

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abbes Laghrou Khenchela



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Option : Biochimie appliquée

**Thème :**

**Etude des activités biologiques de la plante  
médicinale «*Tetraclinis articulata*»**

Présenté par

**Ayeb Nour Elhouda et Allalouche Meryem**

**Jury de soutenance**

**Président:** M<sup>me</sup> Djemil R.

MCB. Univ. Abbès Laghrou - Khenchela-

**Rapporteur:** M<sup>me</sup> Kara Ali W.

MCB Univ. Abbès Laghrou - Khenchela-

**Examinatrice:** M<sup>me</sup> Boutarfa S.

MAA. Univ. Abbès Laghrou -Khenchela-

**Année universitaire : 2018 – 2019**

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abbes Laghrou Khenchela



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Option : Biochimie appliquée

**Thème :**

**Etude des activités biologiques de la plante  
médicinale «*Tetraclinis articulata*»**

Présenté par

**Ayeb Nour Elhouda et Allalouche Meryem**

**Jury de soutenance**

**Président:** M<sup>me</sup> Djemil R.

MCB. Univ. Abbès Laghrou - Khenchela-

**Rapporteur:** M<sup>me</sup> Kara Ali W.

MCB Univ. Abbès Laghrou - Khenchela-

**Examinatrice:** M<sup>me</sup> Boutarfa S.

MAA. Univ. Abbès Laghrou -Khenchela-

**Année universitaire : 2018 – 2019**

# Remerciements

*En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail ;*

*Nous tenons à remercier :*

- *Mme BOUTAREFA S. pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury.*
- *Mme DJEMIL R. qui a accepté d'examiner notre travail.*
- *Mme KARAALI W. d'avoir accepté de nous encadrer, ça sera pas suffisant pour l'exprimer toute notre reconnaissance pour la confiance et le grand soutien, pour le temps qu'elle nous a consacré toute les fois que cela était nécessaire, pour ses conseils précieux qu'elle nous a prodigués tout le long de notre travail, et pour son aide.*
- *Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.*
- *Enfin nos remerciements sont dressés plus particulièrement à nos familles et nos amies qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.*

*Nour et Meryem*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

*Ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et que je suis très fière de les avoir comme parent et que tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte ma mère Fafa et mon père Arbi et pour leurs soutiens et leurs sacrifices énormes. Je vous aime papa et maman.*

*Mes très chères sœurs Hana, Imen, Nesrine et mes chers frères Yazid et Khalil, qui m'ont soutenu, aidé et qui ont été toujours présents dans les moments difficiles. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de réussites.*

*A mon frère et mes sœurs que ma mère ne m'a pas données ; à Daradji et Sabah, merci pour vos aides, vos encouragements et vos précieux conseils. Que le dieu les protège et les garde en bonne santé.*

*A ma plus belle cousine que je la considère comme sœur aussi Sihem et ses enfants : Jallou, Moumen, Hamza et Hidaya*

*A Ceux que j'ai partagés les meilleurs moments de ma vie, vous mes chères amies : Selma, Jiji, Chahra, Assia, Mouna, Meriem, Romaiassa, Amina et Imen . Que ce travail soit le témoignage d'une amitié sincère*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.  
Tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

