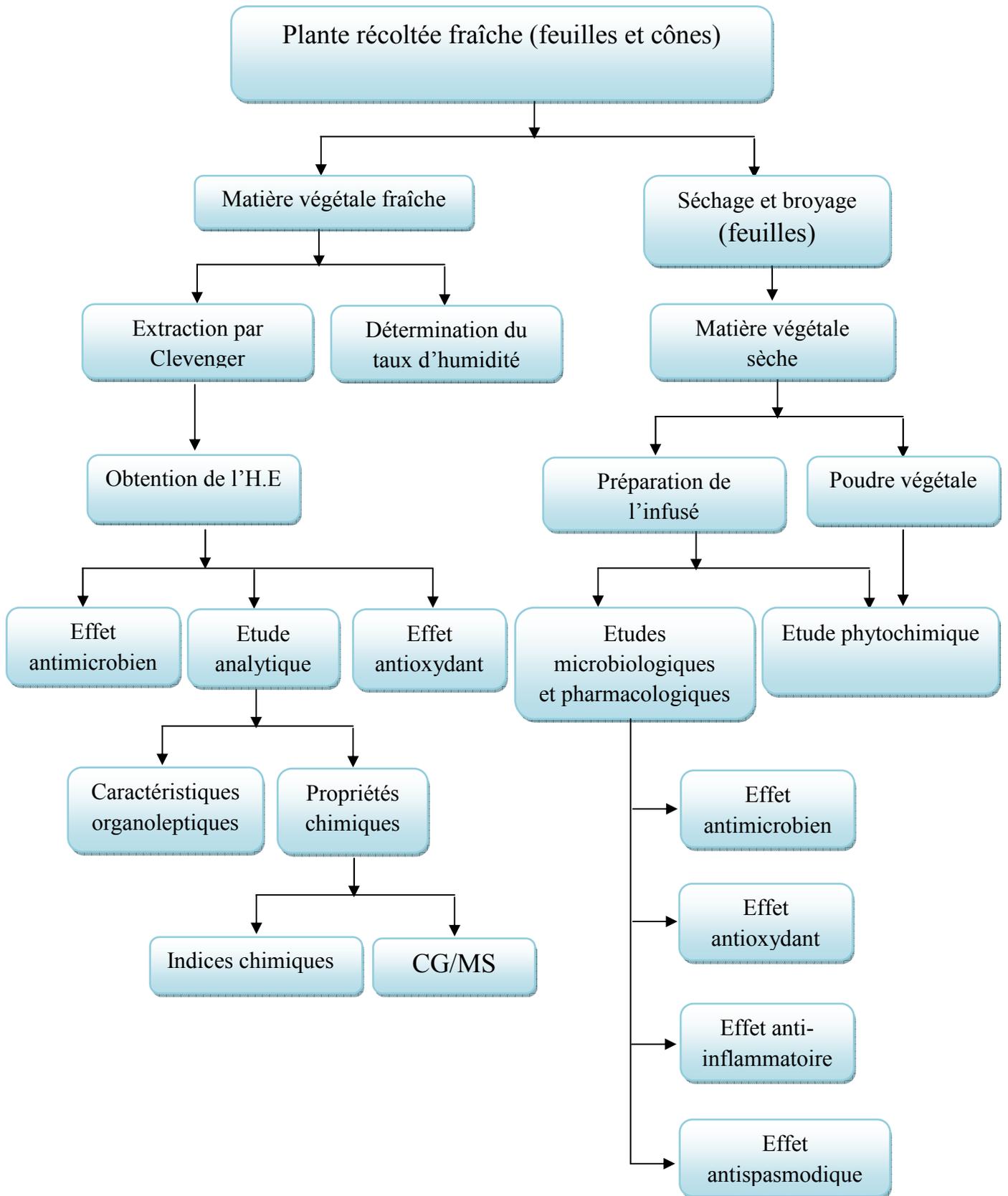


Figure 8: Schéma général de la procédure expérimentale effectuée sur *T. articulata*

### II.2.1. Etude phytochimique

L'étude phytochimique consiste à détecter les différents composés chimiques existants au sein de l'espèce *T. articulata*.

#### II.2.1.1. Détermination de la teneur en eau (humidité)

L'humidité c'est la perte de la masse d'eau lors du séchage de la matière végétale, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**Aiache et al., 2001**). Ce test est très important car il nous permet de suivre au mieux l'étape de séchage.

##### ➤ Mode opératoire

Nous pouvons déterminer la teneur en eau par séchage à l'ombre de 10g de matière végétale pendant 10 jours de chaque échantillon frais (feuilles et cônes), puis les mettre dans une étuve entre 100 et 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le séchage de chaque échantillon est répété trois fois.

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

$$X \% = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

$X\%$  : Taux de l'eau en pourcentage.

$M_1$  : Masse de l'échantillon frais en gramme.

$M_2$  : Masse de l'échantillon après séchage en gramme.

#### II.2.1.2. Potentiel d'Hydrogène de l'extrait aqueux (pH)

Le pH est un nombre qui représente conventionnellement la concentration en ions hydrogènes d'une solution aqueuse (**Pharmacopée Européenne, 2005**).

La détermination potentiométrique du pH est effectuée par mesure de la différence du potentiel entre deux électrodes judicieusement choisies plongeant dans la solution à examiner, l'une de celles-ci est une électrode sensible aux ions hydrogènes (le plus souvent, une électrode en verre) et l'autre une électrode de comparaison (**Pharmacopée Européenne, 2005**).

➤ **Mode opératoire**

Les mesures sont effectuées à une température ambiante (20 °C à 25°C) et l'appareil doit être calibré avec une solution tampon, ensuite on plonge les électrodes dans la solution à examiner et on effectue la lecture dans les mêmes conditions que la solution tampon (**Pharmacopée Européenne, 2005**).

### **II.2.1.3. Identification colorimétrique de quelques métabolites secondaires**

Le but de cette étape est de révéler la présence de certains métabolites secondaires de *T. articulata*, et pour cela nous avons procédé à une révélation colorimétrique, sur la poudre sèche de la plante et l'infusion.

➤ **Préparation de l'infusé**

10g de poudre (feuilles) sont mis à infuser dans 100ml d'eau distillée en ébullition puis mettre la solution dans un agitateur magnétique pendant 15min, la solution obtenue est Centrifugée à 3000 tours/min pendant 10 minutes (**Annexe IV**). Après filtration, le filtrat est ajusté à 100ml avec l'eau distillée.

❖ **Identification des anthocyanes**

Rajouter quelques gouttes d'ammoniaque(NH<sub>4</sub>OH) 1/2 à 5ml d'infusé. La réaction donne une coloration rouge en présence des anthocyanes (**Bruneton, 1999**).

❖ **Identification des leuco-anthocyanes**

2g de poudre végétale dans 20ml d'un mélange de Propanol/Acide chlorhydrique (1/1) sont portés au bain-marie bouillant pendant quelques minutes, une coloration rouge se développe en présence des leuco-anthocyanes (**Bruneton, 1999**).

❖ **Identification des tanins**

Quelques gouttes d'une solution FeCl<sub>3</sub> à 5% sont ajoutées à 5ml d'infusé. La réaction donne une coloration bleue noire en présence de tanins (**Ntihagowumwe, 2005**).

• **Tanins catéchiques**

15ml d'infusé sont additionnés à 7ml de réactif de Stiasny, un précipité rouge se forme en présence des tanins catéchiques (**Ntihagowumwe, 2005**).

- **Tanins galliques**

A 5ml d'infusé, rajouter 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub>.

La réaction est positive lorsque la coloration bleu foncé apparait

(Ntihagowumwe, 2005).

- ❖ **Identification des quinones**

- **Quinones libres**

A 2g de poudre végétale humectée par HCl à 1N, ajouter 20ml de chloroforme, la solution est mise à macération pendant 3 heures, puis filtrer, le filtrat est agité avec 5ml d'ammoniaque 1/2. Une coloration rouge se développe en présence des quinones libres.

- **Quinones combinés**

A 2g de poudre végétale additionner 5ml d'acide sulfurique 2N, porter à reflux pendant 2 heures la solution extractive est filtrée, puis épuisée par 20ml de chloroforme, la solution chloroformique est évaporée à sec (en bain marie sous la hotte ventilée), puis ajouter l'ammoniaque. La réaction donne une coloration rouge en présence des quinones combinées.

- ❖ **Identification des flavonoïdes**

5ml d'infusé sont additionnés à 5ml d'acide chlorhydrique, un copeau de magnésium et 1ml d'alcool isoamylique. En présence des flavonoïdes la phase organique est rouge orangé (Ntihagowumwe, 2005).

- ❖ **Identification des alcaloïdes**

2,5g de poudre végétale humectée avec l'ammoniaque 1/2 sont mis à macérer pendant 24h dans 25ml d'un mélange éther-chloroforme (3v/1v). Le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N. Des réactions de précipitation sont effectuées sur la solution chlorhydrique. En présence d'alcaloïdes le réactif de Dragendorff donne un précipité rouge, tandis que le réactif de Valser-Mayer donne un précipité blanc jaunâtre (Ntihagowumwe, 2005).

### ❖ Identification des saponosides

Ajouter quelques gouttes d'acétate de plomb à 2 ml d'infusé de la plante. Un précipité blanc est formé en présence des saponosides (Gherib, 1988).

### ❖ Identification des glucosides

A 2g de poudre végétale, rajouter quelques gouttes d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) à 1%. Une coloration rouge brique qui vire vers le violet indique la présence des glucosides (Gherib, 1988).

### ❖ Identification des coumarines

Faire bouillir à reflux 2g de poudre dans 20ml d'alcool éthylique (éthanol), pendant 15min puis filtrer. A 5ml du filtrat rajouter 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10%, et quelques gouttes d'HCl à 10%. La formation d'un trouble indique la présence des coumarines (Bruneton, 1999).

## II.2.1.4. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

### ❖ Principe

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP), est la technique, la plus performante, utilisée pour la séparation et le dosage des produits non volatils et thermo-dégradables, tels que les composés phénoliques. Elle ne demande qu'une faible quantité d'échantillon végétal et permet de combiner en une seule opération les analyses quantitatives et qualitative d'un extrait complexe, ce qui permet l'étude de matériels végétaux très variés (Pietta et al., 2003; Salgarolo, 2003).

La séparation des composés dépend de leurs affinités pour deux phases non miscibles, une phase stationnaire et une phase mobile (solvant d'élution) de polarité différentes (Macheix et al., 2005).

L'échantillon à analyser est déposés au sommet de la colonne, la phase mobile entraine sa migration suivant un gradient de solvant ou en régime isocratique. La phase mobile étant alors de composition constante (Lauranson, 1989).

## ❖ Mode opératoire

Préparation d'une infusé à raison de 2mg/ml, et les conditions d'analyse sont mentionnées dans le tableau suivant :

**Tableau IV :** Conditions opératoire d'HPLC

Matériel	Types et caractéristiques
<b>Colonne</b>	C18
-Diamètre	4,6mm
-Longueur	25nm
-Température	25°C
<b>Pompe</b>	
- Débit	1ml/min
<b>Micro-seringue</b>	20 µl
<b>Détecteur multi faisceaux</b>	254 nm (UV visible)

### II.2.2.1. Extraction de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

Nous avons suivis le protocole adopté par le laboratoire de chimie du Département de chimie, Faculté des Sciences à l'université de Blida 1.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydro distillation dans un appareil de type Clevenger, la procédure d'extraction se résume comme suit :

- Introduire 100g de matériel végétal frais (feuilles ou cônes) avec 300 ml d'eau distillée et un copeau de pierre de Ponce (à pour but la régulation de la température) dans un ballon d'un litre.
- Déposer ce dernier sur la chauffe ballon.
- Mettre en marche l'extracteur et surveiller l'ébullition de l'eau (après une heure de marche) qui correspond à l'apparition de la première goutte au niveau de l'ampoule à décanter.
- Commencer à compter le temps jusqu'à trois heures, puis arrêter l'extraction (**Figure 9, Annexe II**).

Les vapeurs envoyées dans l'extracteur, traversant la matière végétale font éclater les cellules et entraînent avec elles l'huile essentielle, elles passent ensuite dans le réfrigérant où elles se condensent, après condensation, le distillat est recueilli dans une ampoule à décanté. Pour séparer les deux phases, verser la phase aqueuse (hydrolat ou eau aromatique) qui contient une quantité non négligeable d'essence sous forme solubilisée et récupérer la phase organique contenant l'H.E. Pour éliminer toute trace d'eau, ajouter du sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), après filtration, récupérer l'H.E. dans des tubes à essais. Peser les tubes pour le calcul du rendement puis conserver dans un flacon en verre opaque à 4°C.

### II.2.2.2. Détermination du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite en gramme et le poids de la matière végétale à traiter (**Carré, 1953**). Le rendement est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante

$$R\% = \frac{M_{\text{H.E.}}}{M_{\text{M.V}}} \times 100$$

**R%**: Pourcentage de l'H.E.

**M<sub>H.E.</sub>** : Masse de l'H.E en gramme.

**M<sub>M.V.</sub>**: Masse de la matière végétale en gramme.

### II.2.2.3. Etude analytique de l'huile essentielle

#### A- Détermination des caractères physiques

##### ❖ Détermination des caractères organoleptiques

C'est la détermination des caractéristiques organoleptiques du *T. articulata*, à savoir l'aspect, l'odeur et la couleur.

##### ❖ Indice de réfraction (**I<sub>R</sub>**)

###### ➤ Principe

Selon la norme de la **Pharmacopée Européenne, (2008)**, l'indice de réfraction (**I<sub>R</sub>**) d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air et le sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.

➤ **Mode opératoire**

- Etalonner le réfractomètre avec de l'eau distillée.
- Placer 2 à 3 gouttes de l'huile essentielle testée sur l'appareil.
- Régler le réfractomètre jusqu'à la stabilisation.
- Lire la valeur de l'indice de réfraction sur le cercle gradué.

**B- Détermination des indices chimiques**

❖ **Indice d'acide ( $I_A$ )**

Selon la norme **AFNOR (NF T 75-103)**; L'indice d'acide ( $I_A$ ) est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH), nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

➤ **Mode opératoire**

- Peser 2g d'H.E. de *T. articulata*, et introduire dans un Erlenmeyer.
- Ajouter 5ml d'éthanol neutralisé et 5 gouttes au maximum de phénolphthaléine.
- Titrer le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,1M.
- Poursuivre l'addition jusqu'à l'obtention du virage de la solution persistante pendant 30s.
- Noter le volume (V), de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée.

L'indice d'acide  $I_A$  est mesuré par la formule suivante :

$$I_A = \frac{V \cdot C}{m} \times 56,1$$

Où :

$I_A$  : Indice d'acide.

V : Le volume de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée en titrage (ml).

C : Concentration exacte de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée (0,1M)

m : Masse d'HE.

56,1 : Poids moléculaire de KOH.

**❖ Indice d'ester ( $I_E$ )**

Selon la norme **AFNOR (NF T 75-103)**; L'indice d'ester ( $I_E$ ), est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle.

**➤ Mode opératoire**

- Peser 2g d'H.E. de *T. articulata*, et introduire dans un Erlenmeyer.
- Ajouter à l'aide d'une burette 25ml de la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.5M.
- Plonger l'ensemble dans un bain marie, chauffer jusqu'à ébullition pendant 30min, nous déterminons la fin de la réaction lorsque nous obtenons une solution transparente et homogène (absence de trace de l'huile).
- Après refroidissement, ajouter 5 gouttes de la solution de phénolphaléine.
- Titrer l'excès de la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) avec la solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0.5M.

Parallèlement nous avons réalisé un essai à blanc dans les mêmes conditions (25ml de KOH titré par HCl 0.5M), la différence des volumes ( $V_{\text{essai blanc}} - V_{\text{essai calculé}}$ ) dépensés pour la saponification et pour la neutralisation des acides contenus dans l'échantillon.

L'indice d'ester ( $I_E$ ) est calculé par la formule suivante :

$$I_E = \left[ \frac{28,05}{m} \cdot (V_0 - V_1) \right] - I_A$$

Où :

$I_E$  : indice d'ester.

$m$  : la masse en gramme de l'H.E.

$V_0$  : volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc.

$V_1$  : volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination.

$I_A$  : indice d'acide.

### ❖ Indice de saponification ( $I_S$ )

L'Indice de saponification est la masse d'hydroxyde de potassium (KOH) exprimé en mg nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras estérifiés, contenus dans un gramme d'huile essentielle (Frénot et Vierling, 2001).

Selon la Pharmacopée Européenne, (2002), l'indice de saponification est donné par la formule suivante:

$$I_S = I_A + I_E$$

### II.2.2.4. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Les analyses de la composition chimique de l'huile essentielle de *T. articulata* ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG/SM » au niveau du laboratoire d'analyse organique et fonctionnelle de la Faculté de chimie à l'Université HOUARI Boumediene, Bab Ezzouar, (Alger).

### ❖ Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD-HP-6890 couplé à un spectromètre de masse Hewlett-Packard (HP) 5973, (Annexe IV) sous les conditions opératoires suivantes :

- Une colonne capillaire de type HP-5MS [(5%-phenyl) méthylpolysiloxane] de longueur 30m d'un diamètre interne de 0.25mm et une épaisseur du film de 0.25mm.
- un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0.3ml/mn.
- Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale à 70eV.
- La température de la colonne est programmée de 50 à 250°C à raison de 4°C/min.
- Injection d'une quantité de 1 µl en mode Split : 1/90.

## II.2.3. Evaluation des activités biologiques

### II.2.3.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

#### ❖ Mode opératoire

Le protocole expérimental est un protocole standardisé utilisé par le laboratoire de microbiologie, Filiale ANTIBIOTICAL-SAIDAL de Médéa, et le laboratoire de bactériologie à l'hôpital FARES Yahia de Koléa, (Tipaza).

La recherche de l'activité antimicrobienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis à l'H.E. et l'extrait aqueux (l'infusé) de *T. articulata*. Dans ce test, deux méthodes ont été effectuées : Aromatogramme (méthode de diffusion sur gélose) (**Figure10**) et Micro-atmosphère (méthode en phase vapeur) (**Figure 11**).

#### II.2.3.1.1. Méthode d'Aromatogramme: Méthode de diffusion sur gélose

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée « antibiogramme » ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques » (**Guerin-Faubleé et Carret, 1999**).

#### ❖ Préparation de la culture jeune (repiquage)

Faire fondre le milieu TSA au bain-marie à 100°C, ensuite verser aseptiquement sous PSM (Postes de sécurité microbiologique) le milieu TSA dans les boîtes de Pétri de 90mm de diamètre sur une épaisseur de 4mm (**Rahal et al., 2011**), laisser refroidir sous PSM, puis prélever 3 à 5 colonies des souches testées devant le bec Bunsen, et faire des ensemencements sur la gélose TSA par la méthode de stries, laisser 30 min sur la paillasse, puis incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures.

#### ❖ Milieu pour l'Aromatogramme

Fait fondre les milieux Muller Hinton (M.H) et Soja agar (S.A) pour les bactéries, Sabouraud (SAB) pour les levures, au bain-marie à 100°C ; ensuite couler les boîtes de Pétri de 90mm de diamètre sur une épaisseur de 4mm (**Rahal et al., 2011**), laisser solidifier sous PSM (Postes de sécurité microbiologique) (**Annexe IV**).

### ❖ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures, prélever à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques, décharger l'anse de platine dans 10ml d'eau physiologique stérile (0,9%), Bien homogénéiser la suspension bactérienne au moyen d'un vortex.

Faire une première lecture de la densité optique (DO) avec le Spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm qui doit être entre 0.08 et 0.1 pour les bactéries et entre 2 et 3 pour les levures (AFNOR, 2000 ; Rahal *et al.*, 2011). Cette valeur correspond à une concentration optimale de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml.

### ❖ Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées, par la méthode de quadrant (1/4), sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

### ❖ Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque absorbant stérile (papier buvard de 9mm de diamètre), et imbiber avec l'H.E. ou l'extrait aqueux (l'infusé à 30%, 20% et 10%) qui correspond à une concentration de 300, 200 et 100mg/ml, mettre seulement en contact le bout du disque avec l'H.E ou l'extrait, celle-ci va absorber progressivement jusqu'à imprégnation totale. Déposer le disque sur la surface de la gélose, laisser diffuser pendant 30min sur la paillasse (**Figure 10**).