***Nour***



## *DEDICACES*

*Je dédie ce travail à mes chers parents pour leur soutien.*

*Mes chaleureux dédicaces sont aussi destinés à :*

*Mes frères et ma sœur.*

*Ma tante Malika et sa famille.*

*Ma binôme Nour Sakura et mes camarade Amina et Romy*

*avec qui j'ai passé des moments inoubliables.*

*Tous mes amis de la classe de Biochimie Appliqué.*

*A tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail.*

*Meryem. A*

## Table des matières

**Remerciement**

**Dédicaces**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction** ..... 1

### **Chapitre I. Revus bibliographique**

|   |    |
|---|----|
| <b>I. La plante « <i>Tetraclinis Articulata</i> »</b> .....                   | 3  |
| I.1. Caractéristiques botaniques de la plante.....                            | 3  |
| I.2. Différentes appellations attribuées à la plante.....                     | 4  |
| I.3. Classification de « <i>Tetraclinis Articulata</i> ».....                 | 4  |
| I.4. Répartition géographique de la plante.....                               | 5  |
| I.5. Composition chimique de la plante « <i>Tetraclinis Articulata</i> »..... | 6  |
| I.6. Différentes applications de « <i>Tetraclinis Articulata</i> ».....       | 7  |
| I.6.1. Application dans la médecine traditionnelle.....                       | 7  |
| I.6.2. Autres applications.....   | 8  |
| <b>II. Métabolites secondaires</b> .....                                      | 8  |
| II.1. Activités biologiques des métabolites secondaires.....                  | 9  |
| <b>III. Polyphénols</b> .....   | 10 |
| III.1. Définition.....  | 10 |
| III.2. Classification et structures.....                                      | 11 |
| III.2.1. Phénol et acides phénoliques.....                                    | 12 |
| III.2.2. Flavonoïdes.....   | 13 |
| III.2.3. Tannins.....   | 17 |
| III.2.3.1. Tannins hydrolysables.....   | 18 |
| III.2.3.2. Tannins condensés.....   | 18 |
| III.2.4. Coumarines.....  | 19 |
| III.3. Activités biologiques des polyphénols.....                             | 20 |
| <b>IV. Activités biologiques étudiées</b> .....                               | 21 |
| IV.1. Activité antioxydante.....  | 21 |
| IV.1.1. Stress oxydant.....   | 21 |

|   |           |
|---|-----------|
| IV.1.1.1. Radicaux libres.....                                  | 22        |
| IV.1.1.1.1. Espèces réactives de l’oxygène.....                 | 22        |
| IV.1.1.1.2. Sources des espèces réactives de l’oxygène.....     | 23        |
| IV.1.1.2. Cibles des radicaux libres.....                       | 24        |
| IV.1.2. Pathologies liées au stress oxydant.....                | 25        |
| IV.1.3. Antioxydants.....                                       | 25        |
| IV.1.3.1. Définition d’un antioxydant.....                      | 25        |
| IV.1.3.2. Principaux antioxydants.....                          | 25        |
| IV.2. Activité antibactérienne.....                             | 28        |
| IV.2.1. Agents antibactériens.....                              | 28        |
| IV.2.1.1. Agents antibactériens naturels.....                   | 29        |
| IV.2.1.2. Antibiotique.....                                     | 30        |
| IV.2.2. Résistance des bactéries aux antibiotiques.....         | 30        |
| IV.2.3. Synergie.....   | 31        |
| IV.3. Activité anti hémolytique.....                            | 32        |
| IV.3.1. Généralité sur l’hémolyse.....                          | 32        |
| IV.3.2. Type des hémolyses.....                                 | 32        |
| IV.3.3. Signes de l’hémolyse.....                               | 33        |
| IV.3.3.1. Signes cliniques.....                                 | 33        |
| IV.3.3.2. Signes biologiques.....                               | 33        |
| IV.4. Traitement de l’hémolyse.....                             | 33        |
| IV.4. Activité anticoagulante.....                              | 34        |
| IV.4.1. Généralité sur la coagulation.....                      | 34        |
| IV.4.2. Mécanismes de la coagulation.....                       | 34        |
| IV.4.2.1. Formation de la prothrombinase.....                   | 34        |
| IV.4.2.2. Formation de la thrombine.....                        | 35        |
| IV.4.2.3. Formation de la fibrine.....                          | 35        |
| IV.4.3. Maladie de l’excès de la coagulation « thrombose »..... | 35        |
| IV.4.3.1. Thrombose artérielle.....                             | 36        |
| IV.4.3.2. Thrombose veineuses.....                              | 36        |
| IV.4.3.3. Traitement des thromboses.....                        | 36        |
| <b>Chapitre II. Matériel et méthodes</b>                        | <b>38</b> |
| <b>I. Matériels.....</b>  | <b>38</b> |

|  |    |
|--|----|
| I.1. Matériel biologique .....   | 38 |
| I.1.1. Matériel végétal.....   | 38 |
| I.1.2. Souches bactériennes.....   | 38 |
| I.1.3. Echantillons du sang.....   | 38 |
| I.2. Médicaments.....  | 38 |
| I.3. Réactifs chimiques et instrumentations.....                             | 39 |
| <b>II. Méthodes</b> .....  | 39 |
| II.1. Préparation de l'extrait végétal.....                                  | 39 |
| II.2. Etude qualitative.....   | 41 |
| II.2.1. Screening phytochimique.....   | 41 |
| II.2.2. Séparation chromatographique sur couche mince (CCM).....             | 42 |
| II.2.2.1. Principe.....  | 42 |
| II.2.2.2. Protocole de CCM sur gel de silice.....                            | 42 |
| II.2.2.3. Révélation.....  | 43 |
| II.3. Etude quantitative.....  | 43 |
| II.3.1. Dosage des flavonoïdes.....  | 43 |
| II.3.2. Dosage des flavonols.....  | 44 |
| II.3.3. Dosage des proanthocyanidines.....                                   | 44 |
| II.4. Activités biologiques.....   | 45 |
| II.4.1. Etude de l'activité antibactérienne.....                             | 45 |
| II.4.1.1. Méthode des disques -Tests d'efficacité-.....                      | 45 |
| II.4.1.2. Détermination de la concentration Minimale inhibitrice (CMI) ..... | 48 |
| II.4.1.3. Synergie entre l'EBTA de plante et les antibiotiques.....          | 49 |
| II.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante.....                           | 49 |
| II.4.2.1. Principe de l'essai.....   | 49 |
| II.4.2.2. Réalisation de l'essai .....                                       | 50 |
| II.4.2.3. Expression des résultats.....                                      | 50 |
| II.4.3. Evaluation de l'activité antihémolytique <i>in vitro</i> .....       | 51 |
| II.4.3.1. Préparation des globules rouges.....                               | 51 |
| II.4.3.2. Préparation de l'extrait.....                                      | 51 |
| II.4.3.3. Protocole expérimentale.....                                       | 51 |
| II.4.3.4. Expression des résultats.....                                      | 52 |
| II.4.4. Evaluation de l'activité anticoagulante <i>in vitro</i> .....        | 52 |

|  |    |
|--|----|
| II.4.4.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaquettés.....             | 52 |
| II.4.4.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène.....  | 52 |
| II.4.4.3. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie endogène..... | 53 |
| II.4.5. Analyse statistique.....   | 54 |

### **Chapitre III. Résultats et discussion**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. Résultat de l'étude qualitatif.....</b>                                       | <b>55</b> |
| I.1. Résultat de tests phytochimiques.....  | 55        |
| I.2. Résultats de l'étude qualitative par CCM.....                                  | 56        |
| <b>II. Résultats de l'étude quantitative.....</b>                                   | <b>59</b> |
| II.1. Dosage des flavonols et des flavonoïdes de l'EBTA.....                        | 59        |
| II.2. Dosage des tannins condensés de l'EBTA .....                                  | 61        |
| <b>III. Evaluations des activités biologiques.....</b>                              | <b>61</b> |
| III.1. Evaluation de l'activité antioxydante de l'EBTA.....                         | 61        |
| III.2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....                                | 63        |
| III.2.1. Résultats de l'antibiogramme.....  | 64        |
| III.2.2. Détermination de concentrations minimale inhibitrice (CMI).....            | 67        |
| III.2.3. Evaluation de la synergie de l'EBTA avec les antibiotiques.....            | 69        |
| III.3. Evaluation de l'activité antihémolytique de l'EBTA in vitro .....            | 71        |
| III.4. Evaluation de l'activité anticoagulante de l'EBTA in vitro.....              | 73        |
| III.4.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....  | 73        |
| III.4.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène..... | 74        |
| <b>Conclusion et perspective .....</b>  | <b>75</b> |

#### **Références bibliographiques**

#### **Annexe**

#### **Résumés**

## Liste des abréviations

---

**ADN** : Acide désoxyribo-nucléique

**AlCl<sub>3</sub>** :Chlorure d'aluminium

**ATP** : Adénosine Tri Phosphate.

**CCM** : Chromatographique sur Couche Mince.

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.