### ❖ Incubation

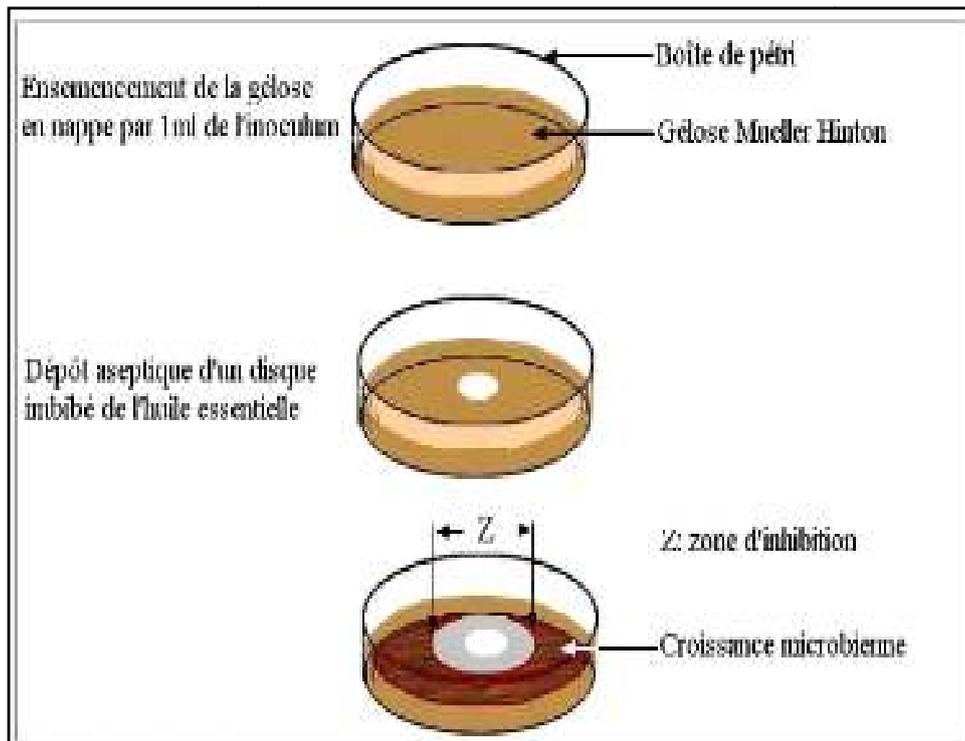
Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures.

## ❖ La lecture

La lecture des zones d'inhibition autour du disque est effectuée à l'aide d'un pied à coulisse.

La lecture des résultats consiste à observer :

- La présence d'une zone claire autour du disque : présence d'une activité inhibitrice.
- L'absence d'une zone claire autour du disque : indique l'absence d'activité inhibitrice.

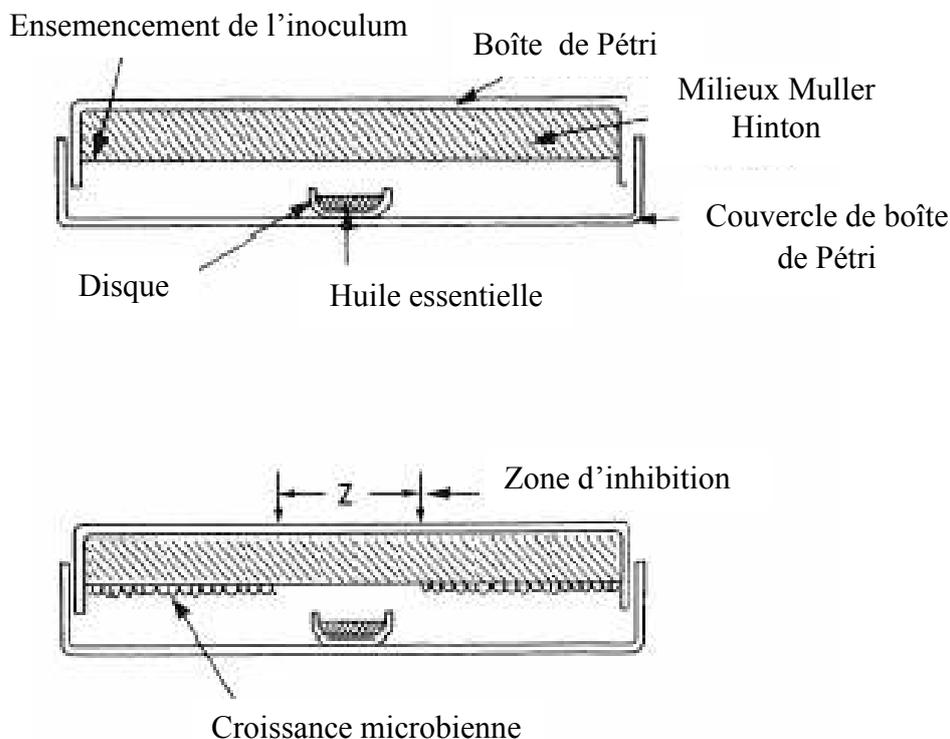


**Figure 10** : Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

### II.2.3.1.2. Technique de Micro-atmosphère: Méthode en phase vapeur

Cette technique permet d'évaluer l'activité antimicrobienne de la phase volatile de l'H.E. Le mode opératoire consiste à ensemencer un milieu gélosé avec une souche microbienne. Un disque imprégné avec l'H.E. sera déposé au centre du couvercle. La boîte est incubée, couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles. En se volatilissant, l'H.E. va inhiber la croissance du germe en créant une zone d'inhibition (Tyagi et Malik, 2011) (Figure 11).

La seule différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside dans la position du disque (Hulin et al., 1998 ; Tyagi et Malik, 2011). La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été faites de la même manière que la première méthode (Aromatogramme).



**Figure 11** : Illustration de la méthode micro-atmosphères sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

### II.2.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes:

Le pouvoir réducteur FRAP pour l'extrait aqueux (l'infusé) et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) pour l'H.E et l'extrait aqueux (l'infusé) de *T. articulata*.

Le pouvoir antioxydant des extraits testés (H.E et l'infusé) a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (acide ascorbique).

### **I.2.3.2.1. La méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxydant power)**

L'activité réductrice du fer de notre extrait (l'infusé) est déterminée selon la méthode décrite par **Oyaizu, (1986)**, basée sur la réduction du  $Fe^{+3}$  présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en  $Fe^{+2}$  (**Figure 12**).

- Un millilitre de l'extrait (l'infusé) de différentes concentrations (**Annexe III**) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%.
- L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes.
- 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutées pour stopper la réaction.
- Les tubes sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes.
- 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparée à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre), (**Annexe IV**).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (acide ascorbique), dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé (**Hubert, 2006**).

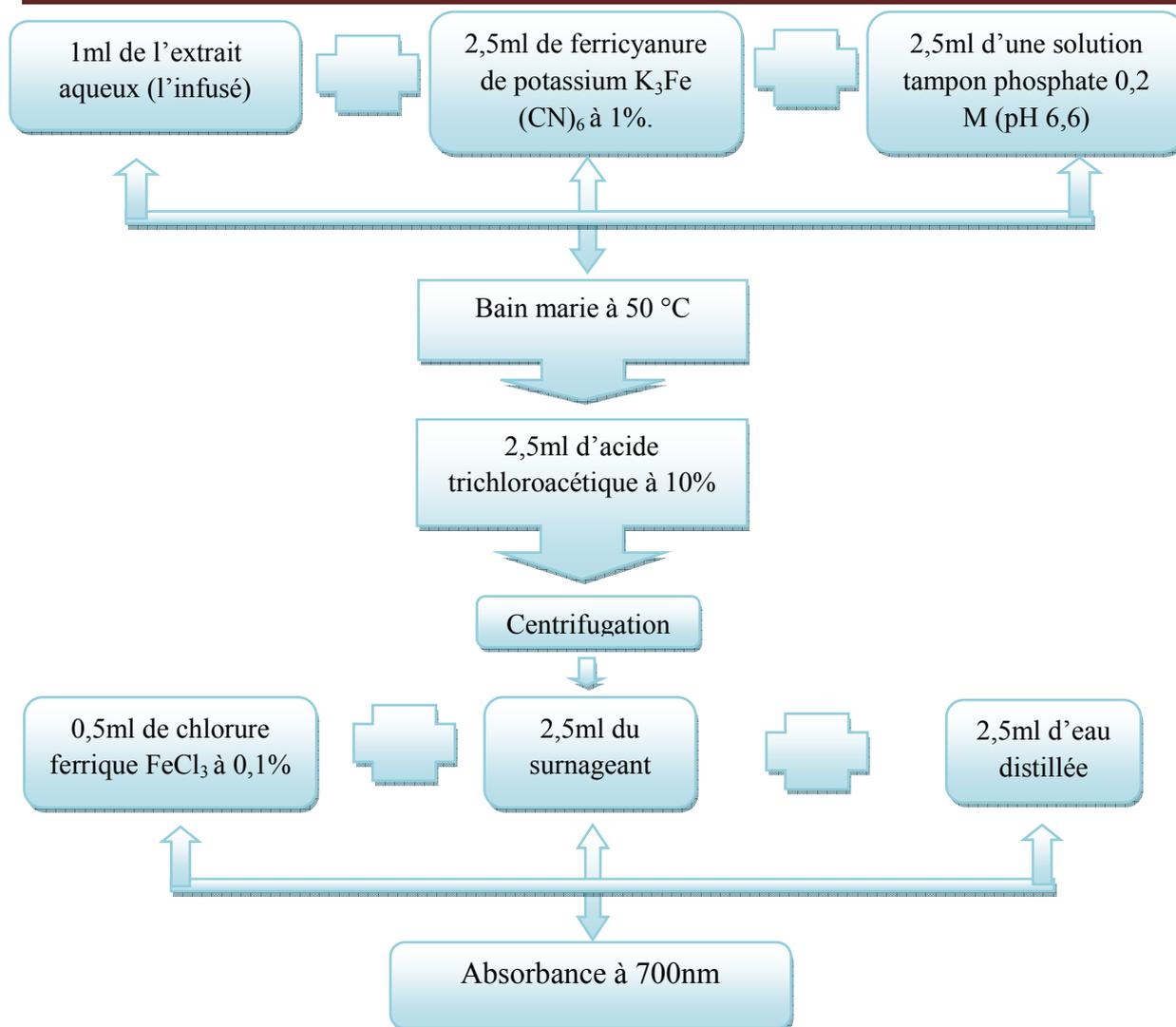


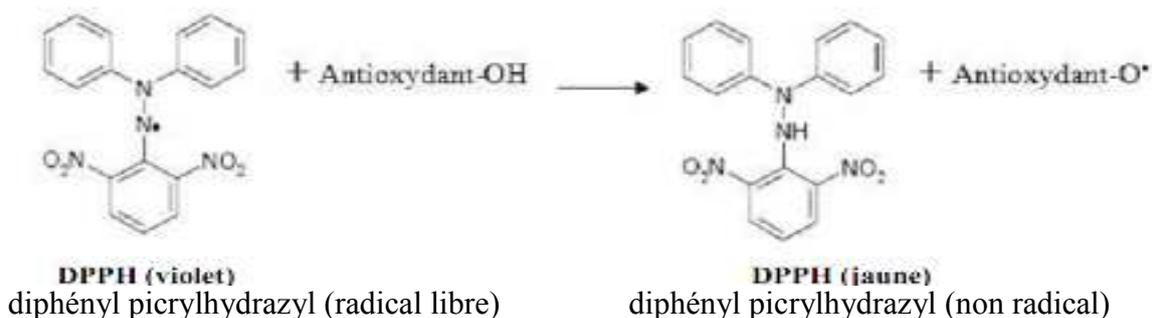
Figure 12 : Protocole de détermination du pouvoir réducteur (Oktay et al., 2003).

### I.2.3.2.2. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH

La technique a été réalisée suivant le principe et le mode opératoire suivants :

#### A. Principe

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphenyl picrylhydrazyl libre, qui possède une coloration violette foncée (**Annexe VI**), lorsqu'il est réduit la coloration devient jaune pâle, le 2-2- diphenyl picryl-1-hydrazyl (DPPH), dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002 ; Chen et al., 2004). Cette décoloration est représentative de la capacité de l'huile à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques (Chen et al., 2004) (Figure13).



**Figure13:** Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

## B. Mode opératoire

### ❖ Préparation de la solution DPPH

La solution de DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub> N<sub>5</sub> O<sub>6</sub> ; Mr : 394,33) est préparée par solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol absolu (**Annexe III**).

### ❖ Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu pour l'H.E. et préparation des dilutions dans l'eau distillé pour l'infusé.

## C. Le test

Le test du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Mansouri et al., (2005)**, où 0,1ml de chacune des dilutions de H.E ou infusé testées et de l'acide ascorbique sont mélangés dans la cellule placée dans la cuvette de spectrophotomètre avec 3,9ml de la solution méthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30min à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique et à la température ambiante du laboratoire, l'absorbance est lue à 517 nm.

D'après **Wang et al., (2002)**, le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et déterminé en appliquant la formule suivante:

$$\% \text{d'inhibition} = \frac{\text{DO Blanc} - \text{DO Echantillon}}{\text{DO Blanc}} \times 100$$

**DO Blanc** : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol).

### II.2.3.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

La mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode de Levy, citée par Berkan et al., (1991).

#### ❖ Principe

L'injection de la Carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire. Cette étude permet de comparer la réaction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondant (Berkan et al., 1991).

#### ❖ Mode opératoire

Le test consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux (l'infusé) issus des feuilles de *T. articulata* à 05 et 10% qui correspond à une concentration de 50 et 100mg/ml respectivement sur l'œdème des pattes postérieures provoquées par l'injection d'une solution de la Carraghénine à (1%) chez les souris.

La préparation de la solution de la Carraghénine (1%), a été faite par une dilution de 50 mg de la Carraghénine dans 05ml d'eau physiologique.

Les souris albinos sont réparties en 04 lots de 05 souris dont le poids corporel est compris entre 18g et 24g.

#### ➤ Au temps $T_0$

Les quatre solutions (l'eau distillée, Cloféнал® «Dicloféнал de sodium» à 25 mg/ml), l'infusé à 50mg/ml et l'infusé à 100mg/ml) sont administrées par voie orale (Figure 14) :

- **Lot témoin** : chaque souris reçoit 0,5ml d'eau distillée.
- **Lot essai 1** : chaque souris reçoit 0,5ml du produit de référence (Cloféнал®).
- **Lot essai 2** : chaque souris reçoit 0,5ml de l'infusé à 50mg/ml.
- **Lot essai 3** : chaque souris reçoit 0,5ml l'infusé à 100mg/ml.

#### ➤ Au temps $T_0 + 30\text{min}$

La solution de la Carraghénine à 1% est injectée sous l'aponévrose plantaire des pattes postérieures arrière gauches sous un volume de 0,025ml à toutes les souris mises en expérience (Figure 14).

➤ **Au temps T0+4h**

Après avoir sacrifié les souris ayant été soumises à une forte concentration d'éther diéthylique, couper les pattes postérieures à hauteur de l'articulation (**Figure 14**) et les peser sur une balance analytique.

❖ **Expression des résultats**

- Calculer les moyennes des poids de la patte gauche et la patte droite pour chaque lot.
- Calculer le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{moyenne des poids des pattes gauches} - \text{moyenne des poids des pattes droites}}{\text{moyenne des poids des pattes droites}} \times 100$$

- Calculer le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins, par la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100$$

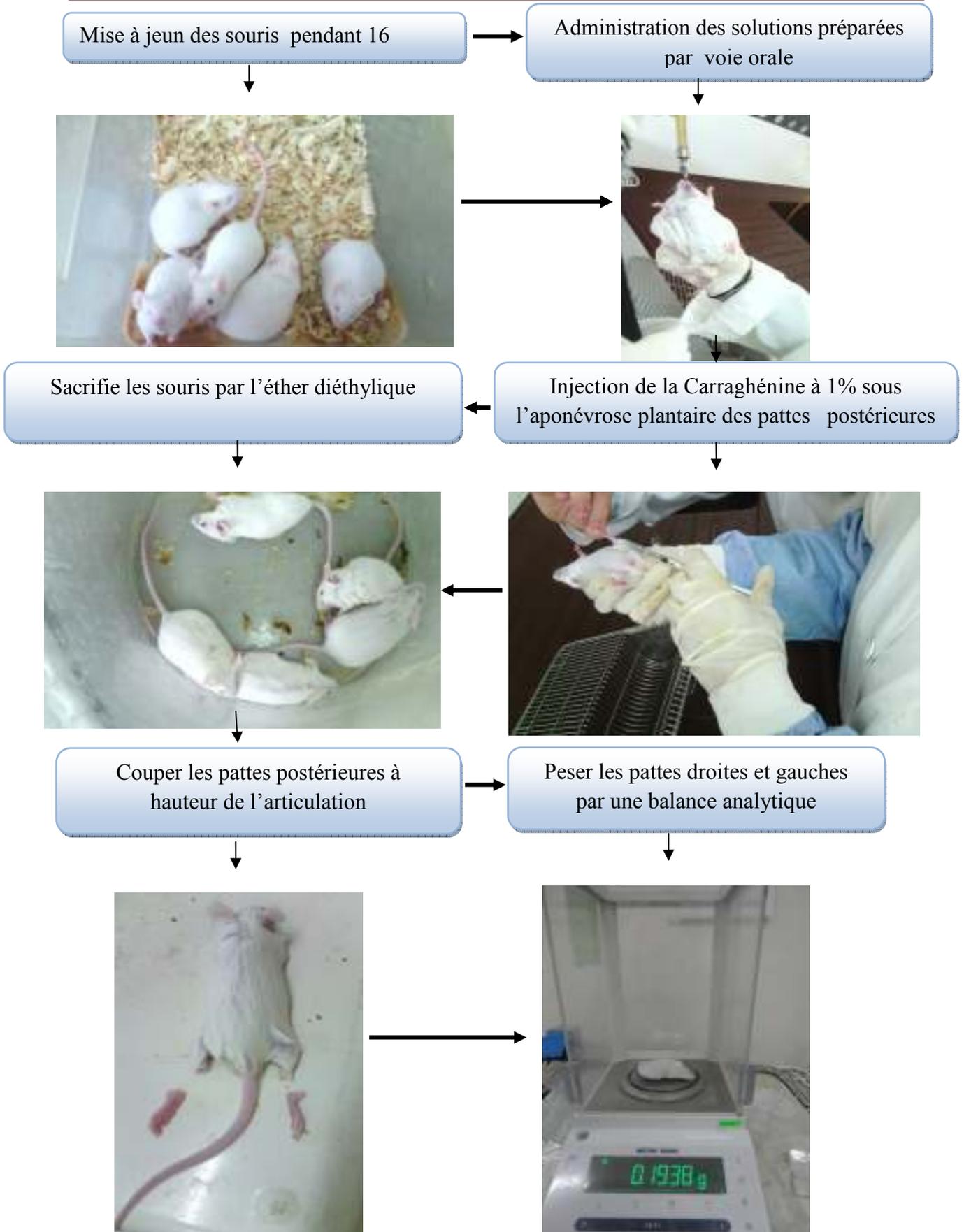


Figure 14: Différentes étapes d'activité anti-inflammatoire

### II.2.3.4. Evaluation de l'activité antispasmodique

#### ❖ Principe

L'injection d'acide acétique à 1% par voie intra-péritonéale provoque chez les souris une réaction douloureuse, cette douleur se manifeste par des spasmes sous forme de mouvements de torsion de l'abdomen avec étirement des pattes postérieures. Cette réaction peut être réduite par une substance antispasmodique à la dose active (**Rahman et al., 2005**).

#### ❖ Mode opératoire

La mise en évidence de l'effet antispasmodique sur les souris a été réalisée selon la méthode de **Rahman et al., (2005)**.

Les souris albinos sont réparties en 04 lots de 05 souris dont le poids corporel est compris entre 18g et 24g.

##### ➤ Au temps $T_0$

Les 04 solutions (l'eau distillé, Spasmodyl 80mg, l'infusé à 50mg/ml et l'infusé à 100mg/ml), sont administrées par voie orale (**Figure 15**).

- **Lot témoin** : chaque souris reçoit 0,5ml d'eau distillée.
- **Lot essai 1** : chaque souris reçoit 0,5ml du produit de référence (Spasmodyl 80mg).
- **Lot essai 2** : chaque souris reçoit 0,5ml de l'infusé à 50mg/ml.
- **Lot essai 3** : chaque souris reçoit 0,5ml de l'infusé à 100mg/ml.

##### ➤ Au temps $T_0 + 30\text{min}$

Injection de l'acide acétique à 1% par intra-péritonéale sous un volume de 0,2ml à toutes les souris mises en expérience (**Figure 15**).

##### ➤ Après 5min

Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, après l'injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5min, nous avons Compté le nombre de spasmes durant 10 minutes (**Rahman et al., 2005**).