**Da** : Daltons.

**DMSO** : Diméthyl Sulfoxyde.

**D** : Diamètre.

**DO** : Densité Optique.

**DPPH** : Diphényl Picrylhydrazyl (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>).

**DZI** : Diamètre de la zone d'Inhibition.

**E** : Extrait.

**EBTA** : Extrait Butanolique de *Tetraclinis Articulata*.

**E.coli** : *Escherichia coli*.

**EQ** : Equivalents de Quercétine.

**ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène.

**GR** : Globule Rouge.

**ha** : hectare.

**Hb**: Hémoglobine.

**HBPM** : Héparines de Bas Poids Moléculaire.

**HCl** : Acide chlorhydrique

**IC50** : Inhibitive Concentration of 50 %.

**LDH** : Lactate Déshydrogénase.

**LDL** : Low Density Lipoprotein.

**Mg EQ/g E** : Equivalent milligramme de quercétine par g d'extrait

**PBS** : Tampon Phosphate Saline.

**pH** : potentiel Hydrique.

## Liste des abréviations

---

**Rf** : Rapport frontal.

**SD** : Standard Déviation.

***T.articulata*** : *Tetraclinis articulata*

**TCK** : Temps de Céphaline Kaolin.

**TP** : Taux de Prothrombine.

**TQ** : Temps de Quick.

**tr** : tour.

**UI** : Unité International.

**UV** : Ultra Violet.

**ZI** : Zones d’Inhibition.

**% PI** : Pourcentage d’Inhibition.

## Liste des figures

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1.</b> Photos de l'espèce <i>Tetraclinis articulata</i> et ses différents organes: (a) l'arbre entier (b) l'écorce de l'arbre (c) cône male (d) cône femelle .....                                  | 4  |
| <b>Figure 2.</b> Aire de répartition du thuya de Berbérie en Méditerranée sud occidentale.....  | 6  |
| <b>Figure 3.</b> Localisation géographique de <i>Tetraclinis Articulata</i> en Algérie .....  | 6  |
| <b>Figure 4.</b> Structure chimique du phénol simple et différents acides phénoliques.....  | 13 |
| <b>Figure 5.</b> Structure de base des flavonoïdes .....  | 14 |
| <b>Figure 6.</b> Structure chimique d'un tannin hydrolysable (a) et d'un tannin condensé (b).   | 18 |
| <b>Figure 7.</b> Squelette de base des coumarines.....  | 19 |
| <b>Figure 8.</b> Principaux agents antibactériens et leurs modes d'action .....   | 28 |
| <b>Figure 9.</b> Voies de la coagulation.....   | 35 |
| <b>Figure 10.</b> Protocole d'extraction de l'espèce <i>Tetraclinis articulata</i> .....  | 40 |
| <b>Figure 11.</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine.....   | 44 |
| <b>Figure 12.</b> Courbe d'étalonnage de catéchine.....   | 45 |
| <b>Figure 13.</b> Réduction du DPPH' par un antioxydant .....   | 46 |
| <b>Figure 14.</b> Préparation de l'inoculum.....  | 47 |
| <b>Figure 15.</b> Méthode de l'ensemencement.....   | 48 |
| <b>Figure 16.</b> Préparation des disques d'aromatogramme. ....   | 49 |
| <b>Figure 17.</b> Mesure de diamètres des zones d'inhibition .....  | 49 |
| <b>Figure 18.</b> Plaque 96 puits pour la détermination la CMI .....  | 50 |
| <b>Figure 19.</b> Résultats des tests phytochimiques sur l'extrait de <i>Tetraclinis articulata</i> .....   | 55 |
| <b>Figure 20.</b> Photo de Chromatogramme résultant de l'analyse de l'EBTA par CCM sur gel de silice par le système de solvant 1: (a) à 365 nm et (b) à 254 nm et le système de solvant 2 : (c) à 365 nm..... | 57 |
| <b>Figure 21.</b> Photo de Chromatogramme résultant de l'analyse de l'EBTA par CCM sur gel de silice par le système de solvant 3: (a) à 365 nm et (b) à 254 nm et le système de solvant 5: (c) à 365 nm.....  | 57 |
| <b>Figure 22.</b> Résultats de dosages de flavonoïdes et flavonols.....   | 60 |
| <b>Figure 23.</b> Courbe présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait.....   | 62 |
| <b>Figure 24.</b> Résultats de l'antibiogramme de l'EBTA.....   | 64 |
| <b>Figure 25.</b> Photo d'antibiogramme de penicilline et ofloxacin sur <i>k.Pneumonie</i> (a), <i>L.monocytogene</i> (b), <i>P.aeruginosa</i> (c), <i>S.aureus</i> (d) et <i>E.coli</i> (e,f).....           | 65 |

## Liste des figures

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 26.</b> Photo d'antibiogramme d'EBTA sur <i>P.aeruginosa</i> (a), <i>S.aureus</i> (b), <i>E.coli</i> (c), <i>L.monocytogene</i> (d) et <i>k.Pneumonie</i> (e).....  | 66 |
| <b>Figure 27.</b> Résultats de la CMI pour <i>k.Pneumonie</i> (a), <i>L.monocytogene</i> (b), <i>S.aureus</i> (c) et <i>P.aeruginosa</i> (d).....   | 68 |
| <b>Figure 28.</b> Différentes combinaisons de l'EBTA avec les antibiotiques de pénicilline et ofloxacine ( <i>S.aureus</i> (a), <i>k.Pneumonie</i> (b), <i>P.aeruginosa</i> (c), <i>L.monocytogene</i> (d) <i>E.coli</i> (e)..... | 70 |
| <b>Figure 29.</b> Evolution de l'effet antihémolytique de l'extrait de <i>Tetraclinis articulata</i> en fonction de leur concentration en comparaison avec un témoin positif .....  | 72 |
| <b>Figure 30.</b> Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....   | 74 |
| <b>Figure 31.</b> Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....  | 74 |