#### ❖ Expression des résultats

Selon **Alaoui et al., (1998)**, l'activité antispasmodique est exprimée par le pourcentage de réduction du nombre de spasmes chez les souris traitées par rapport aux témoins selon la formule suivante :

$$\% \text{de réduction} = \frac{\text{moy des spasmes du lot T} - \text{moy des spasmes du lot E}}{\text{moy des spasmes du lot T}} \times 100$$

Lot T: lot témoin

Lot E: lot Essai

Mise à jeun des souris pendant 16 heures



Administration des solutions préparées  
par voie orale



Injection de l'acide acétique par voie  
intra-péritonéale



Compter le nombre de spasmes durant 10 min

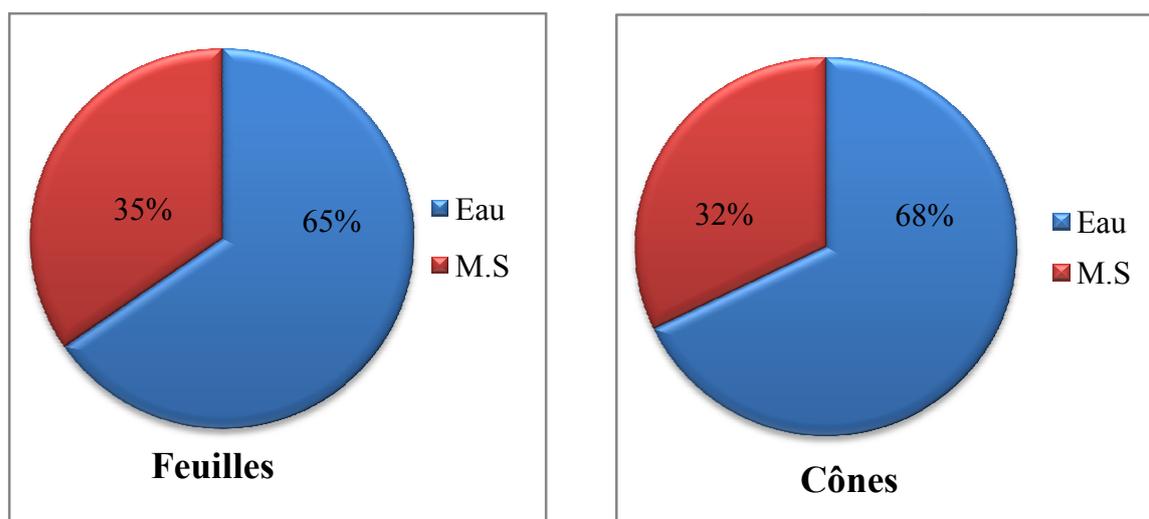
**Figure 15:** Différentes étapes d'une activité antispasmodique

### III. Résultats et Discussion

#### III.1. Résultats de l'étude phytochimique

##### III.1.1. Teneur en eau de la plante

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau V (**Annexe III**) et présentés par la figure 16.



M.S : Matière sec

**Figure 16:** Teneur en eau des organes végétaux du *Tetraclinis articulata*

D'après les résultats affichés dans le tableau V (**Annexe III**) et la figure 16, on constate que le Thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*) est riche en eau, les analyses de nos échantillons ont révélé un taux d'humidité compris entre 65 et 68%. Cela signifie approximativement que plus de la moitié de la plante fraîche est constituée d'eau. Nous constatons, en outre, que les cônes de *T. articulata* sont riches en eau avec un taux d'environ 68,86%, les feuilles avec un pourcentage de 65, 343. Cette teneur est dans les normes signalées par la **Pharmacopée Européenne, (2002)**, qui signale l'eau représente 60 à 80% de la matière fraîches des végétaux.

La teneur élevée en eau est en relation étroite avec l'activité métabolique. L'eau représente la phase aqueuse dans laquelle se font les réactions métaboliques, aussi elle fournit l'hydrogène indispensable aux réactions de biosynthèse (**Paris et Moyse, 1976**). En raison de cette teneur, le *T. articulata* à besoin d'une durée importante pour le séchage (10 à 15 jours).

### III.1.2. Potentiel d'Hydrogène de l'extrait aqueux (pH)

Le pH de l'extrait aqueux (l'infusé) du *T. articulata* est de 5,22, ce qui signifie l'infusé est faiblement acide. Pour cette raison nous pouvons administrer l'infusé aux souris lors de l'activité anti-inflammatoire et antispasmodique pour ne pas provoquer une inflammation au niveau de leurs tube digestif.

### III.1.3. Identification de quelques métabolites secondaires

Le screening phytochimique, nous a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires au niveau des feuilles de *T. articulata*. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau VI, et illustré dans la Figure 17 (Annexe III).

**Tableau VI:** Résultats du test colorimétrique de quelques métabolites secondaires existants chez *T. articulata*

Métabolites	Réactions	Résultats
<b>Anthocyanes</b>	- Coloration rouge	+++
<b>Leuco-anthocyanes</b>	- Coloration rouge	+++
<b>Tannins</b>	-Coloration bleu noire.	+++
• <b>T. catéchétiques</b>	- Pas de coloration rouge.	-
• <b>T. galliques</b>	-Coloration bleu foncée.	+++
<b>Quinones</b>		
• <b>Quinones libres</b>	-Pas de coloration rouge.	-
• <b>Quinones combinés</b>	-Pas de coloration rouge.	-
<b>Flavonoïdes</b>	-Coloration rouge orangé.	+++
<b>Alcaloïdes</b>		
• <b>Réactif de Dragendorff</b>	- Précipité rouge.	++
• <b>Réactif de Valser-Mayer</b>	- Précipité blanc jaunâtre.	++
<b>Saponosides</b>	-Précipité blanc.	++
<b>Glucosides</b>	-Pas de coloration rouge.	-
<b>Coumarines</b>	-Formation d'un trouble.	+++

(+++): Très riche. (++) : Moyennement riche. (-): Absent ou à l'état de trace.

D'après les résultats affichés dans le tableau VI et la figure 17 (**Annexe III**), nos résultats du test colorimétrique mené sur l'extrait aqueux et la poudre, révèlent la présence de plusieurs métabolites secondaires- en aspect qualitatif- avec un taux très important pour les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tanins, les flavonoïdes et les coumarines, et un taux moyen pour les alcaloïdes et les saponosides. Ces composés ont des rôles mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Alors que les quinones (libres ou combiné), les tannins catéchétiques et les glucosides sont absents ou à l'état de traces.

#### ❖ Les anthocyanes

Les anthocyanes font partie de la classe des flavonoïdes avec des caractéristiques particulières (**Martini, 2011**), ce sont des substances responsables de la coloration bleu des fleurs (du grec *anthos* désigne fleur et *kuanos* désigne bleu), s'appliquent à un groupe de pigments hydrosolubles responsables de la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleu ou violette de la plupart des fleurs (**Bruneton, 1999**). Comme tous les flavonoïdes, les anthocyanidines présentent une absorption caractéristique dans le domaine UV (**Markham, 1982**). Les anthocyanes possèdent des propriétés vitaminiques P par amélioration de la résistance des capillaires et diminution de leur perméabilité (**Martini, 2011**).

#### ❖ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent un fort effet antioxydant, et jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets (**Havsteen, 2002**). Les travaux de **Formica, (1995)**, semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires. En effet, ce sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes. Ils sont capables d'exercer des propriétés antiallergiques et antiulcérogènes (**Di-carlo et al., 1999**), antivirales et antibiotiques (**Milane, 2004**). Certaines autres études ont également montré que la consommation d'aliments riches en flavonoïdes diminue le risque du cancer (**Causse, 2005**).

#### ❖ Les tanins

Les propriétés astringentes des tanins est à la base d'autres propriétés (vulnéraire, anti- diarrhéique), elle permet la cicatrisation de la peau et des muqueuses et favorisent la vasoconstriction des petits vaisseaux (**Paolini et al., 2003**). En outre, les tanins ont un très grand pouvoir anti-inflammatoire (**Mota et al., 1985**).

Les plantes riches en tanins sont utilisées en cas du rhume, de maux de gorge, les infections internes et externes, blessures, coupures et brûlures (**Bruneton, 1999**).

### ❖ Les coumarines

Les coumarines sont des molécules biologiquement actives, elles manifestent plusieurs activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, anti-tumorale, diurétique et antimicrobienne (Ojala et al., 2000; Chen et al., 2004; Thati et al., 2007). Les coumarines sont connues pour leurs propriétés anti-œdémateuses (Bruneton, 1999).

### ❖ Les saponosides

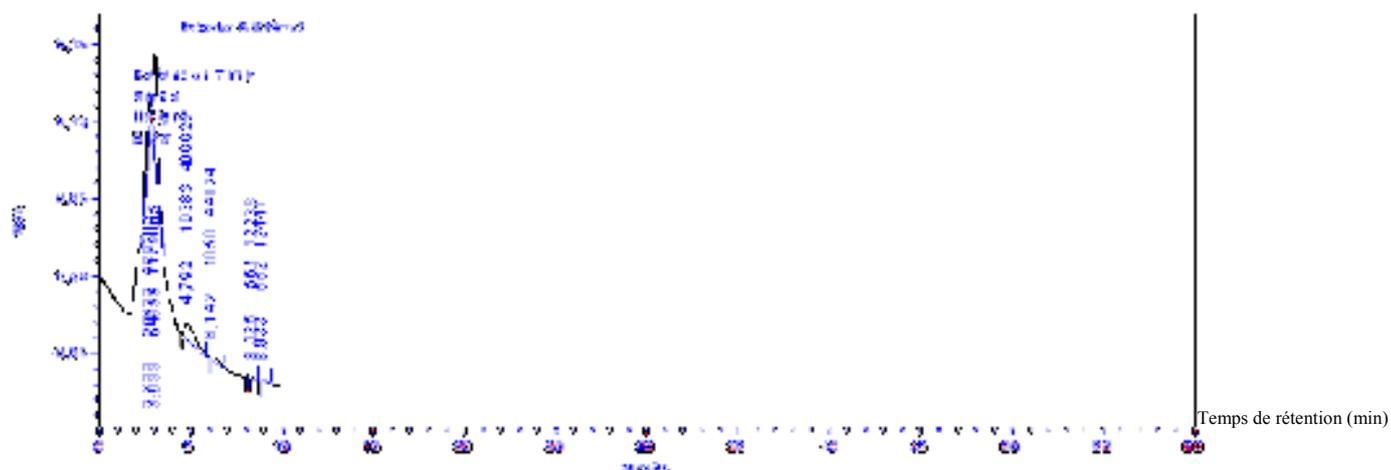
Ils ont une activité expectorante, et rendent un peu moussante la muqueuse des bronches inflammatoires et facilitent l'expectoration. De plus, ce sont de puissants hémolysants (Bruneton, 1999). Les saponosides ont particulièrement un effet anti-inflammatoire et anti-œdémateux, ils sont utilisés dans le traitement des aphtes et des ulcérations buccales (Baba-Aissa, 1999).

### ❖ Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées, le plus souvent d'origine végétale dont l'action sur l'homme et les animaux est extraordinaire (Ticli, 1999). Ils sont utilisés particulièrement en pharmacologie pour leurs effets antispasmodiques, anti-diarrhéiques et sédatifs du système nerveux central (Hans, 2007), anesthésique locale ou analgésique (Bruneton, 1999).

## III.1.4. Résultats de l'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La figure 18 représente le profil chromatographique obtenu par HPLC :



Les caractéristiques des composés sont regroupées dans le tableau VII.

**Tableau VII :** Caractéristiques chromatographiques des composés détectés chez *T. articulata*

Pics	Temps de rétention (min)	Surface	Teneur relatives (%)	Composés identifiés
1	2,733	488203	22,79	Non identifié
2	3,033	1178065	<b>54,99</b>	<b>Acide gallique</b>
3	4,792	406625	18,98	Vanilline
4	6,142	44824	2,09	Non identifié
5	8,325	12238	0,57	Quercétine
6	8,933	12447	0,58	Non identifié
<b>Totale</b>		<b>2142402</b>	<b>100</b>	-

Le profil chromatographique indique la présence d'un composé majoritaire (54,99%) avec un temps de rétention de 3,033min, ce composé est l'Acide gallique, un autre pic a été identifié aussi par comparaison des temps de rétention avec l'étalon de Vanilline dont le taux est de 18,98%, le troisième pic a été identifié, il correspond à la Quercétine. Cette dernière appartient à la classe des phytopigments hydrosolubles appelés flavonoïdes. Elle semble avoir de multiples effets bénéfiques sur la santé de l'homme, incluant une protection cardiovasculaire, une activité anticancéreuse, des effets antiulcéreux, ainsi qu'une activité antiallergique, antivirale, antioxydante et anti-inflammatoire (Tavric, 1994). La quercétine est indiquée dans toutes les situations inflammatoires parce qu'elle inhibe la formation des médiateurs de l'inflammation (Foreman, 1984).

### III.2. Résultats du rendement et analyse physico-chimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

#### III.2.1. Rendement en huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

Les résultats du rendement en H.E sont mentionnés dans le tableau VIII

**Tableau VIII :** Rendement en huile essentielle de *Tetraclinis articulata*

Echantillon	Feuilles	Cônes
Rendement (%)	0,2	0,3

Dans le but d'obtenir une masse d'huile essentielle suffisante pour effectuer toutes les analyses physico-chimiques et pharmacologiques, nous avons réalisé une série d'extraction de l'huile essentielle de *T. articulata*. La moyenne des rendements obtenus exprimée en pourcentage est de 0,2% pour les feuilles et 0,3% pour les cônes. Le rendement en H.E pour les feuilles étant inférieur à celui obtenue pour un espèce d'origine Marocaine (0,41%) obtenue par **Bourkhiss et al. (2007)**, et concernant le rendement en H.E pour les cônes il est supérieur à celui de la plante de la Tunisie (0,22%) rapporté par **Tékaya-Karaoui et al. (2007)**.

Cette variabilité dans le rendement peut être expliquée soit, par les facteurs pédoclimatiques (le sol, l'altitude et le climat), qui, d'après **Vekiari et al. (2002)**, peuvent influencer sur le rendement en huile essentielle, ou soit, par des pertes de l'H.E. lors de la décantation. En effet, l'efficacité de la décantation du condensat (eau + H.E) dépend principalement du phénomène de coalescence qui se produit entre gouttelettes de l'H.E. mais aussi du coefficient de partage de l'H.E. entre la phase organique et aqueuse car elles peuvent se disperser dans l'eau. Dans ces conditions, des pertes dues à une mauvaise décantation peuvent atteindre des pertes de 25% et plus de l'essence recueillie (**Bowles et Sackaitey, 1995**).

### III.2.2. Caractères physico-chimiques

#### III.2.2.1. Détermination des caractères physiques

##### ❖ Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques de l'huile essentielle de *T. articulata* sont consignés dans le tableau IX et illustrés par la figure 19 (**Annexe III**).

**Tableau IX** : Caractères organoleptiques de l'H.E de *T. articulata*

Caractères	Aspect	Couleur	Odeur
Résultats	Liquide mobile	Jaune claire	très forte odeur Caractéristique de la plante
Norme AFNOR ( <i>Juniperus communis</i> )	Liquide mobile	Incolore à jaune claire	Caractéristique à la fois térébenthinée

Après extraction de l'H.E de *T. articulata*, nous avons obtenu une huile d'aspect liquide mobile, de couleur jaune claire, avec une très forte odeur caractéristique de la plante. Nous avons comparés ces résultats avec ceux du genévrier commun (*Juniperus communis*) dans la Norme AFNOR, (2000), car les deux plantes appartiennent à la même famille des Cupressacées. Nous avons remarqué qu'elles ont les mêmes caractères en générale.

#### ❖ Indice de réfraction

$I_R = 1,475$  (AFNOR (*Juniperus communis*) NF 75-251 : 1,471-1,483).

L'indice de réfraction de H.E. de *T. articulata* est de 1,475, cette valeur est incluse dans l'intervalle de référence établie par la norme AFNOR, (2000).

L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés (Koba, 2003). Le faible indice de réfraction de l'H.E indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (Kanko et al., 2004).

### III.2.2.2. Détermination des indices chimiques

Les résultats de l'évaluation de la qualité de l'H.E de *T. articulata* sont mentionnés dans le tableau X.

**Tableau X:** Indices chimiques de l'H.E de *T. articulata*

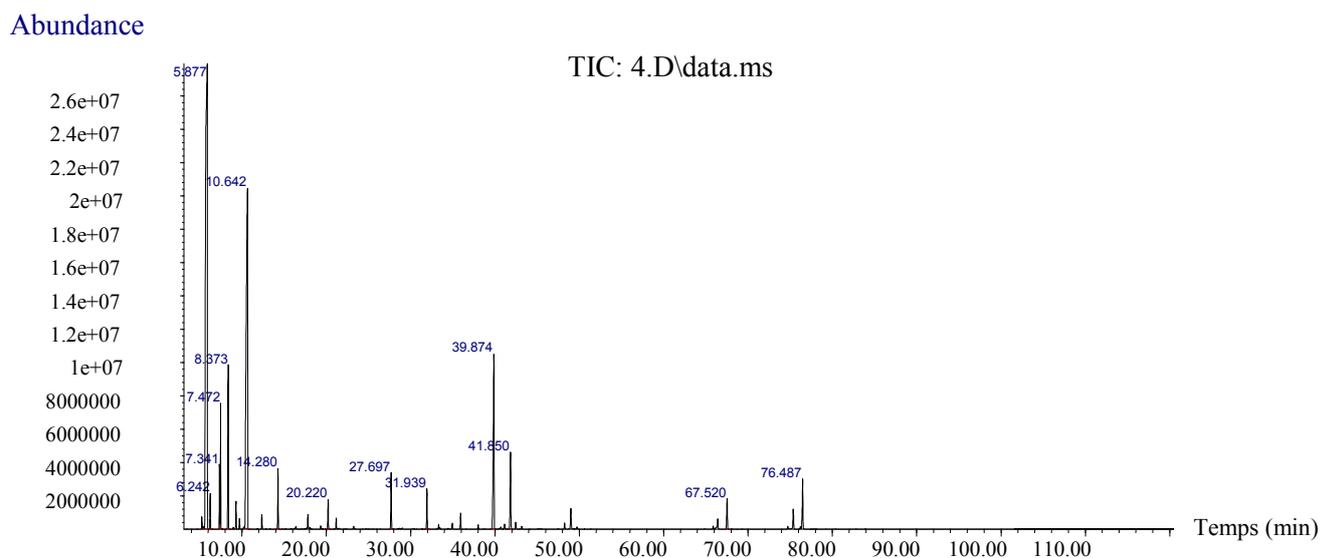
Indices	Indice d'acide	Indice d'ester	Indice de saponification
H.E. des feuilles	1,56	10,87	12,43
H.E. des cônes	1,60	10,95	12,55
Norme AFNOR ( <i>Juniperus communis</i> )	Maximum 2	Maximum 12	-

D'après le tableau X, nous avons remarqué que l'H.E. de *T. articulata* est légèrement acide. L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres, un indice d'acide inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres) (Kanko et al., 2004).

Nous remarquons aussi que l'indice d'ester est conforme à la norme AFNOR, (2000).

### III.2.3. Compositions chimiques de l'huile essentielle par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Nous avons réalisé l'analyse de l'H.E de *T. articulata* par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). La figure 20 illustre le chromatogramme de l'H.E des cônes.



**Figure 20** : Profil chromatographique d'analyse par CG/MS de l'H.E des cônes de *Tetraclinis articulata*

Cette analyse chromatographique a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau XI.

Tableau XI : Composition chimique de l'H.E des cônes de *Tetraclinis articulata*.

Pic	Temps de rétention (min)	Composé	Pourcentage (%)
1	5,243	Tricyclene	0.302
2	5,433	à-Thujene	0.104
3	5.879	<b><math>\alpha</math>-Pinene</b>	<b>41.513</b>
4	6.240	Camphre	0.662
5	7.342	<b><math>\alpha</math> -Phellandrene</b>	<b>1.361</b>
6	7.470	<b><math>\beta</math>-Pinene</b>	<b>2.603</b>
7	8.373	<b><math>\alpha</math> -Myrcene</b>	<b>4.616</b>
8	8.974	à-Phellandrene	0.045
9	9.300	3-Carene	0.621
10	9.702	à-Terpinen	0.268
11	10.215	Cymene	0.085
12	10.641	<b>D-Limonene</b>	<b>23.500</b>
13	11.824	à-cis-Ocimene	0.014
14	12.360	$\gamma$ -Terpinen	0.348
15	14.278	<b>Terpinolen</b>	<b>1.605</b>
16	17.816	d-Camphor	0.399
17	19.349	Linderol	0.085
18	20.223	Terpene-4-ol	0.835
19	23.254	Fenchyl acetate	0.086
20	27.701	<b>Acétate de bornyl</b>	<b>1.647</b>
21	29.007	$\beta$ -Thymol	0.038
22	33.326	Copaene	0.132
23	35.937	Caryophyllene	0.484
24	38.018	à-Caryophyllene	0.139
25	39.883	<b>Germacrene D</b>	<b>7.715</b>
26	41.853	<b><math>\gamma</math>-Muurolene</b>	<b>2.686</b>
27	42.465	ë-Cadinene	0.212
28	43.182	Z-Muurolene	0.084
29	48.265	Naphthalene, 1, 2, 3, 4, 6,8 a-hexahydro-1-isopropyl-4,7-dimethyl-	0.185
30	49.005	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	0.698
<b>Totale</b>			<b>93.072</b>

L'huile essentielle des cônes de *T. articulata* s'est révélée très riche chimiquement puisqu'elle contient plusieurs classes de composés chimiques. L'analyse par GC/MS a permis de mettre en évidence 30 composés représentant plus de 93% de la composition globale. Dont les composés majoritaires sont :  $\alpha$ -Pinène (41,513%), D-Limonene (23,5%), Germacrene D (7,715%), ces trois composés constituent plus de 72% de la composition totale.