## Liste des tableaux

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1.</b> Classification systématique de <i>Tetraclinis Articulata</i> .....  | 4  |
| <b>Tableau 2.</b> Activités biologiques des métabolites secondaires .....   | 9  |
| <b>Tableau 3.</b> Principales classes des polyphénols .....   | 10 |
| <b>Tableau 4.</b> Principales classes des flavonoïdes.....  | 14 |
| <b>Tableau 5.</b> Principales classes des coumarines .....  | 20 |
| <b>Tableau 6.</b> Activités biologiques des polyphénols.....  | 20 |
| <b>Tableau 7.</b> Souches utilisées dans l'activité antibactériennes.....   | 38 |
| <b>Tableau 8.</b> Différents systèmes de solvants essayés et choisis pour la présente étude.....  | 42 |
| <b>Tableau 9.</b> Résultats des tests phytochimiques sur l'extrait butanolique de <i>T. articulata</i> .....  | 55 |
| <b>Tableau 10.</b> Résultats de la CCM de l'EBTA.....   | 58 |
| <b>Tableau 11.</b> Pourcentages de la réduction du radical DPPH° de l'EBTA.....   | 62 |
| <b>Tableau 12.</b> Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne .....  | 64 |
| <b>Tableau 13.</b> Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques et de l'EBTA  | 67 |
| <b>Tableau 14.</b> Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes combinaisons de l'EBTA avec les antibiotiques de pénicilline et ofloxacine..... | 70 |

### Introduction

Depuis longtemps, les plantes ont été une source d'inspiration pour les nouveaux composés médicamenteux. Presque toutes les civilisations et les cultures de l'antiquité ont dépendu entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité et la faible toxicité (Djouidi, et *al.*, 2017).

La phytothérapie a poussé les chercheurs à étudier les activités pharmacologiques des différents métabolites végétaux pour confirmer ses propriétés thérapeutiques d'une part et d'autre part pour identifier les principes actifs à l'origine de ces vertus et par conséquent l'usage de ces médicaments naturels dans les systèmes de soins primaires (Lemaoui, 2011).

De nombreuses études ont démontré que les extraits de plantes médicinales contiennent des antioxydants naturels inclus dans la lutte contre le stress oxydatif impliqué dans le vieillissement et la progression de plusieurs maladies (Manallah, 2012 ; Sahli, et *al.*, 2017). De plus, l'activité antibactérienne des extraits est en relation directe avec la composition et la concentration en composés actifs, le type de microorganismes cibles, les conditions et les méthodes de traitement. Les complications pathologiques des maladies thrombotiques artérielles ou veineuses et hémolytiques sont les raisons pour lesquelles les chercheurs sont focalisés sur la recherche des anticoagulants naturels pour traiter ces pathologies (Labioud, 2016).

Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la grande majorité des populations rurales en Afrique. L'Algérie a une richesse forestière des plantes aromatiques médicinales importante et diversifiée. *Tetraclinis articulata* qui appartient à la famille des cupressacées considéré comme une espèce à croissance lente et qualifié d'espèce secondaire, présente un intérêt écologique et économique important (Ladhem, 2016).

Dans ce travail, on a visé de démontrer la richesse de notre plante *Tetraclinis articulata* en flavonoïdes, flavonols et en tanins proanthocyanidines, et déterminer *in vitro* l'activité antibactérienne, antioxydante, anticoagulante et antihémolytique. Notre recherche est divisée en deux parties, dont la première est une étude phytochimique basé sur la mise en évidence des flavonoïdes et ces principaux classe dans l'extrait butanolique de *Tetraclinis articulata* et la séparation des principaux flavonoïdes par la chromatographie

sur couche mince (CCM), ainsi une estimation de la quantité des flavonoïdes, des flavonols et des proanthocyanidines dans cet extrait. La deuxième partie est basée sur l'évaluation *in vitro* ; de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH°, l'activité antibactérienne sur les souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogène* avec la détermination de la concentration minimale inhibitrice et la synergie entre l'extrait butanolique et les antibiotiques (pénicilline, ofloxacine), l'activité anticoagulante et de l'activité antihémolytique.

## Chapitre I. Revue bibliographique

### I. La plante de « *Tetraclinis Articulata* »

#### I.1. Caractéristiques botaniques de la plante

*Tetraclinis articulata* (Thuya de Berbérie) est un arbre résineux, monoïque, rustique et xérophile qui mesure de 6 à 8 m de hauteur et de 30 cm de diamètre en moyenne. Il est caractérisé essentiellement par sa longévité qui dépasse 400 ans (Ahmed et *al.*, 2006 ; Boussaid, 2017) (Figure 1).