Cependant, d'autres constituants présents en quantités moins importantes ont été identifiés, à savoir :  $\alpha$ -Myrcene (4,616%),  $\gamma$ -Muuroolene (2,686%),  $\beta$ -Pinene (2,603%), Acétate de bornyl (1,647%), Terpinolen (1,605%) et  $\alpha$ -Phellandrene (1,361%). Cette huile est caractérisée par un taux élevé d'un monoterpène hydrocarboné l' $\alpha$ -Pinène. Ce dernier est connu pour son effet inhibiteur contre différents germes microbiens (**Bourkhiss et al., 2007**).

**Tékaya-Karaoui et al. (2007)**, ont rapporté que l'huile essentielle des cônes de *T. articulata* de la Tunisie est caractérisée par la dominance du Camphrene (43,2%), Z-muuroolene (29%) Z- $\beta$ -ocimene (11,7%) Naphtalene (6,6%). Cette composition chimique est relativement différente de la notre qui est plus riche en  $\alpha$ -Pinène (41,513%), mais elle contient un taux plus faible en Z-muuroolene (0,084%). Au cours de cette même étude, **Bourkhiss et al. (2007)**, ont mentionnés la présence de l' $\alpha$ -pinène et du limonène dans l'huile essentielle des feuilles de *T. articulata* d'origine Marocaine, qu'on trouve aussi dans notre essence, mais avec des pourcentages différents.

Cette variation dans la composition montre la diversité chimique, la quelle peut être expliquée soit, par les facteurs pédoclimatiques (le sol, l'altitude et le climat), soit par les facteurs écologiques.

### III.3. Résultats des activités biologiques

#### III.3.1. Résultats de l'activité antimicrobienne

Après incubation des boîtes à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures, nous avons retiré les boîtes de Pétri pour mesurer les zones d'inhibition et interpréter les résultats.

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al. (2009)**. Cet auteur a classé les diamètres des zones d'inhibitions ( $\emptyset$ ) de la croissance microbienne en Cinq classes :

- ✓ Très fortement inhibitrices :  $\emptyset \geq 30$  mm.
- ✓ Fortement inhibitrices :  $21\text{mm} \leq \emptyset \leq 29\text{mm}$ .
- ✓ Modérément inhibitrices :  $16\text{mm} \leq \emptyset \leq 20\text{mm}$ .
- ✓ Légèrement inhibitrices :  $11\text{mm} \leq \emptyset \leq 16\text{mm}$ .
- ✓ Non inhibitrices :  $\emptyset < 10\text{mm}$ .

A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

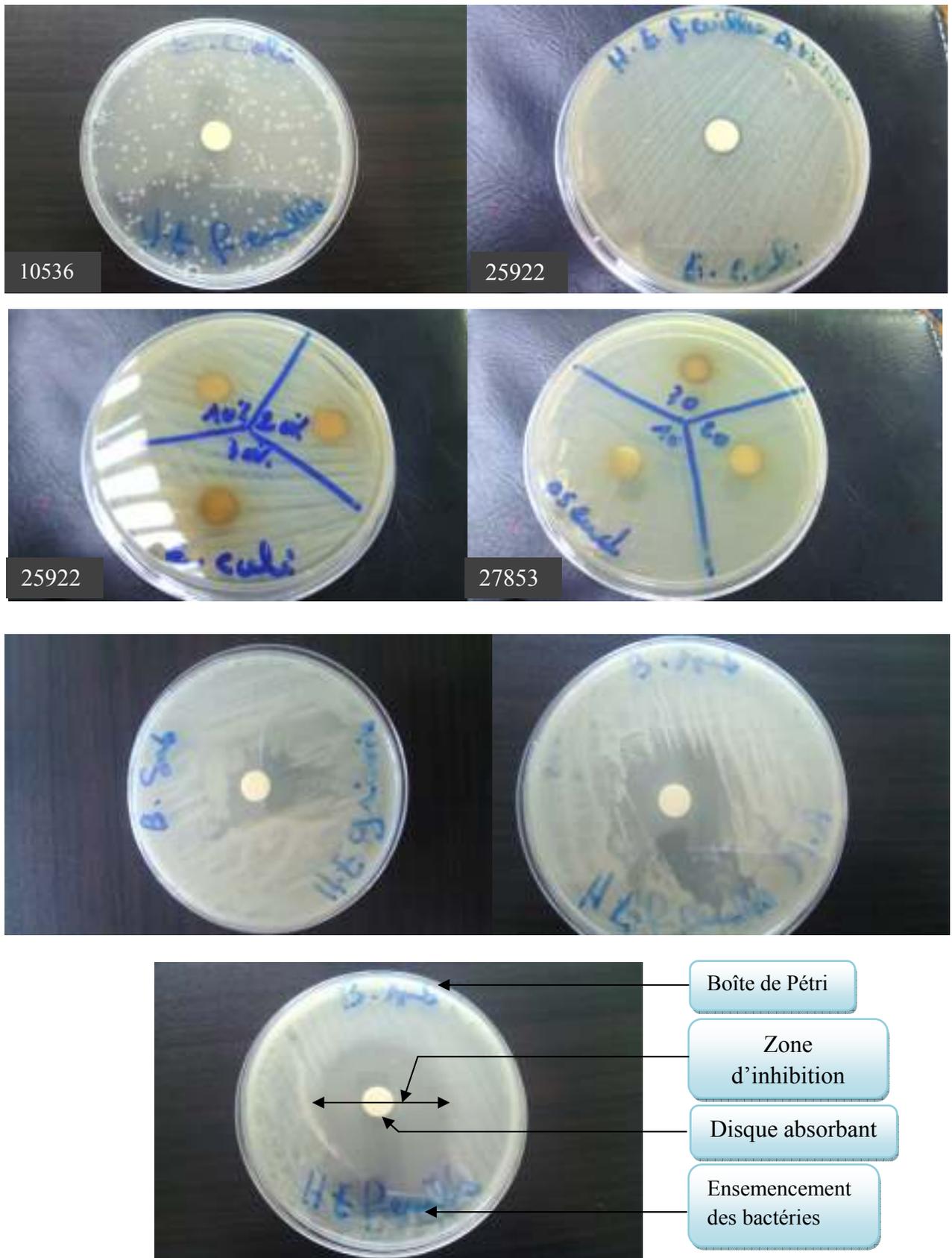
Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des feuilles, des cônes et l'extrait aqueux de *T. articulata* obtenus par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes sont regroupés dans le tableau XII et illustrés par les figures 21, 22 et 23.

**Tableau XII:** Diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes

Souches utilisées		ATTC	H.E des feuilles		H.E des cônes		Extrait aqueux (mg/ml) Aroma		
			Aroma	M.A	Aroma	M.A	100	200	300
Bactéries à Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	10536 SAIDAL	18	9	9	9	9	9	9
	<i>Escherichia coli</i>	25922 Koléa	16	9	9	9	9	10	12
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853 Koléa	9	9	9	9	9	10	18
Bactéries à Gram (+)	<i>Bacillus subtilis</i>	6633 SAIDAL	45	30	24	9	9	9	9
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228 SAIDAL	55	42	17	9	9	14	17
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 Koléa	14	9	9	9	12	14	17
	<i>Staphylococcus aureus</i>	43300 Koléa	13	9	9	9	10	11	12
Levures	<i>Candida albicans</i>	10231 SAIDAL	24	9	9	9	9	9	9
	<i>Candida albicans</i>	43433 Koléa	25	9	9	9	9	9	9
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601 Koléa	22	9	9	9	9	9	9

**Aroma :** Aromatogramme.

**M.A :** Micro-atmosphère.



**Figure 21:** Activité inhibitrice vis-à-vis: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*

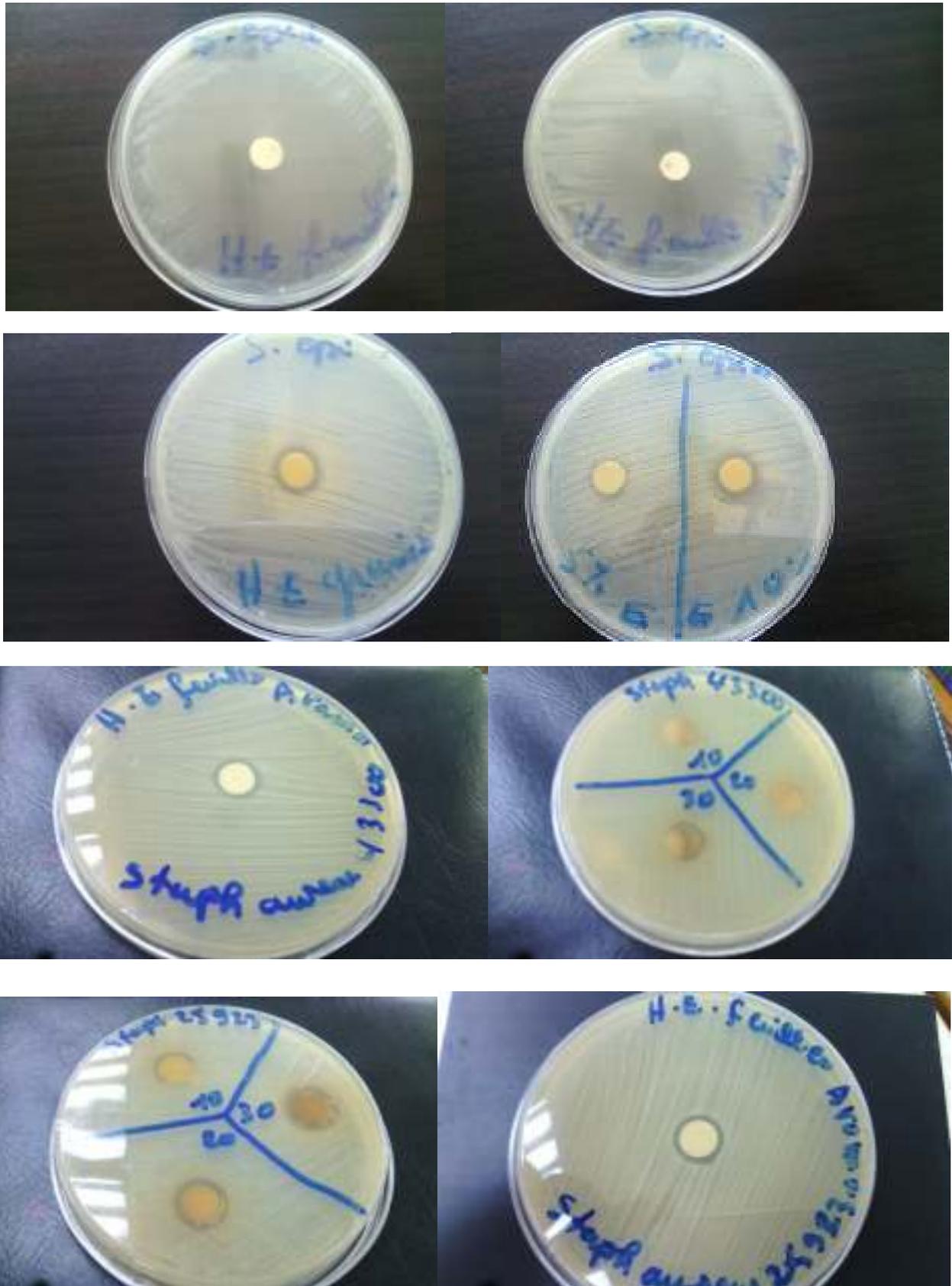


Figure 22: Activité inhibitrice vis-à-vis: *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*



**Figure 23:** Activité inhibitrice vis-à-vis les levures: *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*

### ❖ Résultats du test microbien par la méthode de l'Aromatogramme

#### ➤ Huile essentielle des feuilles

L'H.E des feuilles présente une activité inhibitrice sur la croissance de la totalité des germes microbiens (**Figure 21, 22 et 23**), sauf pour *Pseudomonas aeruginosa* qui se montre résistante. Si on prend en considération les diamètres d'inhibition, l'H.E des feuilles est plus active sur *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus subtilis* avec des diamètres d'inhibition respectivement de 55 et 45 mm.

L'H.E. des feuilles est active sur les levures : *Candida albicans* (ATTC : 10231), *Candida albicans* (ATTC : 43433) et *Saccharomyces cerevisiae* avec des diamètres d'inhibition de 24, 25 et 22mm respectivement. En effet, l'H.E est modérément active sur *Escherichia coli* (ATTC : 10536) et *Escherichia coli* (ATTC : 25922), avec des diamètres d'inhibition respectivement de 18 et 16mm.

En outre, l'H.E des feuilles est légèrement active sur *Staphylococcus aureus* (ATTC : 25923) et *Staphylococcus aureus* (ATTC : 43300), avec des diamètres d'inhibition respectivement de 14 et 13mm.

Selon l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par **Mutai et al. (2009)**, les diamètres d'inhibition des souches testées en aromagramme varient entre 13 et 55mm, donc l'H.E des feuilles de *T. articulata* possède une très forte activité inhibitrice sur les deux souches bactériennes *B. subtilis* et *S. epidermidis*, forte activité inhibitrice sur les deux souches *C. albicans* et *S. cerevisiae*, modérément inhibitrice sur la souche d'*E. coli*, légèrement inhibitrice sur la souche de *S. aureus* et non inhibitrice sur la souche de *P. aeruginosa*.

L'activité antimicrobienne de cette H.E est due principalement à son profil chimique. Il est à préciser que notre essence est caractérisée par la présence de l' $\alpha$ - pinène (41,513%) connu pour son effet inhibiteur (**Bourkhiss et al., 2007**). En effet, une étude réalisée par **Angioni et al. (2003)**, sur les huiles essentielles des feuilles de *Juniperus oxycedrus* a montré qu'elles présentent une bonne activité inhibitrice de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*. Cette huile essentielle est caractérisée par l'abondance de l' $\alpha$ -Pinène (environ 86 %).

En outre, le pouvoir antimicrobien élevé de l'H.E de *T. articulata* est due essentiellement à sa composition chimique très riche en alcools terpéniques. Plusieurs auteurs (**Cox et al., 2001 ; Inouye et al., 2001 ; Hammer et al., 2003**) ont travaillé sur l'activité antimicrobienne des composés majoritaires des H.E qu'ils ont classés dans l'ordre décroissant suivant : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > éthers > hydrocarbures.

### ➤ Huile essentielle des cônes

L'H.E. des cônes ne présente pas une activité inhibitrice sur la totalité des germes microbiens sauf pour *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus epidermidis* avec des diamètres d'inhibition respectivement de 24 et 18mm (**Figure 22**).

Selon l'échelle d'estimation de l'effet antimicrobien donnée par **Mutai et al. (2009)**, l'H.E des cônes de *T. articulata* possède une forte activité inhibitrice sur la souche de *B. subtilis*, une moyenne activité inhibitrice sur la souche de *S. epidermidis* et non inhibitrice sur les souches *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* et *S. cerevisiae*.

### ➤ Extrait aqueux (l'infusé)

L'extrait aqueux des feuilles de *T. articulata* présente une activité inhibitrice sur la croissance de certains de germes microbiens à savoir *E. coli* (Ø=12mm), *P. aeruginosa* (Ø=18mm), *S. epidermidis* (Ø=17mm), *S. aureus* (ATTC : 25923) (Ø=17mm) et *S. aureus* (ATTC : 43300) (Ø=12mm) (**Figure 21 et 22**). Il est à noter aussi que ce diamètre augmente avec l'augmentation de la concentration.

L'activité antimicrobienne de cet extrait (l'infusée) est due principalement à son profil chimique. Il est précisé que notre extrait est caractérisé par la présence des métabolites secondaires à savoir les flavonoïdes et les coumarines qui sont connus pour leurs effets antimicrobien (**Milane, 2004 ; Thati et al., 2007**).

### ❖ Résultats du test microbien par la méthode de Micro-atmosphère

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de la phase vapeur de l'H.E de *T. articulata*, nous avons utilisé la technique de la micro-atmosphère. Les résultats de cette étude sont rapportés dans le tableau XII et la Figure 21 et 22. A la lecture de ces résultats, il apparaît clairement que l'action inhibitrice de la phase vapeur (Micro-atmosphère) est inférieure à celle de la phase liquide (Aromatogramme).

L'H.E des feuilles est plus active sur *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus epidermidis*, avec des diamètres d'inhibition respectivement de 30 et 42mm, et non inhibitrice sur les autres souches microbiennes.

En outre, l'H.E des cônes ne possède aucune activité inhibitrice vis-à-vis toutes les souches microbiennes.

### III.3.2. Résultats de l'activité antioxydante

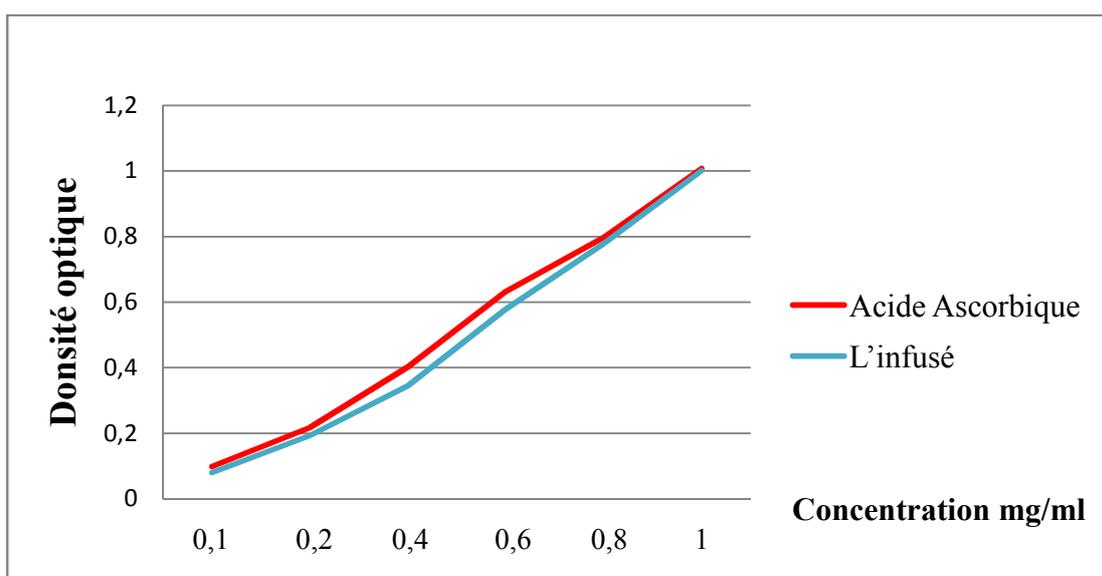
L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par deux méthodes différentes à savoir la technique de réduction du fer « FRAP » (ferric reducing antioxydant power) pour l'extrait aqueux (l'infusé) et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) pour l'H.E et l'extrait aqueux (l'infusé) de *T. articulata*.

### III.3.2.1. Résultats de l'activité antioxydante par la méthode de réduction du fer « FRAP »

L'activité antioxydante de l'extrait aqueux (l'infusé) de *T. articulata* a été évaluée par la méthode de FRAP (Ferric reducing antioxydant power). Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (Benzie et Strain, 1996) (Figure 24, Annexe III).

La présence des réducteurs dans les extraits de la plante provoque la réduction de  $Fe^{+3}$ /complexe ferricyanide à la forme ferrique. Par conséquent,  $Fe^{+2}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Chung et al., 2002).

Les valeurs d'absorption de l'acide ascorbique qui est utilisé comme référence, ainsi que les valeurs d'absorption de l'extrait aqueux (l'infusé) des feuilles de *T. articulata*, sont représentées dans le tableau XIII (Annexe III), et illustrés par la figure 25.



**Figure 25:** Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et l'extrait aqueux en fonction des différentes concentrations

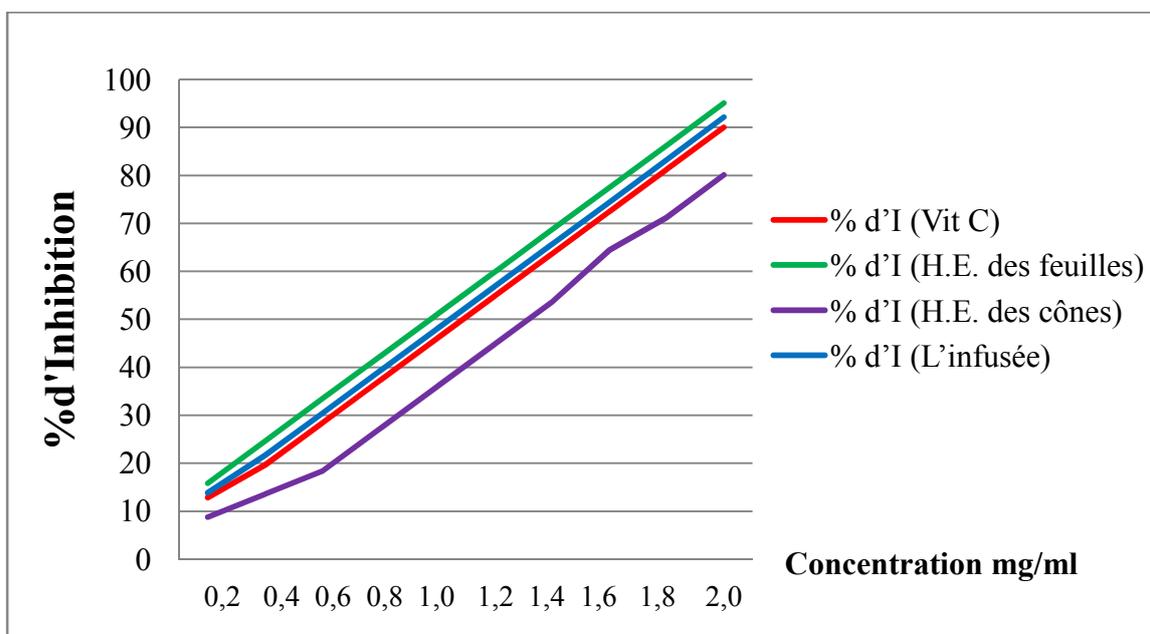
D'après le tableau XIII (Annexe III) et la figure 25, ces résultats montrent que le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de *T. articulata* est dose-dépendante (dépend de la concentration). L'extrait aqueux (l'infusé) des feuilles a montré une capacité à réduire le fer identique de celui de l'acide ascorbique.

L'activité antioxydante de cet extrait est due principalement à son profil chimique. Il est précisé que notre extrait est caractérisé par la présence des flavonoïdes qui sont connus pour leurs effets antioxydant (Havsteen, 2002).

### III.3.2.2 Résultats de l'activité antioxydante par la méthode d'inhibition du radical DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

L'activité antioxydante de l'H.E et de l'extrait aqueux (l'infusé) de *T. articulata* a été évaluée par la méthode d'inhibition du radical DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Figure 26 et 27, Annexe III).

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH, sont mentionnés dans le tableau XIV (Annexe III), et révélé dans la figure 28.



**Figure 28 :** Pourcentage d'inhibition des échantillons testés en fonction de différentes concentrations

D'après la figure 28, nous constatons que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine C, ou l'H.E ou l'extrait de *T. articulata*. Nous avons remarqué que le pourcentage d'inhibition pour l'H.E des feuilles et l'extrait aqueux (95 et 92% respectivement) est supérieur à celui de la vitamine C (90%) pour toutes les concentrations utilisés, ce qui explique que l'H.E des feuilles et l'extrait aqueux de *T. articulata* présentent une activité antioxydante importantes par comparaison avec la Vit C.

Concernant l'H.E des cônes, nous avons remarqué que le pourcentage d'inhibition de cette dernière (80%) est inférieur à celui de la vitamine C pour toutes les concentrations, ce qui explique que l'H.E des cônes de *T. articulata* a une activité antioxydante moyenne. Ces résultats montrent que l'H.E des cônes possède une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celui de l'H.E des feuilles et l'extrait aqueux.

Ces résultats sont semblables à ceux rapportés par **Bourkhiss et al. (2010)**, le camphre, prédominant dans l'H.E est doté d'un pouvoir antioxydant considérable (**Bourkhiss et al., 2010**). Et concernant le pouvoir antioxydant l'extrait aqueux est due principalement à la présence des flavonoïdes qui sont connus pour leurs effets antioxydant (**Havsteen, 2002**), de plus la quercétine est présente dans l'infusé connue pour leur effet antioxydant (**Tavric, 1994**).

### III.3.3. Résultats de l'activité anti-inflammatoire

Après l'administration de l'eau distillée, le produit de référence (Clofénal®) et l'extrait de la plante à des souris, chez lesquelles on a provoqué une inflammation par l'injection de la Carraghénine à 1% dans la surface plantaire des pattes postérieures, nous avons mesuré les poids des pattes postérieures (en g) des quatre lots. Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux XV, XVI, XVII et XVIII (**Annexe III**) et illustrés par la figure et 29.

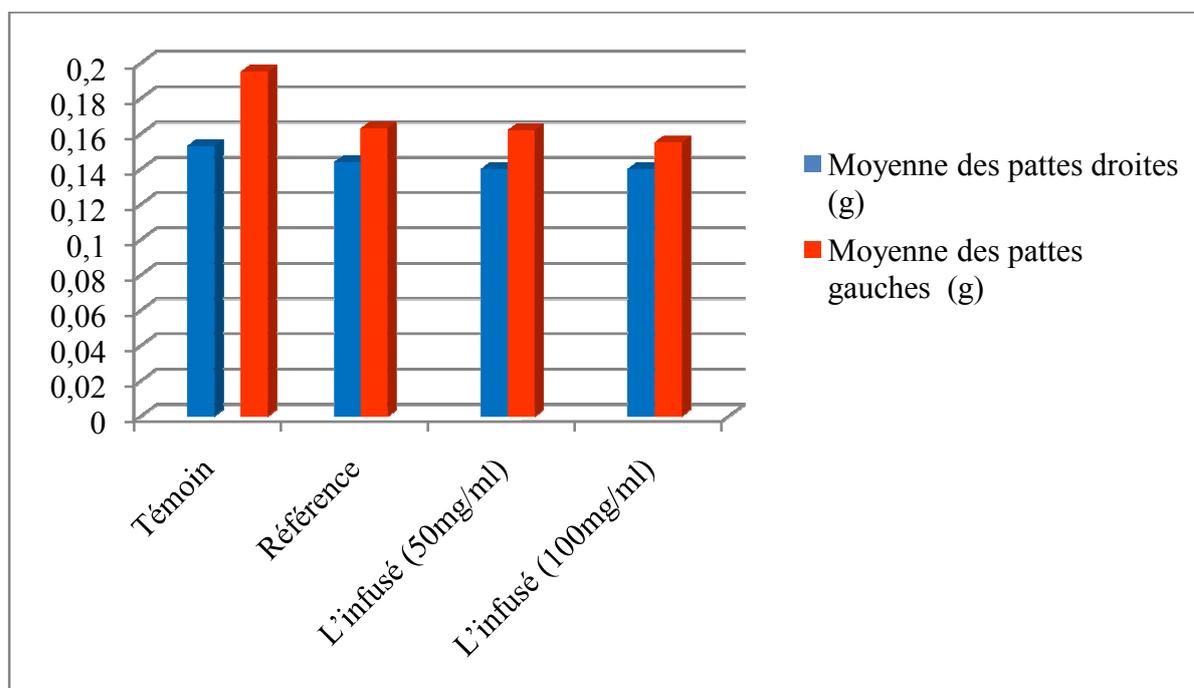
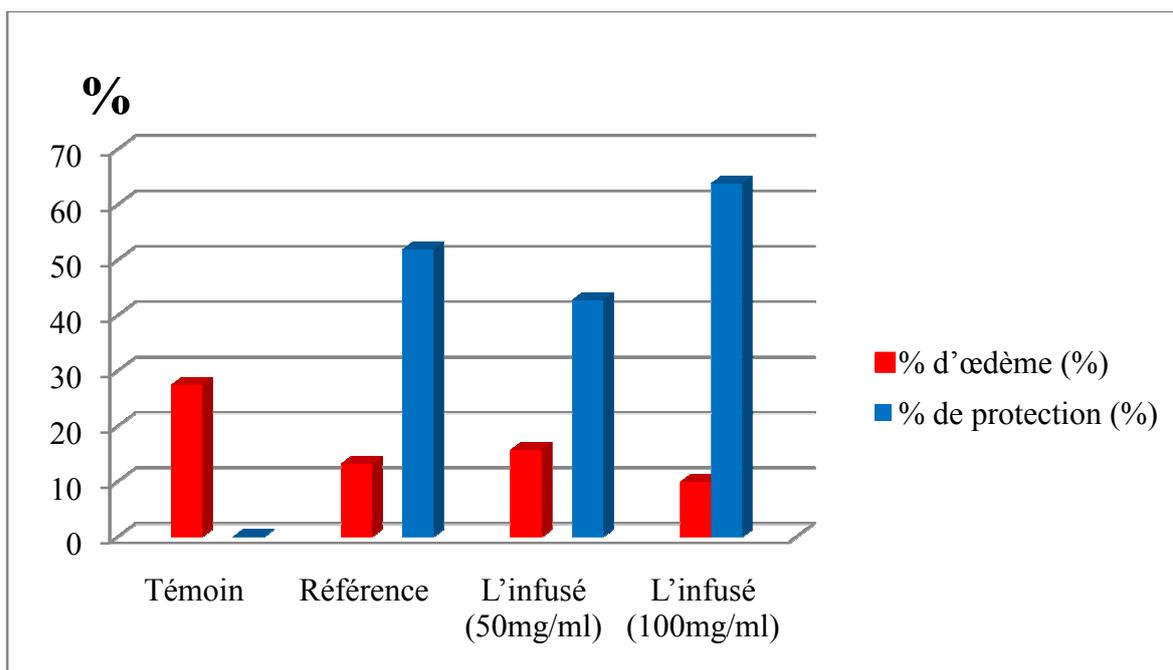


Figure 29 : Moyenne des pattes gauches et droites pour les quatre lots

Le pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les quatre lots sont reportés dans la figure 30.



**Figure 30 :** Pourcentage d'œdème et de réduction d'œdème pour les quatre lots

Au cours de ce test, nous avons évalué la diminution d'œdème chez les lots témoin, produit de référence, l'infusé à 50mg/ml et l'infusé à 100mg/ml, préalablement provoqué par l'injection de la Carraghénine.

Après 30 min de l'injection de quatre traitements (témoin, produit de référence, l'infusé à 50mg/ml et l'infusé à 100mg/ml), nous avons injecté la Carraghénine.

Dans les quatre heures qui ont suivi le traitement, nous avons remarqué que l'infusé (100mg/ml) a induit un taux de réduction d'œdème avec 63,82%. Ce taux est supérieur à celui obtenu suite au traitement à base de Clofénal®. En effet, ce dernier a provoqué une réduction d'œdèmes de 51,91% (**figure 30**).

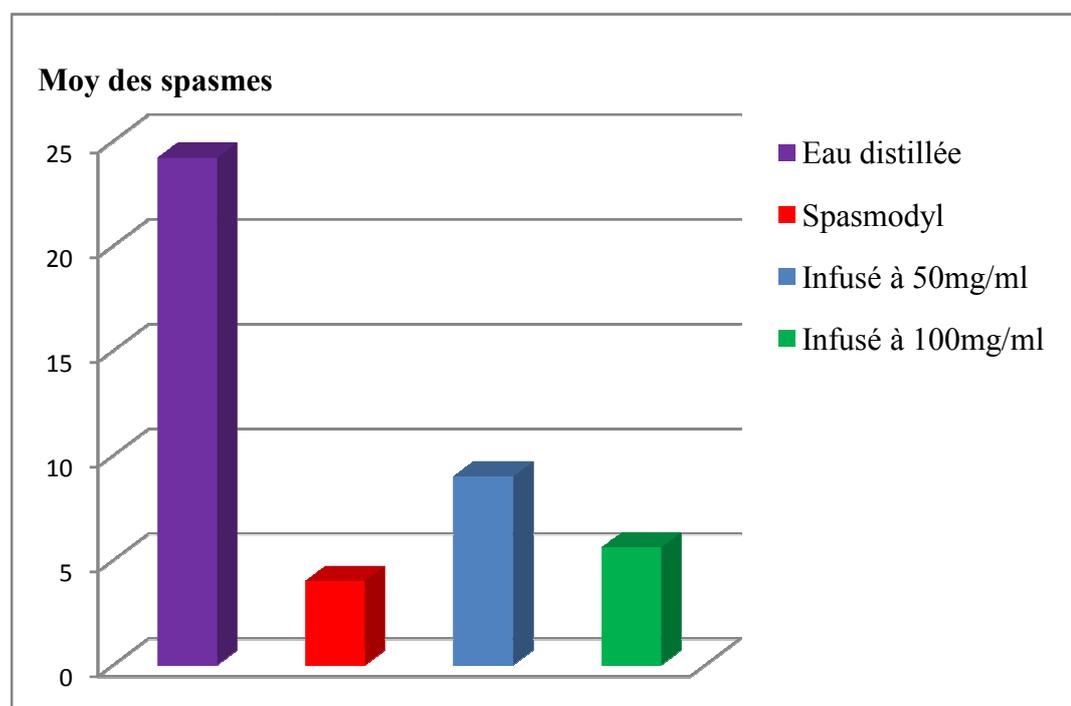
Concernant l'infusé à 50mg/ml, nous avons remarqué que le pourcentage de réduction d'œdème de cette dernière (42,77%) est inférieur à celui du produit de référence (51,91%), mais elle reste importante par rapport au lot témoin.

L'activité anti-inflammatoire de cet extrait est due principalement à son profil chimique. Il est précisé que notre extrait est caractérisé par la présence des métabolites secondaires à savoir les flavonoïdes, les saponosides et les coumarines qui sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires. Les travaux de **Formica, (1995)**, semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Les tanins aussi ont un très grand pouvoir anti-inflammatoire (**Mota et al., 1985**). De même, les saponosides ont particulièrement un effet anti-inflammatoire (**Baba-Aissa, 1999**). D'après **Foreman, (1984)**, la quercétine est indiquée dans toutes les situations inflammatoires parce qu'elle inhibe la formation des médiateurs de l'inflammation.

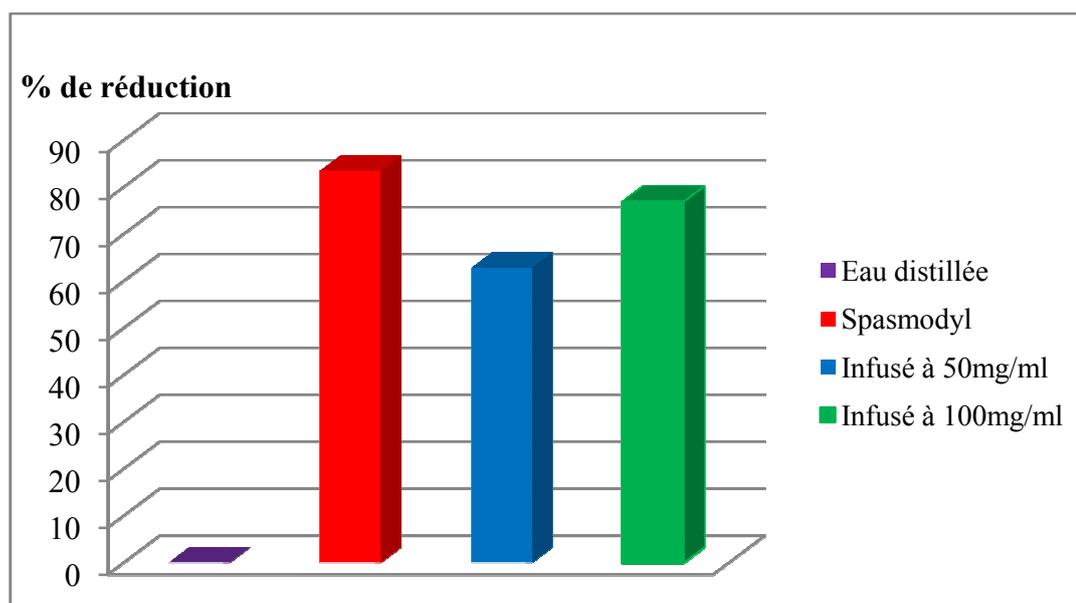
### III.3.4. Résultats de l'activité antispasmodique

L'activité antispasmodique de l'extrait aqueux (l'infusé) de *T. articulata* (50 et 100mg/ml) a été évaluée par le dénombrement des spasmes ou des contractions abdominales induites chez les souris par injection intra-péritonéale de l'acide acétique.

Les résultats du nombre de spasmes pour chaque lot pendant 10 minutes et le pourcentage de réduction du nombre de spasmes chez les souris traitées par rapport aux témoins sont mentionnés dans le tableau XIX (**Annexe III**), et illustrés par les figures 31 et 32.



**Figure 31** : Moyenne du nombre de spasmes pour chaque lot pendant 10 minutes



**Figure 32 :** Pourcentage de réduction du nombre de spasmes chez les souris traitées par rapport aux témoins

D'après les résultats que nous avons obtenus, il apparaît qu'après l'injection de l'acide acétique aux quatre lots, le lot de souris traité avec le médicament (Spasmodyl) a présenté un nombre de contractions le plus faible (4 spasmes par 10 minutes), avec le pourcentage de réduction des contractions le plus élevé (83,47%). En revanche, le lot traité avec l'eau distillée (témoin) a présenté le nombre de contractions le plus élevé (24,2 spasmes par 10 minutes). Concernant nos échantillons en extrait aqueux de *T. articulata*, nous remarquons que plus la dilution à injecter augmente, plus le nombre de spasmes diminue. Ce nombre de contractions respectivement de 9 et 5,6 pour les deux doses (50 et 100 mg/ml), avec le pourcentage de réduction des contractions respectivement de 62,81% et 76,86%.

L'extrait aqueux de *T. articulata* contient des flavonoïdes et des saponines qui possèdent des propriétés antispasmodiques (Baba-Aissa, 1999). De plus, l'extrait aqueux contient aussi les alcaloïdes qui sont utilisés particulièrement en pharmacologie pour leurs effets antispasmodiques (Hans, 2007).

## Conclusion

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algérienne à caractère thérapeutique, nous nous sommes intéressés à l'étude du thuya de Berbérie « *Tetraclinis articulata* » très répandue en Afrique du nord.

Nous avons effectué une étude phytochimique qui a montré La teneur en eau est de 65% pour les feuilles et 68% pour les cônes, le screening phytochimique, nous a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires : les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tanins, les flavonoïdes, les coumarines, les alcaloïdes et les saponosides. La diversité de ces métabolites et leur présence au niveau de la plante renforce les vertus thérapeutiques de cette dernière.

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de l'extrait aqueux de *T. articulata* a montré la présence de l'acide gallique pour les acides phénols, vanilline pour les tanins et la quercétine pour les flavonoïdes.

Le rendement en huile essentielle (H.E) est faible, de l'ordre 0.2% pour les feuilles et 0,3% pour les cônes. L'analyse des caractères organoleptiques, nous a permis d'obtenir une huile d'aspect liquide mobile, de couleur jaune claire, avec une très forte odeur caractéristique de la plante. La qualité de l'H.E a été évaluée par la détermination des indices chimiques : l'indice d'acide (1,56 pour les feuilles et 1,60 pour les cônes), l'indice d'ester (10,87 pour les feuilles et 10,95 pour les cônes) et l'indice de saponification (12,43 pour les feuilles et 12,55 pour les cônes).

Parallèlement, l'analyse de la composition chimique de l'H.E par Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) a mis en évidence la présence de trente constituants, représentant 93.072%. Les composés majoritaires sont :  $\alpha$ -Pinène (41,513%), D-Limonene (23,5%), Germacrene D (7,715%),  $\alpha$ -Myrcene (4,616%),  $\gamma$ -Muurolene (2,686%),  $\beta$ -Pinene (2.603%), Acétate de bornyl (1,647%), Terpinolen (1,605%) et  $\alpha$ -Phellandrene (1,361%).

L'étude de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose, a montré que l'H.E des feuilles de *T. articulata* est très active contre *B. subtilis* et *S. epidermidis*, active contre *C. albicans* et *S. cerevisiae*, modérément active contre *E. coli*, légèrement active sur la souche de *S. aureus* et non active sur la souche de *P. aeruginosa*.