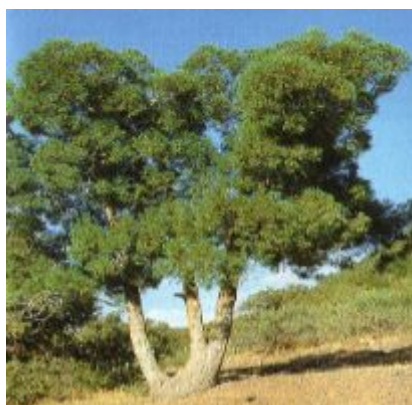
Les feuilles sont persistantes et réduites en écailles opposées et imbriquées par deux, ce qui lui attribue le nom de l'espèce *Articulata*, de couleur vert foncés et ternes, avec des tache glandulaires très visibles remplies d'huile (Zidane, 2017), et les fleurs en chaton situées à l'extrémité des rameaux (UICN. 2011 ; Hadjadj et *al.*, 2017).

Le fruit est un cône d'allure cubique s'ouvrant en quatre valves sous l'effet de la chaleur (n'a lieu qu'à la fin de l'été), et la fructification démarre vers l'âge de 15 ans et se répète tous les deux à trois ans jusqu'à un âge très avancé (Boussaid, 2017).

Le bois du Thuya est moucheté, très léger, tendre et aromatique, il peut se fendre facilement, résiste bien à la pourriture. Il est très robuste plus que ce lui de Pin d'Alep en raison de sa facilité de rejeté des souches jusqu'à un âge très avancé (Zidane, 2017).

L'écorce brun grisâtre, crevassée dans les deux sens, peu épaisse et forme une sorte de quadrillage serré. Il contient des canaux résinifères renfermant une résine exploitable (gomme sandaraque) (Zidane, 2017).

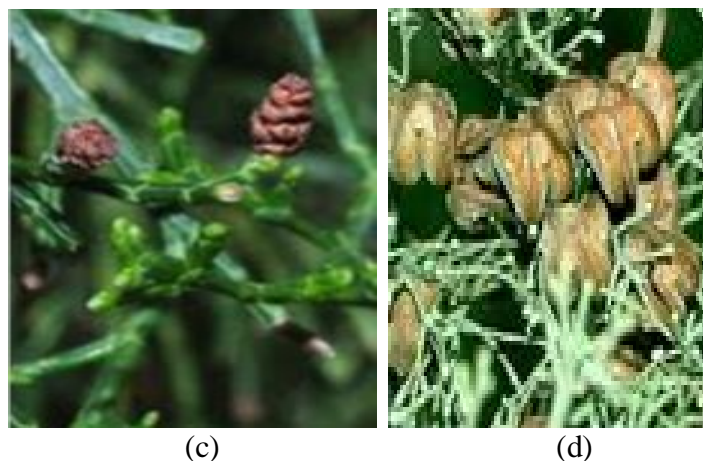
Les racines sont généralement traçantes et peuvent aussi être pivotantes dans des situations particulières (Zidane, 2017).



(a)



(b)



**Figure 1.** Photos de l'espèce *Tetraclinis articulata* et ses différents organes : (a) l'arbre entier (b) l'écorce de l'arbre (c) cône male (d) cône femelle (Zidane, 2017).

## I.2. Différentes appellations attribuées à la plante

La plante *Tetraclinis* est connue sous les noms suivants (Abi-Ayad, 2009):

- **Nom latin :** *Tetraclinis Articulata*, *Thuja articulata Vahl*, *Tetraclinis quadrivalvis*, *Callitris quadrivalvis* ;
- **Nom français :** Thuya de Berbérie, Thuya de Maghreb, Thuja, *Callitris*, *Thuia* articulé, *Thuia* à la sandaraque (thuya vient du grec de *thuos* qui fait référence au bois qui brule en dégageant une odeur), Vernix, Cyprés de l'Atlas, ciprés de Cartagena;
- **Nom Arabe :** عرعر - سننبروش - عرعر بربوش - شجرة الحياة
- **Nom berbère :** Azouka, Imijad, Tazout;
- **Nom anglais:** Arar tree, Sandarach tree, Thyia, Sandarac tree, Sandarac Gum Tree, Juniper gum tree, Alerce, Thuja, Gharghar, thuya from Berberie.

## I.3. Classification de « *Tetraclinis Articulata* »

La place de *Tetraclinis Articulata* dans la systématique est présentée dans le tableau1.