Alors que l'H.E des cônes est active contre *B. subtilis*, moyennement active contre *S. epidermidis*, et non active sur les souches *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* et *S. cerevisiae*. En effet, l'infusé des feuilles présente une activité inhibitrice moyenne sur la croissance de certains germes microbiens comme *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* et *S. aureus*.

L'H.E des feuilles testée par la méthode de Micro-atmosphère, s'est révélée active contre *B. subtilis* et *S. epidermidis*. Contrairement, l'H.E des cônes ne possède aucune activité inhibitrice vis-à-vis toutes les souches microbiennes.

En outre, l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) de l'infusé de *T. articulata* a montré que ce dernier possède un pouvoir antioxydant modéré. Alors que par la méthode de DPPH, l'infusé et l'H.E montrent un fort pouvoir antioxydant.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire nous a amené à déduire que l'infusé de *T. articulata* est efficace pour les doses administrées aux souris contre les inflammations causées par la Carraghénine.

Nous avons contribué à l'évaluation de l'effet antispasmodique de l'infusé de *T. articulata*, sur les souris. Notre étude a montré que l'infusé possède un effet antispasmodique contre les douleurs causées par l'injection de l'acide acétique.

Afin de poursuivre et d'approfondir tous les volets abordés dans ce travail, nous proposons comme perspectives les points suivants :

- Compléter l'analyse de la composition chimique par CG/MS de l'huile essentielle des feuilles de *T. articulata*.
- Compléter les indices physico-chimiques (densité, pouvoir rotatoire).
- Etudier d'autres propriétés thérapeutiques telles que l'activité antidiabétique, diurétiques et astringente.
- Elargir et varier la gamme des souches microbiennes.

## Références Bibliographiques

**Abdessamed K, (1981)** : Le Cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica M.*) dans les massifs de l'Aurès et de Belezma; Etude phytosociologique et problèmes de conservation et d'aménagement. Thèse de docteur- ingénieur. Faculté des sciences et techniques (ST), Jérôme. Marseille. 149 p.

**Abi-Ayad F.Z ; Abi-Ayad M ; Lazzouni H.A et Rebiahi S.A, (2011)** Antibacterial activity of essential oil extracted from leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Algeria flora. Laboratoire produits naturels activités et synthèse. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. Scholars Research Library. 1 (1): 1-6.

**Abi Faraj C, (2005)** : A guide to medicinal plants in north africa. Edition : IUCN, Malaga (Spain). P256, pp 23-25.

**AFNOR, (2000)** : Les huiles essentielles. Tome 2. Vol 1 et 2. Paris : Tour Europe. 663p.

**Ait Igri M.M ; Holeman A ; Ildrissi and Berrada M, (1990)** : contribution to the essential oil chemical study of *Tetraclinis articulata* terminal branches and wood, *Plant. Med. Phytothér*, (24): 36-43.

**Allali H; Benmehdi H; Dib M.A; Tabti B; Ghalem S et Benabadji N, (2008)** : Phytotherapy of diabetes in West Algeria. *Asian J. Chem*; 20: 2701–2710.

**Angioni A ; Barra A ; Russo M.T ; Coroneo V ; Dessip S et Cabras P, (2003)** : Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 51,3073-3078.

**Arni C et Couplan F, (2001)** : Le préparateur en pharmacie. Paris : Techniques et documentations. 44 p.

**Baba Aissa F, (1999)** : Encyclopédie des plantes utiles (flore d'Algérie et du Maghreb). Edition : librairie moderne. p 368. pp46.

**Baba Aissa F, (2000)** : Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales, d'Orient et d'occident), EDAS-Librairie Modernes- Rouïba, Algérie. 45p.

## Références Bibliographiques

---

**Baba Aissa F, (2011) :** Encyclopédie des plantes utiles : Plantes médicinales, Plantes aromatiques et Plantes alimentaire. Flore d'Algérie (Méditerranéenne, maghrébine et sahariennes). P 471, pp 357-358.

**Bärtels A, (1998) :** Guide des plantes du bassin méditerranée. Edition : Eugen Ulmer. P 400, pp 99.

**Bartosz G, (2003):** Generation of reactive oxygen species in biological systems. Coments on Toxicology, P 21, pp 9-5.

**Bellakhder J, (1997) :** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Édition : Ibis Press, Paris, pp 271–272.

**Benzie I.F.F and Strain J.J, (1996):** The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. P239, pp 70-76.

**Berkan T ; Ostunes I ; Iermiolu F et Ozer A, (1991) :** Anti-inflammatory analgesic and antipyretic effets of an aquous extract of neuta, planta medical. 375p.

**Berset I.F and Cervelier J.J, (1996):** The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. P239, pp 70-76.

**Bonotte B ; Olsson N.O et LOrcerie B, (2003) :** Le syndrome inflammatoire. La revue du praticien. Pp 487-490.

**Blanc B et Siproudhis L, (2006) :** Pelvi-périnéologie. Edition : Springer-Verlag France. P 619, pp 119.

**Boudy P, (1950) :** Guide du forestier en Afrique du nord. Tome VI. Edition : La Maison Rustique, Paris. P 505, pp 274-278.

**Bourkhiss B ; Ouhssine M ; Hnach M ; bourkhiss M et Farah A Farah A, (2007) :** Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, 14000 Kénitra, BP 133, Maroc. *Bulletin de la Société de Pharmacologie. Bordeaux*.146, 75-84.

## Références Bibliographiques

---

**Bourkhiss M; Hnach M ; Paolini J ; Costa J et Chaouch A, (2009) :** Composition chimique des huiles essentielles de la sciure de bois et de feuilles de *Tetraclinis articulata*. Département de chimie, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail BP 4010 Béni M'hamed, 50000 Meknès, Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 78, pp. 281 – 289.

**Bourkhiss M; Hnach M ; Paolini J ; Costa J ; et Farah A, (2010) :** Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata* (vahl) masters du maroc. Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, BP 4010 Béni M'hamed, 50 000 Meknès, Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 79, p 141–154.

**Bourkhiss M; Hnach M ; Lakhlifi T ; Bouachrine M ; Farah A ; Satrani B ; Ouhssine M ; Chaouch A et Costa J, (2012) :** Fractionnement et valorisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. Département de chimie, faculté des sciences, université Moulay-Ismaïl, BP 4010 Beni-M'hamed, 50000 Meknes, Maroc.

**Bowles B.L et Sackaitey S.K, (1995) :** Inhibitory on flavor compounds on *Staphylococcus aureus*. *Journal of safety*. Vol 15, pp : 337-347.

**Brosse J, (2004) :** Larousse des arbres : Dictionnaire des arbres et des arbustes. Edition : LAROUSSE. Préface de Pelt J.M. P576, pp 478-479.

**Bruneton J, (1999):** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Paris : tec & doc. Lavoisier. p 1120, pp 1- 484.

**Buhagiar J ; Camilleri Podesta M. T ; Cioni P. L ; Flamini G et Morell I, (2000) :** Essential oil composition of different parts of *Tetraclinis articulata*, *J. Essent. Oil Res.*, 12: 29-32.

**Canillac N et Mourey A, (1996):** Comportement de *Listeria* en présence d'huiles essentielles de sapin et de pin. *Science aliment*. Vol: 16.

**Carlier V, (2005) :** Herbar medicinal. Edition : Minerva Genève Suisse. 215p.

## Références Bibliographiques

---

**Carrée P, (1953):** Précis de technologie et de chimie industrielle. Edition: Ballière J.B, 5<sup>ème</sup> édition. Vol: 3, 432p.

**Causse C, (2005) :** Les secrets de santé des antioxydants. Edition : Alpen. P 95, pp 44-45.

**Chazel L et Chazel M, (2013) :** Camargue : Un écosystème entre terre et eau. Edition : Quae, Collection : Guide pratique. P192, pp50.

**Chen C.N; Weng M.S; Wu C and Lin J.K, (2004):** Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanosoma cells. *Food Chemistry*. P 185, pp 175.

**Chung Y.C; Chang C.T; Chao W.W; Lin C.F and Chou S.T, (2002):** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extrat from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 2454-2458.

**Cox S.D ; Mann C.M ; and Markham J.L, (2001) :** Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal Appl Microbiol*. 91, 492-497.

**Davis P, (2006) :** Aromathérapie de A à Z. Edition : Vigot. Paris- France. P409, pp 197.

**Delille L, (2007) :** Plantes médicinales d'Algérie. Edition : BERTI. P 409, pp 5-11.

**Descheemaeker K et Provoost C, (1999):** L'impact de la nutrition sur santé. Developpement récents. P 169, pp 95.

**Di Carlo G; Mascolo N ; Izzo A. A et Capasso F, (1999):** Flavonids: old and new aspects of a class of naturel therapeutic drugs. Department of Experimental Pharmacology, University of Naples Federico II, Italy.

**Dobbertin M.K et Häne K, (2006) :** Les arbres en question, La Forêt, pp20.

**Dorman H.J.D et Deans S. G, (2000) :** Antimicrobial agent froms plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. Vol: 8, N°2, pp 308-316.

**Ernst E et Pittler M, (2005) :** Médecine alternatives : Le guide critique. Edition : Elsevier Masson, p 504, pp 48-149.

**Eymard S, (2003) :** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (*Trachurustrachurus*), choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des Procédés: Spécialité Biochimie. Nante. France.

**Farjo A, (2010) :** A handbook of the world's Conifers. Vol : 2. Edition : Brill. P1111, pp 986-987.

**Farjo A et Filer D, (2013) :** An atlas of the world's conifers: An analysis of their Distribution, biogeography, diversity and conservation status. Edition : Copyright. P 512, pp 168.

**Farns worth N.R; Akerele O; Bingel A.S; Soejarto D.D et Guo Z, (1986):** Place des plantes médicinales dans la thérapeutique». Bulletin de l'organisation mondiale de la santé, 64 (2), pp 159.

**Favier A, (2003) :** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. La 4<sup>ème</sup> actualité chimique. P115, pp108.

**Fernandez M, (2003) :** De quelques plantes dites médicinales et leurs fonctions. Edition : Aenigma. Pp: 09.

**Fintelmann V et Weiss R.F, (1998) :** Manuel pratique de phytothérapie. Edition : Vigot, Maloine. P 438, pp 2.

**Fintelman V et Weiss R.F, (2004) :** Manuel pratique de phytothérapie. Paris : vigot. p 438 pp235.

**Fleurette J ; Freney J et Reverdy M.E, (1995) :** Antisepsie et désinfection. Paris. ESKA. 639p.

**Foreman J, (1984) :** Mast cells and the actions of flavonoids. *Allergy Clin Immunol.* 73; 769-73.

**Formica J.V, (1995) :** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology.* 33, 1061-1080.

## Références Bibliographiques

---

**Fouché J ; Marquet A ; et Hambuckers A, (2000) :** Les plantes médicinales de la plante au médicament, Observation du monde des plantes.

**Frénot M et Vierling E, (2001) :** Biochimie des aliments : Diététique du sujet bien portant, 2<sup>ème</sup> édition, Science aliments. P 297, pp 97.

**Gahbiche S, (2009) :** La phytothérapie. 3ème Année Thalassothérapie. Section : hydrothermo-thalassothérapie. Ecole Supérieure des Sciences et Techniques de la Santé de Sousse. Pp 1-7.

**Gherib A, (1988) :** Travaux pratiques de chimie thérapeutique diagnose des médicaments. Office des Publication Universitaire. 105p.

**Gilly G, (1997) :** Les plantes à parfum et huiles essentielles à grasse, (botanique, culture, chimie, et production du marché). Edition Harmattan. P232, pp 11-19.

**Girre L, (1980) :** Connaître et reconnaître les plantes médicinales. Edition: Rennes ouest France, 333p.

**Grünwald J et Janick C, (2004):** Guide de la phytothérapie. Edition : Marabout, pp 24.

**Guerin-Faubleé V et Carret G, (1999):** L'antibiogramme : principe, méthodologie, intérêt et limites. *Proceedings des Journées Nationales GTV-INRA, Nantes*, p 5-13.

**Hachaïchi S, (2010) :** Directeur médical de Mag Pharm, «Une toxicité est possible». Quotidien Info Soir, Edition du 28 mars 2010.

**Haddad A ; Lachenal D ; Marechal A ; Kaid-Harche M et Janin G, (2006) :** Caractéristiques papetières de la pâte de bois de Thuya de Berbérie (Algérie) (*Tetraclinis articulata* Vahl) obtenue par un procédé soude-anthraquinone. Université de Tlemcen, Algérie. *Ann. For. Sci*, 63, 493-498.

**Hadjadj A.S ; Chouieb M. & Loisel R, (2009) :** Effet des facteurs environnementaux sur les premiers stades de la régénération naturelle de *Tetraclinis articulata* (Vahl, Master) en Oranie, *Ecologia mediterranea*, 35:19-31,

## Références Bibliographiques

---

**Hamdi Pacha Y ; Belkheiri A ; Benazzouz M ; Benhamza L et Bensegni L ; (2002) :** Evaluation de l'activité cicatrisante suite à des brûlures expérimentale de quelques plantes algériennes. *Rev. Méd. Pharm. Afr.* Vol. 16 : 1-8.

**Hammer K.A ; Carson C.F and Riley T.V, (2003) :** Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil, *Journal Appl Microbiol* ; 95, 853-860.

**Hans W.K, (2007) :** Dictionnaire 1000 Plantes aromatiques et médicinales, de A à Z propriétés et usages. Terre édition. Toulouse, Réalisation In texte édition. P 920, pp 6-7.

**Havsteen B.H, (2002):** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol.Therapeutics.* P 202, pp 67-96.

**Herzi N ; Camy S ; Bouajila J ; Destrac P ; Romdhane M et Condoret J.S, (2013) :**  
**(2014) :** Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 82. pp. 72-82.

**Hordé P, (2014) :** Spasme musculaire – Définition. Issu de Santé-Médecine. P1.

**Hubert J, (2006):** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude et voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries.

**Hulin V ; Mathot A. G ; Mafart P et Dufossé L, (1998) :** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, Vol. 18, pp 563-582.

**Inouye S ; Tsuruoka T ; Uchida K and Yamaguchi H, (2001) :** Effect of sealing and tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils, *Microbiol. Immunol*, 45, 201-208.

**Iserin P ; Masson M et Restellini J.P, (2001) :** Larousse encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparation, soins. Edition : Larousse, Paris. P 335, pp 6-10 et 212.

**Iserin P ; Masson M ; Restellini J.P ; Ybert E et Vican P, (2007) :** Larousse encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparation, soins. Edition : Larousse, Paris. P 375, pp 9-16.

**Julve P, (1998) :** Ecologie et chorologie de la flore en France. Baseflor. Index botanique. Version 23.

**Kanko C ; Sawaliho B ; Kone S ; Koukoua G ; N'guessan Y.T, (2004) :** Étude des propriétés physicochimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. Comptes rendus Chimie 7, 1039-1042.

**Karryev M.O, (1967) :** Comparative characteristics of the essential oils from Central Asian species of *Juniperus*. Izv. Acad. Nauk Turkm. SSR Ser. Biol. Nauk; 1: 40–43.

**Kassel D, 1996 :** Des hommes et des plantes ; Conservateur des Collections d'histoire de la pharmacie de l'Ordre national des pharmaciens. P 02.

**Keller-Didier C, (2004) :** Les plantes médicinales. Edition : ALS. pp57-64.

**Khan I; Kulkari M.V; Gopal M et Shahabuddin, (2005):** Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal chemistry Letters*, 15: 3584- 3587.

**Khiati M, (1998) :** Guide des maladies infectieuses et parasitaires. Office des Publications Universitaires (OPU), Alger. 255p.

**Lahouel M; Amadah S; Zellagui A; Touil A, Rhouati S; Benayache F; Leghouchi E and Bousseboua H, (2006):** The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effet and flavonoids concentration. P 355, pp 347.

**Lambinon J ; Delvosall L et Duvigneau J, (2004) :** Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines (Ptéridophytes et Spermatophytes). 5<sup>ème</sup> édition. Editions du Patrimoine du Jardin botanique national de Belgique. 1167 p.

**Lauranson J, (1989) :** Exploration de la diversité biochimique chez les conifères: Contribution à l'étude de l'hybridation *pinus uncinata* Ram. X *pinus Sylvestris* L. et à la croissance du complexe spécifique *pinus nigra* Am. Thèse d'état, université CLAUDE BERNARD, Lyon, pp 207.

**Loupe D, (2008) :** Ressources végétales de l'Afrique tropicale 7(1), Bois d'œuvre 1. Edition : PROTA. P785, pp 360-366.

**Macheix J.J ; Fleuriet A et Jay-Allemand C, (2005) :** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Edition : Presses polytechniques et universitaires Romandes. Lausanne, pp 192.

**Maire R, (1952) :** Flore de l'Afrique du Nord. Vol I. Edition : Le chevalier, Paris. 366 P.

**Mansouri A ; Embarek G ; Kokkalou E et Kefalas P, (2005) :** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89: 411-420.

**Marouf A et Reynaud J, (2007) :** La botanique de A à Z. Edition : Dunod, 352p.

**Martini M.G, (2011):** Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. 3<sup>ème</sup> édition : Lavoisier. P 500, pp316.

**Marc F ; Davin A ; Deglène-Benbrahim L ; Ferrand C ; Baccaunaud M et Fritsch P, (2004):** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecines Sciences*, 20, 458-464.

**Markham K.R, (1982) :** Techniques of flavonoid identification. Acknowledgements London: Academic Press.

**Meyer H.W et Manchester S.R, (1997) :** The Oligocene Bridge Creek flora of the John Day Formation. *The Geological Sciences*, 141:1-195.

**Mhirit O et Blerot P, (1999) :** Le grand livre de la forêt Marocaine. Edition : MARDAGA. P282, pp80-81.

**Mika A ; Minibayeva F ; Beckett R and Lûthje S, (2004):** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*: 3.P 193, pp 173.

**Milane H, (2004):** La quercétine et ses dérivés : Molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur (Strasbourg). PP 13.

- Moati R ; Fauron R et Donadieu Y, (1983) :** Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes. Edition : Maloine S.A, Paris, 5<sup>ème</sup> édition. 942p.
- Mota R; Thomas G and Barbosa Filho J.M, (1985):** Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of Ethnopharmacology*. P 300, pp 289.
- Mohammedi Z, (2006) :** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère en biologie. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105p.
- Molyneux P, (2004):** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. *Journal of Sciences and Technologies*. P 211, pp219.
- Mutai C ; Vagias C ; Abatis D et Roussis V, (2009) :** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*: 10.1016/j.jep.02.07.
- Naves Y.R, (1974) :** Technologie des parfums naturels. Edition: Masson. Paris. P 214, pp203.
- Njus D and Keller P.M, (1991):** Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. FEBS. Letters. P 284, pp 147-151.
- Ntihagowumwe E, (2005) :** Etude des propriétés pharmacologiques du séné algérien (esp : *Cassia acutifolia*) et sa micro propagation in-vitro. Mémoire d'ingénieur d'état .pp 23-25.
- Ojala T ; Rames S ; Haansu P ; Vuorela H ; Hiltunen R ; Haahtela K et Vuerela P, (2000) :** Antimicrobial activity of some coumarin containing hebal plants growing in finland. *Journal of Enthopharmacology*, 73: 299-305.
- Oktay, M ; Gülçin I et Küfrevio O.I, (2003) :** Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 36, 263–271.
- Ollier C, (2011) :** Conseils en phytothérapie. Edition: Pro-officina, Paris, 2<sup>ème</sup> édition, pp 1-47.
- OMS, (2003) :** Organisation Mondiale de la Santé de cinquante-sixième assemblée.

## Références Bibliographiques

---

**Oussalah M ; Caillet S ; Sancier L et Lacroix M, (2006) :** Antimicrobial effects of selected plants essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*. Vol 73, No. 2, pp : 236-244.

**Oyaizu M, (1986):** Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, Japanese. *Journal of Nutrition*. P 315, pp 307

**Paolini V ; Dorchies P et Hoste H, (2003) :** Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri*. P 97, pp17-19.

**Paris et Moyse H, (1965) :** précis de matières médicales, collection de précise pharmacie. Edition : Masson. P 253, pp 196.

**Paquereau J, (2013) :** Au jardin des plantes de la bible : Botanique, Symboles et Usages. Edition : CNPF. P347, pp 82.

**Pharmacopée Européenne, 2002, 3<sup>ème</sup> édition.** Paris. 1235p.

**Pharmacopée Européenne, 2005, 5<sup>ème</sup> édition.** Paris. 1170p.

**Pharmacopée Européenne, 2008, 6<sup>ème</sup> édition.** Paris. 3867 p.

**Pibiri M.C, (2005) :** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctoral. Polytechniques Fédérale de Lausanne. 161p.

**Pieri F., (1992) :** Pharmacologie et thérapeutique. Edition: Ellipses, Paris, 298 p.

**Pietta F ; Gardana C et Pietta A, (2003) :** Flavonoids in herbs in : flavonoids in health and disease. Edition: Marcel dekker, New York, pp 43-69.

**Pourrut B, (2008) :** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France.

**Pousset J.I, (1989) :** Plantes médicinales Africaines : Utilisation pratique. Edition : Ellipses. Paris. Coopération culturelle et technique. 156p.

## Références Bibliographiques

---

**Prescott L.M; Harley J et Klein D, (2003)** : Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition française : DE Boeck. P 1139, pp712.

**Quezel P et Gast M, (1998)** : Encyclopédie berbère « Genévrier », 20 ; *Gauda – Girrei*, Aix-en-Provence, Edisud, pp 3016-3023.

**Quezel P et Medail F, (2003)** : Ecologie et biogéographie de la forêt du bassin méditerranéen. Edition scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris. P 571, pp 28-125.

**Quezel P et Santa S, (1963)** : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Paris : Centre national de la recherche scientifique. p 1170, pp : 678.

**Rahal K ; Benslimani A ; Tali-Maamar H; Missoum M.F ; Kechih-Bounar S et Ammarti H, (2011)** : Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). Document édité avec la collaboration de l'OMS, 6<sup>ème</sup> Edition. 195 p.

**Ramdani M ; Lograda T ; Silini H ; Zeraib A ; Chalard P ; Figueredo G ; Bouchaala and Zerrar S, (2013)** : Antibacterial Activity of Essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 3 (11), pp. 22-28.

**Robert-Demuet S, (1995)** : Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes, Montréal-Canada.

**Roland A, (2002)** : La flore du pharmacien. Edition : Tec et Doc, pp 276.

**Salette J, (2014)** : Propos éclectique d'un agronome. Edition : L'Harmattan. P167, PP126.

**Salgarolo P, (2003)** : Pratique des manipulations de chimie à l'usage des biologistes. Tec et doc, Paris, pp 363.

**Sallé J.L, (1991)** : Les huiles essentielles. Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Edition: Frison-Roche. Paris, pp: 1-49.

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

## *Références Bibliographiques*

---

**Sebai M et Boudali M, (2012) :** La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire Professionnel Infirmier De La Santé Publique. Institut de formation paramédical CHETTIA, Alger. 71 p.

**Schauenberg P, (2005) :** Guide des plantes médicinales. Edition: Delachaux Niestlé, pp 08.

**Schauenberg P et Paris F, (1977) :** Guide des plantes médicinales. Paris : Delachaux et Niestlé. 1<sup>ème</sup> édition. P 500, pp 396.

**Schauenberg P et Paris F, 1997 :** Guide des plantes médicinales. Edition : Delachaux et Niestlé, Paris, 3<sup>ème</sup> édition, pp 08.

**Seingue A, (1985) :** la forêt circumméditerranéenne et ses problèmes. Éditions : Maisonneuve et Larose, deuxième version, Paris. P502, pp 215-221.

**Sibony J, (2004) :** Essaouira et sa marqueterie de thuya. Edition : IBIS-BRESS P78, pp70-71.

**Sofowora A, (2010) :** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition : Karthala, pp : 22-195.

**Sophie A et Ehrhart N, (2003) :** La phytothérapie : Se soigner par les plantes. Groupe Eyrolles. P 36, pp 25-30.

**Taguchi G ; Fujikawa S ; Yazawa T ; Kodaira R ; Hayashida N ; Shimosaka M et Okazaki M, (2000) :** Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2.4-D-treated tobacco cells. *Plant Science*, 151: 153-161.

**Tassin C, (2012) :** Paysages végétaux du domaine méditerranéen. Edition : IRD. Préface Yann Arthus-Bertrand. P1090, pp110.

**Tavric B, (1994):** Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin Biochem*. 27, 45-48.

**Tékaya-karoui A ; Ben Jannet H et Mighri Z, (2007) :** Essential Oil composition of Terminal Branches, Cones and Roots of *Tetraclinis articulata* from Tunisia. Pakistan. *Journal of Biological Sciences*, Vol. 10, n. 15, pp. 2495-2499.

**Thati B ; Noble A ; Rowan R ; Creaven S.B ; Walsh M ; Egan d et Kavanagh K, (2007) :** Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*, 21: 801-808.

**Ticli B, (1999):** Les herbes médicinales les plus puissantes et les plus efficaces. Edition De Vecchi. 95 p.

**Touitou Y, (2003) :** Pharmacologie. Edition : Masson. 229 p

**Tyagi A et Malik A, (2011) :** Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), pp: 228-235.

**Vekiari S.A; Protopapadakis E et Papadopoulou P, (2002):** Gas chromatography- Mass spectroscopy analysis of aromatic compounds of leaves and peel from healthy and viroid-infected Citron plants. Fifteenth IOCV Conférence, pp: 272-277.

**Wang S.Y; Shyur L.F; Kuo Y.H et Chang S.T, (2002):** Antioxydant activity of Abietane-type diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *Holzforschung*. 56(5).

**White F, (1986) :** La Végétation de L'Afrique, Mémoire accompagnant la carte de la Végétation de L'Afrique. Edition : Orstom-Unesco. P 384, pp 170-171.

**Winkle R, (2006) :** Se soigner par les plantes selon son signe astral. Edition : Alpen. P 125, pp 87.

**Zaika L, (1988):** Spices and Herbs-Their antimicrobial activity and its determination. *Journal of food safety*. 9: 97-118.

## **Annexe I:**

### **❖ Modes de Préparation des Plantes pour la Phytothérapie**

Selon **Sebai et Boudali, (2012)**, en phytothérapie, il y a plusieurs modes de préparation des plantes.

#### **1. L'Infusion**

On obtient une infusion, en plongeant une plante pendant une durée de 5 à 15 minutes (selon la plante) dans de l'eau bouillante dans un récipient couvert. Pour les fleurs, mettez-les dans le fond d'un pot, et versez l'eau bouillante dessus. Avant d'être utilisée l'infusion doit être passée (c'est-à-dire filtrée à travers un morceau de gaze par exemple) (**Sophie et Ehrhart, 2003**).

#### **2. La Décoction**

On obtient une décoction, en faisant bouillir de façon prolongée, et à feu doux, une plante (avec un couvercle sur la casserole). Il faut mettre la plante dans l'eau encore froide, puis la faire bouillir entre 2 à 15 minutes (sachant que les écorces et les racines doivent bouillir plus longtemps que les feuilles et les tiges). Passez ensuite la décoction, avant de l'utiliser (**Sebai et Boudali, 2012**).

#### **3. La Macération**

On obtient une macération, en laissant une plante dans un solvant (eau, vin, alcool ou huile) à froid pendant un temps assez long (de quelques heures à plusieurs jours, voire plusieurs semaines). La macération doit se faire dans un récipient à l'abri de l'air et de la lumière. Une fois le temps écoulé, il suffit de filtrer le mélange à travers un filtre papier, ou du coton hydrophile non tissé, et de stocker la macération obtenue dans un récipient bien bouché (**Sophie et Ehrhart, 2003**).

#### **4. Les Extraits**

Il existe différents types d'extraits. L'extrait fluide s'obtient en plongeant une plante dans une masse d'eau ou d'alcool égale à plusieurs fois la masse de plantes, puis en laissant s'évaporer jusqu'à ce que le poids du liquide soit égal à celui de la masse de plante initiale (Sophie et Ehrhart, 2003).

#### **5. L'Alcoolat et l'Alcoolature**

On obtient une alcoolature en plongeant une plante fraîche, pendant un temps assez long (généralement 8 jours), dans une masse d'alcool à 90 ou 95 ° égale à celle de la plante. Pour des plantes très absorbantes, qui ne s'humectent pas bien avec l'alcool, il faudra augmenter la proportion d'alcool à 3 parts d'alcool pour 2 de plantes, voire même pour certaines plantes 4 parts d'alcool pour 2 de plantes (soit deux fois plus d'alcool que de plantes). Faites attention dans ce cas à modifier la posologie en conséquence. Le mélange doit être remué de temps en temps, puis passé et filtré. L'alcoolature doit ensuite être stockée dans un flacon hermétique. Sachez que l'alcoolature se conserve peu de temps, et que 50 gouttes d'alcoolature correspondent à peu près à 1 g (Sallé, 1991).

#### **6. La Teinture Alcoolique ou Alcoolé**

On obtient une teinture alcoolique en faisant macérer dans l'alcool à 60° une plante, à raison de 5 parts d'alcool pour une part de plante (Sebai et Boudali, 2012).

#### **7. La Teinture**

On obtient la teinture en laissant macérer des plantes dans de l'eau, de l'alcool à 60° ou de l'éther (Moati et al., 1983).

#### **8. L'Huile et l'Huile Essentielle**

On obtient l'huile en laissant macérer à température douce (voire tiède) pendant 3 semaines, la moitié d'un bocal rempli de plantes fraîches ou sèches ou de racines broyées, dans de l'huile remplissant le reste du bocal. Remuez de temps en temps le mélange, puis décantez le tout, et mettez l'huile dans un flacon (Sophie et Ehrhart, 2003).

On obtient l'huile essentielle par distillation à la vapeur. Pour cela il faut un ballon, un alambic, et un récipient pour recueillir le distillat. Les plantes doivent être fraîches et propres, et coupées en petits morceaux, ou grossièrement broyées. Placez les dans le ballon avec une bonne quantité d'eau de source filtrée (généralement deux à trois fois le poids de plante) **(Sophie et Ehrhart, 2003)**.

Le mélange dans le ballon doit être portée à ébullition, la vapeur entraîne avec elle le principe actif volatile de la plante, elle se condense dans le serpentín de l'alambic, et s'écoule dans le récipient à la sortie. Généralement la densité de l'eau et celle du principe actif sont différentes, ce qui permet de les séparer facilement ensuite dans une ampoule à décanter, ou un vase à décantation (généralement l'essence surnage au dessus de l'eau, sauf pour l'huile d'amande douce) **(Sebai et Boudali, 2012)**.

## **9. Le Sirop**

On obtient du sirop simple en dissolvant à froid ou à chaud 180 g de sucre dans 100 g d'eau. On peut ensuite y ajouter des principes actifs selon les besoins **(Carlier, 2005)**.

## **10. Le Cataplasme**

Le cataplasme s'obtient en broyant la plante fraîche, et en l'appliquant ensuite sur la zone à traiter. Afin d'éviter que le cataplasme n'adhère (entre autres sur une plaie), il vaut mieux appliquer celui-ci à travers un morceau de gaze. Les plantes doivent être parfaitement propres avant d'être broyées, et doivent même être trempées dans une solution antiseptique neutre si elles doivent être appliquées sur une plaie, et qu'elles ne sont pas elles mêmes antiseptiques. On peut aussi faire des cataplasmes chauds, en utilisant des plantes cuites. Dans ce cas faire attention de ne poser le cataplasme qu'une fois qu'il a atteint une température acceptable (afin d'éviter de brûler la personne). Une fois posé, le cataplasme doit être recouvert d'un linge, ou d'une bande si nécessaire **(Sebai et Boudali, 2012)**.

## **11. La Poudre**

La poudre s'obtient en pulvérisant une plante, soit au moulin à café, soit au mortier et au pilon, avec du gros sucre en guise de meule (attention de retirer la masse de sucre pour le calcul des doses). Vous pouvez faciliter la pulvérisation en passant la plante au four à feu très doux pendant quelques instants **(Carlier, 2005)**.

**Tableau I :** Composition chimique de certaines essences de *T. articulata* étudiées ultérieurement

Auteurs et année de publication	Plante étudiée	Pays	Organes analysés	Méthodes d'extraction	Rendement (%)	Méthodes d'analyse	Composés majoritaires
<b>Bourkhis et al., 2007</b>	<i>Tetraclinis articulata</i>	Maroc	Rameaux sèches	Clevenger	0,41	CG/MS	Acétate de bornyl (30,74%) $\alpha$ -Pinène (23,54%) Limonène (23,31%) camphre (17,27 %)
<b>Tékaya-Karaoui et al., 2007</b>	<i>Tetraclinis articulata</i>	Tunisie	cônes	Clevenger	0,22	CPG et CG/MS	Camphrene (43,2%), Z-murolène (29%) Z- $\beta$ -ocimène (11,7%) Naphtalène (6,6%)
<b>Bourkhis et al., 2009, 2010 et 2012</b>	<i>Tetraclinis articulata</i>	Maroc	Sciure de bois et feuilles séchées	Clevenger	1,63	CPG et CG/MS	$\alpha$ -acorénol (20,9%) Camphre (18,6%) Cédrol (17,9%) Totarol (8,8%) $\alpha$ -cédrene (8,7%) $\beta$ -acorénol (7,4%)
<b>Abi-Ayad et al., 2011</b>	<i>Tetraclinis articulata</i>	Tlemcen (Algérie)	Feuilles	Clevenger	0,33	CPG et CG/MS	Acétate de bornyl (52%) Caryophyllène (7,5%) Germacrene-D (5,6%) Oxyde de caryophyllène (5,01%)

## ❖ Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

### 1. Aromatogramme

Aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disque ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposer à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, Plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'H.E. sur le germe testé (**Guerin-Faublée et Carret, 1999**).

### 2. Méthode de diffusion en puits

Méthode proposée par **Cooper et Woodman en 1946** et reprise par **Shroeder et Messing en 1949**. Elle assure une diffusion radiale de l'H.E ou l'extrait à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'H.E. ou l'extrait de concentration connue. L'H.E. ou l'extrait diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (**Eymard, 2003**).

### 3. Méthode de dilution

Les l'H.E ou les extraits à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**Robert-Demuet, 1995**).

#### **4. Méthode de micro-atmosphère**

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes, à tester dans les boîtes de Pétri sur milieu de culture approprié. La seule différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside principalement dans la position du disque imprégné de l'H.E qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation de l'H.E sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés **(Pibiri, 2005 ; Tyagi et Malik, 2011)**.

## **Annexe II:**

### **❖ Matériel non biologique**

#### **I. Appareillage:**

- Agitateur magnétique.
- Agitateur Vortex.
- Bain marie.
- Balance de précision.
- Balance pour peser les animaux.
- Centrifugeuse.
- Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse « CG-SM ».
- Hotte.
- Etuve.
- Incubateur à 25°C.
- Incubateur à 37°C.
- Mixeur.
- pH mètre.
- Plaque chauffante.
- Spectrophotomètre.

#### **II. Verrerie et accessoires :**

- Ampoule à décanter.
- Ballons.
- Bec bunsen.
- Bêchers.
- Boites de pétrie.
- Burettes.
- Disque en papier.
- Entonnoirs.
- Erlen Mayer.
- Fioles.
- Gants.

- La gaze
- Micropipettes.
- Milieux de culture.
- Papiers filtres.
- Pince de laboratoire.
- Pipettes.
- Sondes de gavage.
- Seringue de 1ml.
- Spatule.

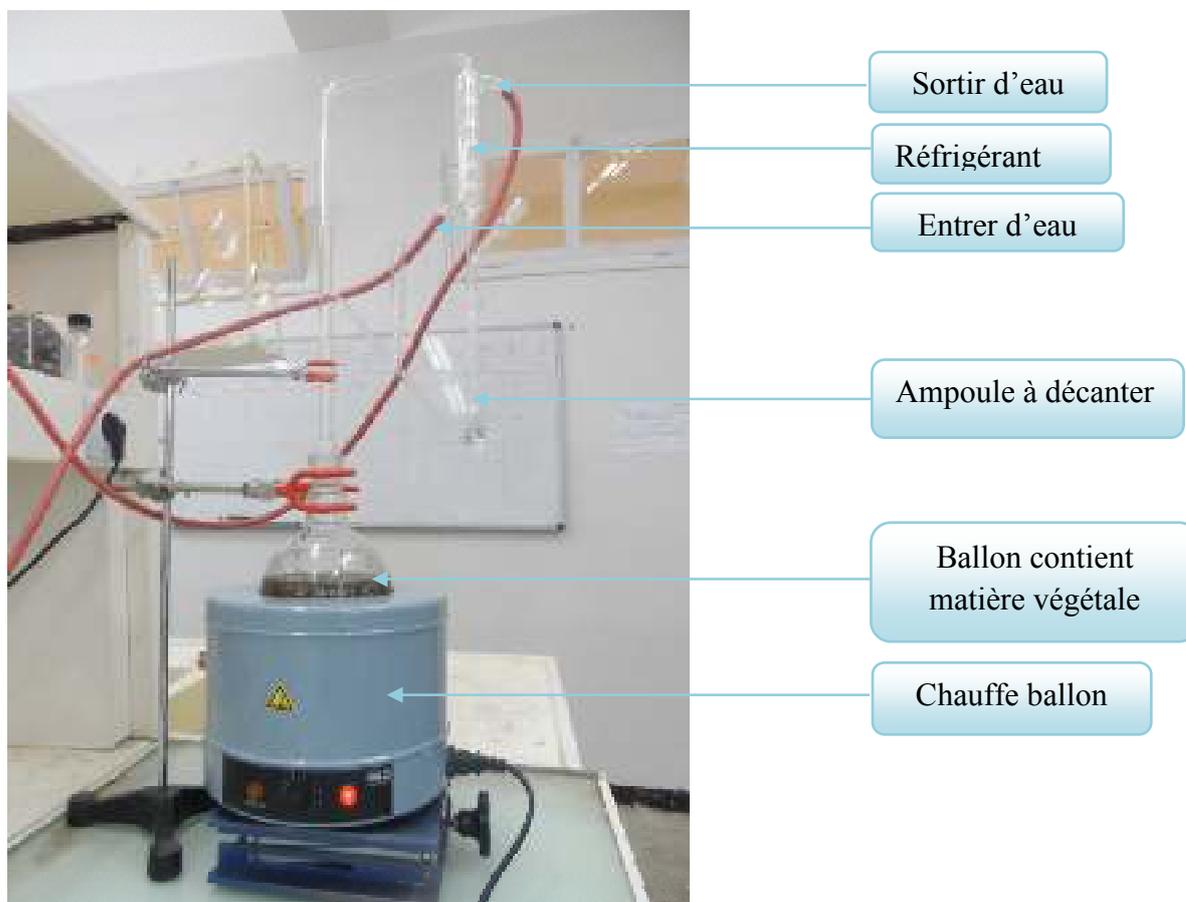
### **III. Réactifs et produits chimiques :**

- Acétate de plomb.
- Acétate de sodium.
- Acétate d'éthyle.
- Acide ascorbique.
- Acide chlorhydrique (HCl).
- Acide sulfurique
- Acide trichloroacétique.
- Alcool chlorhydrique.
- Alcool isoamylique.
- Ammoniaque.
- Butanol.
- Chloroforme.
- Chlorure de fer.
- DPPH.
- Eau distillée H<sub>2</sub>O.
- Eau physiologique (Na Cl à 0.9%).
- Ethanol à 95°.
- Ether diéthylique.
- Ferricyanure de potassium.
- Hydroxyde de potassium (KOH).
- Magnésium (Mg<sup>+2</sup>)
- Méthanol.

- Phénophtaléine.
- Phosphate.
- Propanol.
- Sulfate de sodium.
- **Réactif de Drangendorff:** ce réactif est composé de:
  - 0.85g de Bismuth.
  - 8g d'iodure de potassium.
  - 10ml d'acide acétique glacial.
  - Complétez avec 70ml d'eau distillé.
- **Réactif de Sítiasny:** 40ml de formol à 40% et 5ml d'acide chlorhydrique concentré.
- **Réactif Valsér-Mayer:** 0.36g d'iodure de potassium (KI), 0.1355g de chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$ ) et environ 1ml d'eau distillée, agitez jusqu'à dissolution à l'aide d'un agitateur Vortex et complétez le volume à 10ml d'eau distillée.