**Tableau 1.** Classification systématique de *Tetraclinis Articulata* (Zarrouki, 2009).

|                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| <b>Règne</b>        | <i>Plantae</i>      |
| <b>Division</b>     | <i>Pinophyta</i>    |
| <b>Classe</b>       | <i>Pinopsida</i>    |
| <b>Ordre</b>        | <i>Pinales</i>      |
| <b>Famille</b>      | <i>Cupressaceae</i> |
| <b>Sous famille</b> | <i>Callitroide</i>  |
| <b>Genre</b>        | <i>Tetraclinis</i>  |
| <b>Espèce</b>       | <i>Articulata</i>   |

#### I.4. Répartition géographique de la plante

*Tetraclinis Articulata* est indigène en Afrique du nord-ouest dans les montagnes d'atlas du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie. En dehors de cette zone, on rencontre quelques petites populations périphériques au sud-est de l'Espagne (province de Carthagène), à l'île de Malte, en Turquie et Libye (Figure 2) (Iserin, 2001 ; UICN. 2011 ; Larabi et *al.*, 2015).

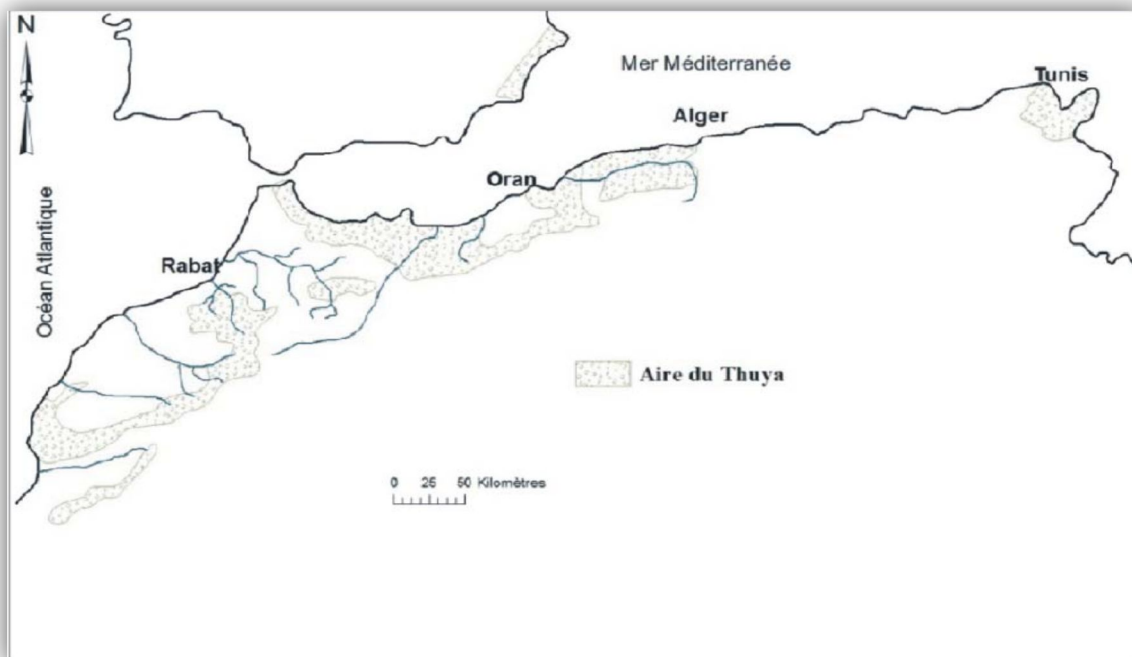
C'est une plante qui pousse partout et à des hauteurs qui oscillent du niveau de la mer jusqu'à 1800 m d'altitude dans un climat méditerranéen en subtropical chaud et sec (zone semi aride). Elle constitue l'une des espèces ligneuses les plus stables et les plus précieuses d'Afrique du nord (Zarrouki, 2009 ; Hadjadj et *al.*, 2017).

La superficie occupée par ce résineux n'a cessé de régresser au fil du temps suite à son exploitation par l'homme d'une manière abusive ou clandestine (Hadjadj et *al.*, 2017).