## ❖ Méthodes

- **Extraction de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata***



**Figure 9 :** Montage d'hydrodistillation (Clevenger).

## Annexe III:

## ❖ Résultats et Discussion

## ➤ Résultats de l'étude phytochimique

Tableau V : Teneur en eau de *T. articulata*

		<b>M<sub>1</sub> : Masse d'échantillon frais (g)</b>	<b>M<sub>2</sub> : Masse d'échantillon après séchage (g)</b>	<b>Teneur en eau (%)</b>
<b>Feuilles</b>	<b>1<sup>er</sup> Essai</b>	10,03	3,47	65,403
	<b>2<sup>ème</sup> Essai</b>	10,03	3,49	65,204
	<b>3<sup>ème</sup> Essai</b>	10,05	3,48	65,422
	<b>Moyenne ± Ecart-type</b>	10,037±0,011	3,48 ±0,01	65,343±0,12
<b>Cônes</b>	<b>1<sup>er</sup> Essai</b>	10,10	3.312	67,207
	<b>2<sup>ème</sup> Essai</b>	10,17	3.251	68,033
	<b>3<sup>ème</sup> Essai</b>	10,25	3,245	68,341
	<b>Moyenne ± Ecart-type</b>	10,173±0,075	3,269±0,01	67,860±0,586



**Figure 17 :** Test de l'identification colorimétrique de quelques métabolites secondaires de *T. articulata*

➤ **Les étalons utilisés pour identification des pics de l'analyse par HPLC**

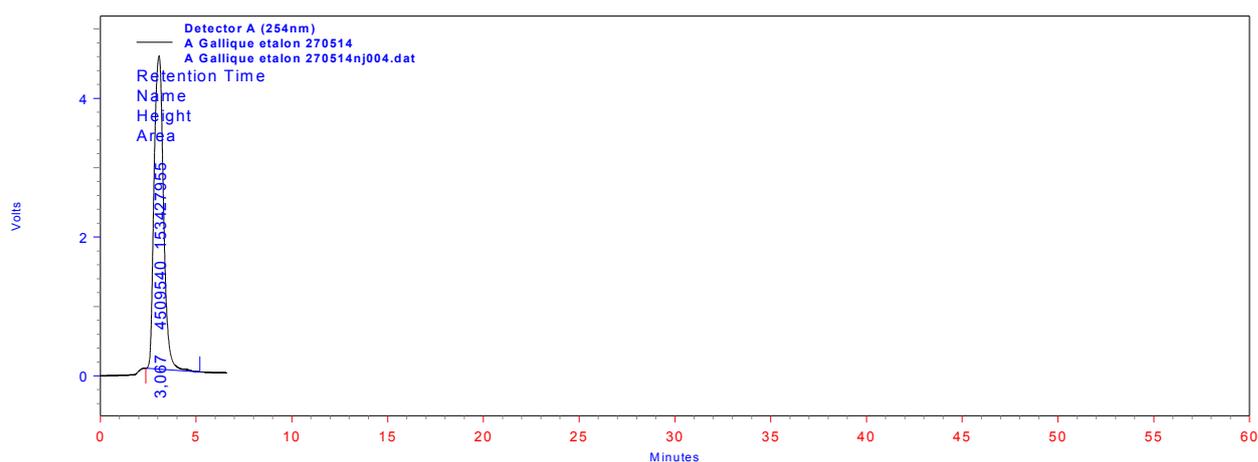
**Produit analysé :** A Gallique étalon 270514

**Conditions d'analyse :** Colonne C18

Débit 1 ml/mn

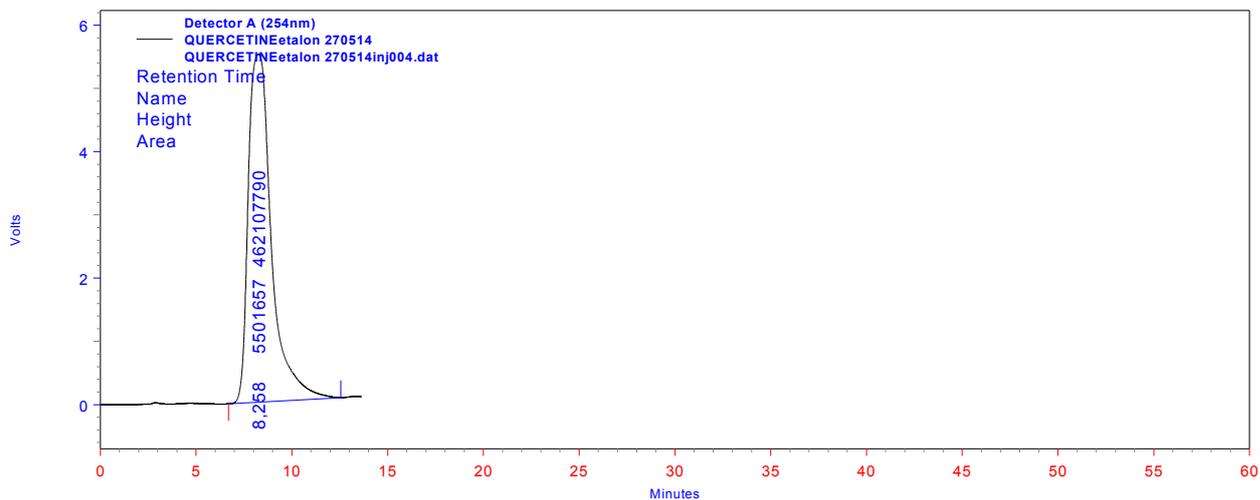
Température 25° C

Volume d'injection 20 µl.



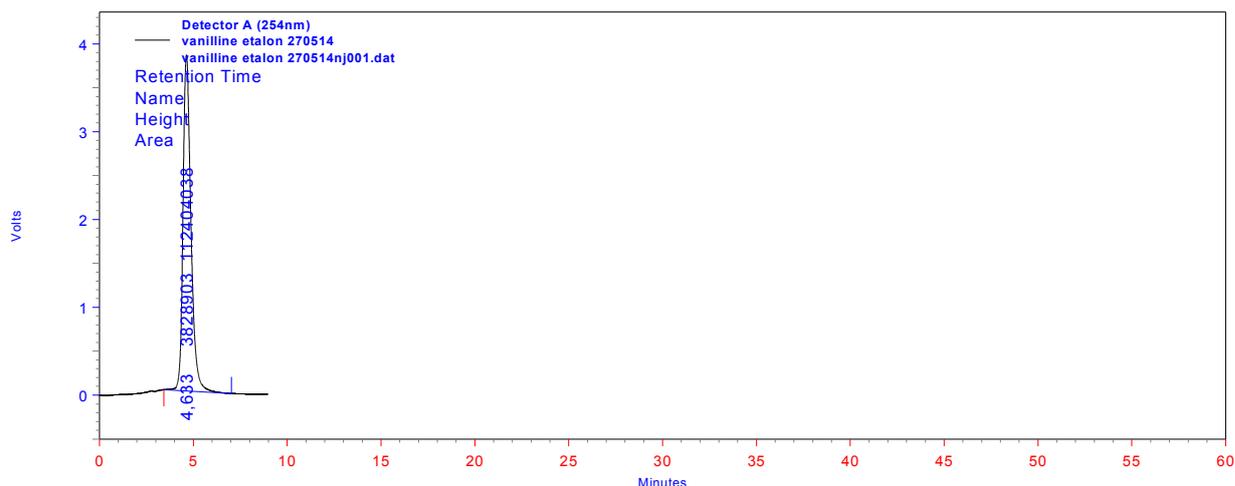
Pics	Temps de rétention (min)	Surface	Pourcentage (%)
1	3,067	153427955	100,00
<b>Totale</b>		153427955	100,00

**Produit analysé :** Etalon Quercétine  
**Conditions d'analyse :** Colonne C18  
Débit 1 ml/mn  
Température 25° C  
Volume d'injection 20 µl



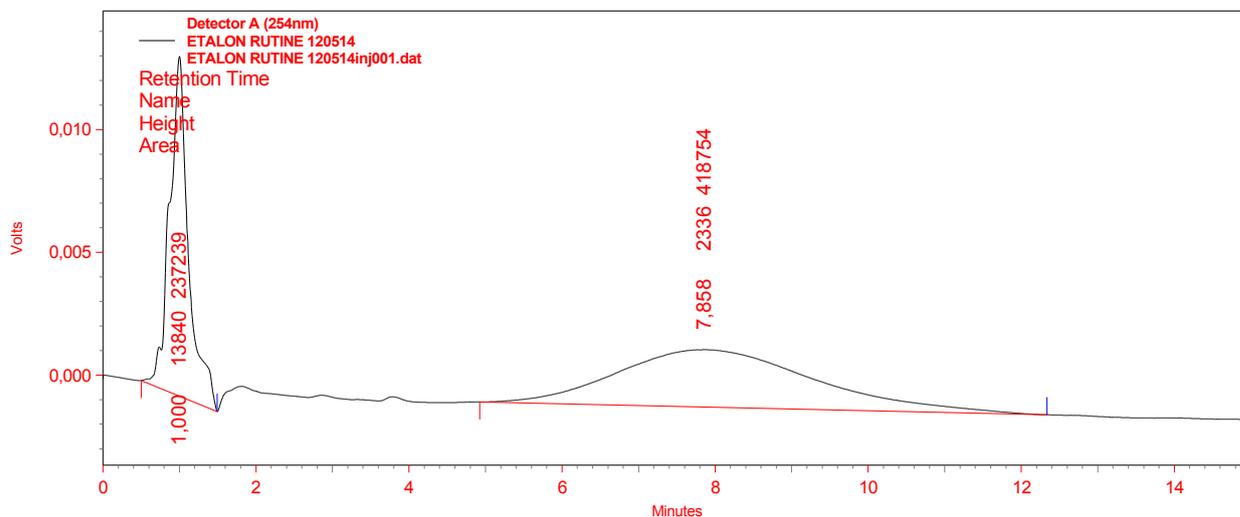
Pics	Temps de rétention (min)	Surface	Pourcentage (%)
1	8,258	462107790	100,00
<b>Totale</b>		462107790	100,00

**Produit analysé :** vanilline étalon 270514  
**Conditions d'analyse :** Colonne C18  
Débit 1 ml/mn  
Température 25° C  
Volume d'injection 20 µl.



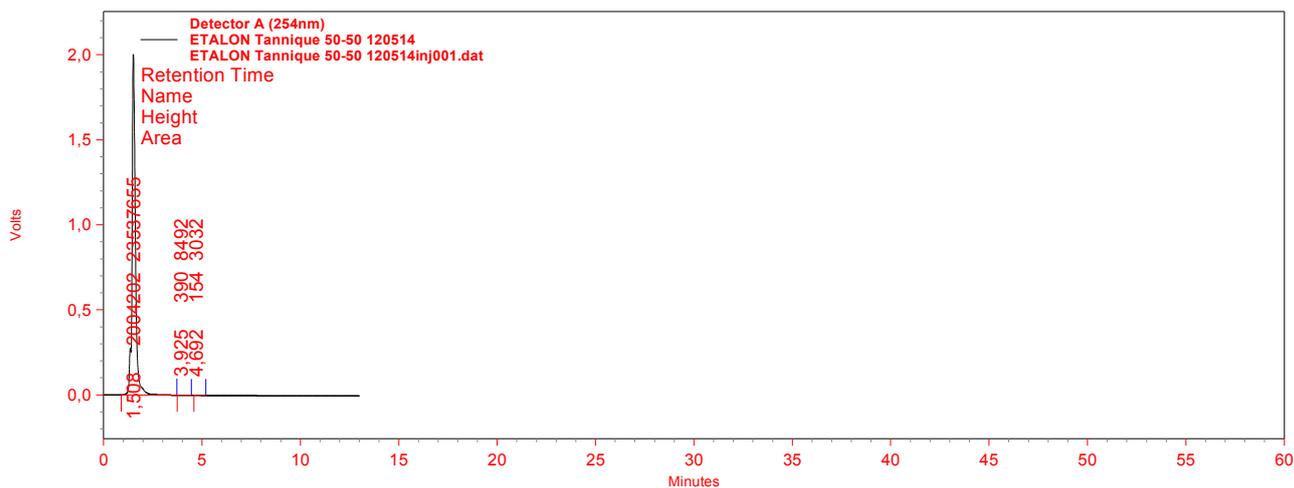
Pics	Temps de rétention (min)	Surface	Pourcentage (%)
1	4,633	112404038	100,00
<b>Totale</b>		112404038	100,00

**Produit analysé :** Etalon Rutine  
**Conditions d'analyse :** Colonne C18  
 Débit 1 ml/mn  
 Température 25° C  
 Volume d'injection 20 µl.



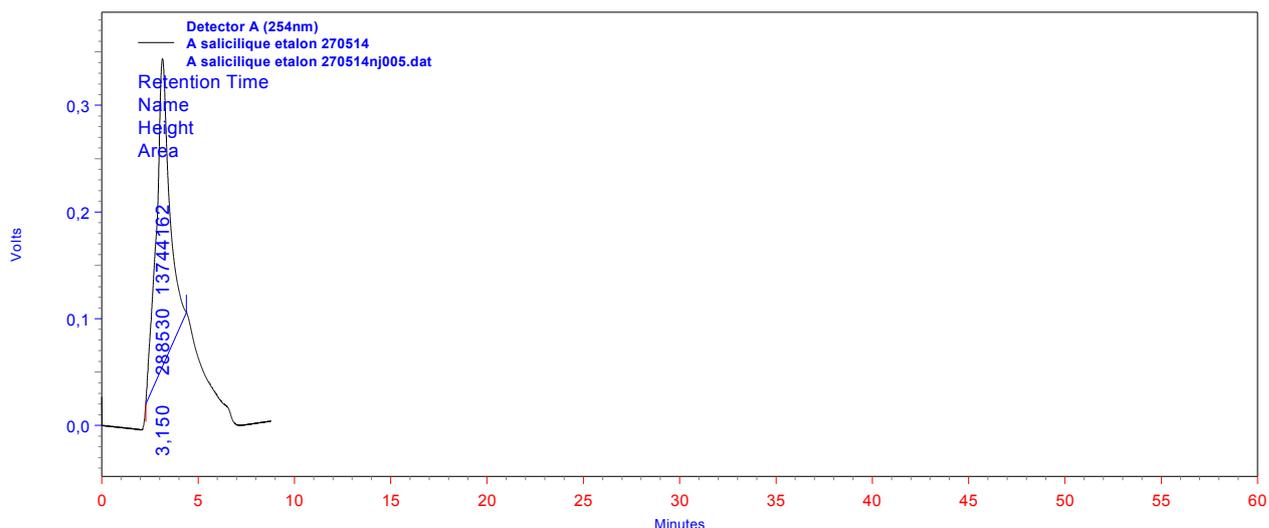
Pics	Temps de rétention (min)	Surface	Pourcentage (%)
1	1,00	237239	36,16
2	7,858	418754	63,84
<b>Totale</b>		655993	100,00

**Produit analysé :** Etalon Tannique  
**Conditions d'analyse :** Colonne C18  
 Débit 1 ml/mn  
 Température 25° C  
 Volume d'injection 20 µl.



Pics	Temps de rétention (min)	Surface	Pourcentage (%)
1	1,508	23537655	99,95
2	3,925	8492	0,04
3	4,692	3032	0,01
<b>Totale</b>		23549179	100,00

**Produit analysé :** Etalon Acide salicylique  
**Conditions d'analyse :** Colonne C18  
 Débit 1 ml/mn  
 Température 25° C  
 Volume d'injection 20 µl.



Pics	Temps de rétention (min)	Surface	Pourcentage (%)
1	3,150	13744162	100,00
<b>Totale</b>		13744162	100,00

### ➤ Résultats de l'extraction de l'huile essentielle

Tableau VIII : Rendement en huile essentielle du *T. articulata*

		M <sub>H.E</sub> : Masse de l'H.E (g)	M <sub>M.V</sub> : Masse de la matière végétale (g)	Rendement (%)
<b>Feuilles</b>	1 <sup>er</sup> Essai	100	0,191	0,191
	2 <sup>ème</sup> Essai	100,08	0,212	0,211
	3 <sup>ème</sup> Essai	100,05	0,2	0,199
	<b>Moyenne ± Ecart-type</b>	100,04 ±0,040	0,201±0,010	0,201±0,010
<b>Cônes</b>	1 <sup>er</sup> Essai	100,06	0,309	0,308
	2 <sup>ème</sup> Essai	100,02	0,299	0,298
	3 <sup>ème</sup> Essai	100,03	0,295	0,294
	<b>Moyenne ± Ecart-type</b>	100,03±0,020	0,301±0,007	0,3009±0,007



**Figure 19:** Huile essentielle de *T. articulata* (A : L'H.E des feuilles, B : L'H.E des cônes) (Originale, 2014).

➤ **Résultats de l'activité antioxydante**



**Figure 24 :** Tubes contenant des réactions d'activité antioxydante par la méthode de FRAP



**Figure 26 :** Solution de DPPH



**Figure 27 :** Tubes contenant des réactions d'activité antioxydante par la méthode de DPPH (A : avant d'ajouter la solution de DPPH, B : après d'ajouter la solution de DPPH)

Tableau XIII : Méthode de FRAP de *T. articulata*

Concentration (mg/ml)		0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
DO	Acide. Ascorbique	0	0,099	0,218	0,423	0,632	0,798	1,008
	Infusé	0	0,0798	0,123	0,245	0,478	0,678	0,957

Tableau XIV : Méthode de DPPH de *T. articulata*

Concentration (mg/ml)		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Vit C	DO	0,544	0,501	0,446	0,391	0,336	0,282	0,227	0,172	0,117	0,062
	% d'I	12,8	19,6	28,4	37,2	46	54,8	63,6	72,4	81,2	90
H.E des Feuilles	DO	0,525	0,470	0,415	0,360	0,305	0,250	0,195	0,141	0,086	0,031
	% d'I	15,8	24,6	33,4	42,2	51	59,8	68,6	77,4	86,2	95,03
H.E des cônes	DO	0,569	0,539	0,509	0,454	0,399	0,344	0,289	0,222	0,179	0,124
	% d'I	8,8	13,6	18,4	27,2	36	44,8	53,6	64,4	71,2	78,12
L'infusée	DO	0,537	0,434	0,379	0,324	0,269	0,214	0,159	0,159	0,104	0,049
	% d'I	13,8	21,6	30,4	39,2	48	56,8	65,6	74,4	83,2	92,14

## ➤ Résultats de l'activité anti-inflammatoire

Tableau XV : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot témoin (l'eau distillée)

Souris	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Moyenne
Poids des pattes droites (g)	0,144	0,155	0,162	0,146	0,158	0,153
Poids des pattes gauches (g)	0,185	0,193	0,220	0,179	0,200	0,195
Pourcentage d'œdème (%)	27,45					
Pourcentage réduction de l'œdème (%)	0					

**Tableau XVI** : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot produit de Référence

<b>Souris</b>	<b>Souris 1</b>	<b>Souris 2</b>	<b>Souris 3</b>	<b>Souris 4</b>	<b>Souris 5</b>	<b>Moyenne</b>
<b>Poids des pattes droites (g)</b>	0,130	0,151	0,138	0,158	0,143	0,144
<b>Poids des pattes gauches (g)</b>	0,151	0,170	0,158	0,176	0,163	0,163
<b>Pourcentage d'œdème (%)</b>	13,20					
<b>Pourcentage réduction de l'œdème (%)</b>	51,91					

**Tableau XVII** : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot de l'infusé (50mg/ml)

<b>Souris</b>	<b>Souris 1</b>	<b>Souris 2</b>	<b>Souris 3</b>	<b>Souris 4</b>	<b>Souris 5</b>	<b>Moyenne</b>
<b>Poids des pattes droites (g)</b>	0,140	0,138	0,152	0,143	0,130	0,140
<b>Poids des pattes gauches (g)</b>	0,162	0,159	0,172	0,164	0,153	0,162
<b>Pourcentage d'œdème (%)</b>	15,71					
<b>Pourcentage réduction de l'œdème (%)</b>	42,77					

**Tableau XVIII** : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot de l'infusé (100mg/ml)

Souris	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Moyenne
<b>Poids des pattes droites (g)</b>	0,136	0,146	0,132	0,150	0,139	0,140
<b>Poids des pattes gauches (g)</b>	0,152	0,158	0,147	0,166	0,154	0,155
<b>Pourcentage d'œdème (%)</b>	09,93					
<b>Pourcentage réduction de l'œdème (%)</b>	63,82					

➤ **Résultats de l'activité antispasmodique**

**Tableau XIX**: Nombre de spasmes et le pourcentage de réduction du nombre de spasmes

Nombre de lot	Extraits utilisés	Moyenne des nombre de spasmes	pourcentage de protection (%)
I	Eau distillée	24,2	-
II	Produit de référence (Spasmodyl 80mg)	4	83,47
III	Infusé à 50mg/ml	9	62,81
IV	Infusé à 100mg/ml	5,6	76,86

**Annexe IV:**

**Appareillage:**



**H.P.L.C**



**Appareil de CG-MS**



**Spectrophotomètre**



**Centrifugeuse**



**Etuve**



**P.S.M**

# *Introduction*

# Chapitre I :

## Partie Bibliographique

Chapitre II:

Matériel Et Méthodes

Chapitre II:

Résultats Et Discussion

*Conclusion*

*Références*

*Bibliographiques*

# Annexes