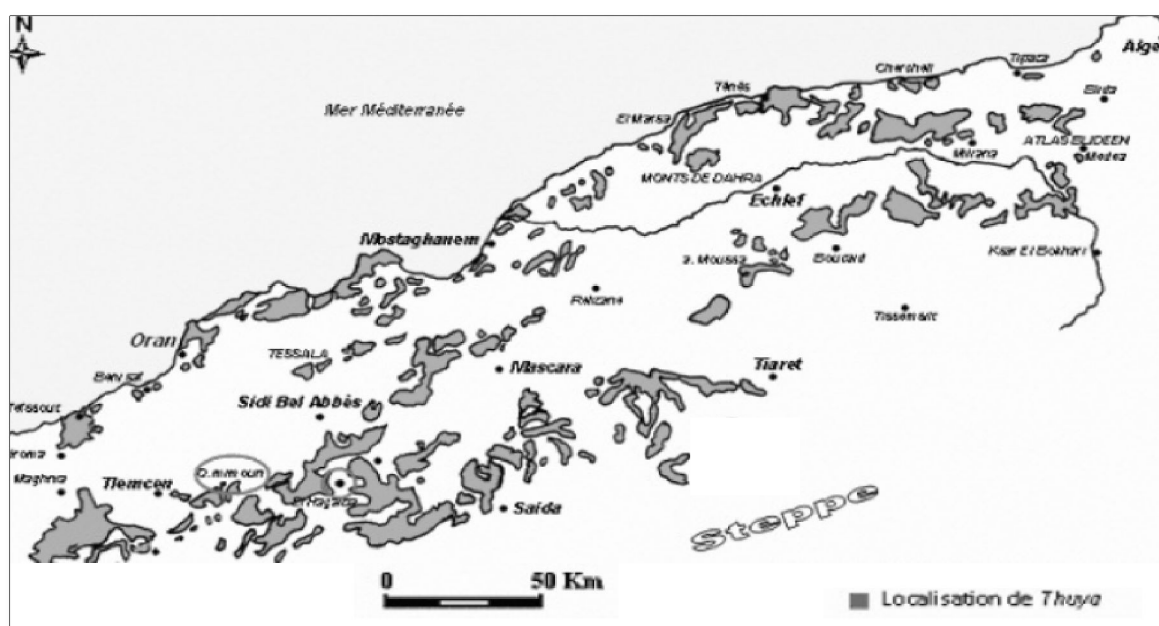
En Algérie, la *Tetraclinis Articulata* occupe la quatrième place après le pin d'Alep, le chêne de liège et le chêne vert, et représente actuellement 161.000 hectare (ha) (Hadjadj et *al.*, 2017), sa densité varie entre 1000 et 8000 arbres / ha (Benabid, 1977). Dans les collines et basses montagnes, elle est très commune dans le secteur oranais, sous secteur des sahels littoraux, des plaines littorales et le sous secteur de l'atlas tellien. Assez commune dans le secteur algérois et le sous-secteur des hauts plateaux et très rare dans la grande Kabylie (Figure 3) (Achache, 2017).

Dans certaine région d'Algérie, les peuplements de thuya ne s'individualisent pas, et sont le plus souvent soit en mélange avec le pin d'Alep ou le chêne liège dans les circonscriptions de Cherchel, Média, Ténès et Theniet el Had, soit sous forme des peuplements purs dans la région de Tlemcen et particulièrement dans les Monts des Trara (Forêts domaniales de Honaine, Beni Menir, Nedroma, Aïn Kebira, Beni Ouarsous, Beni Khellad et Touent) (Hadjadj et *al.*, 2017).

En Maroc, une superficie de 725.000 ha localisée principalement dans les étages semi-arides océaniques et maritimes, entre le niveau de la mer et 1500 m d'altitude. En Tunisie, le thuya ne couvre que 30.000 ha, depuis les collines du Nord- Est jusqu'à une ligne allant de Bizerte au Mont de Zaghouane et à Hammamat (Hadjadj et *al.*, 2017).



**Figure 2.** Aire de répartition du thuya de Berbérie en Méditerranée sud-occidentale (Hadjadj et al., 2017).



**Figure 3.** Localisation géographique de *Tetraclinis articulata* en Algérie (Benali Toumi et al., 2011).

### I.5. Composition chimique de la plante « *Tetraclinis articulata* »

D'une façon plus générale, l'analyse phytochimique de *Tetraclinis articulata* permis de rapporter la présence de les hydrocarbures, de terpènes oxygénés (Larabi et al., 2015) et des huiles essentielles (Achache, 2017).

## **I.6. Différentes applications de « *Tetraclinis Articulata* »**

### **I.6.1. Application dans la médecine traditionnelle**

Le thuya de Berberie est une plante aromatique et médicinale très utilisée dans la médecine traditionnelle de plusieurs pays notamment en Algérie (Dallahi et *al.*, 2017).

Les différentes parties de thuya sont employées en médecine traditionnelle pour leurs multiples effets thérapeutique (Herzi, 2013), parmi ces utilisations :

- Traitement des maux intestinaux et respiratoires et contre les infections cutanées en médecine humaine et vétérinaire (Boussaid, 2017) :
  - Les rameaux et les feuilles avec du zest de grenadine très utiles et efficaces pour calmer les troubles digestifs, les nausées, les problèmes respiratoires, anti-diarrhéique (Boussaid, 2017 ; Zidane, 2017).
  - En macération, dans du lait, les feuilles sont administrées comme émétique dans divers épisodes d'intoxication (Lahsissene et *al.*, 2009).
- Les égyptiens l'employaient pour embaumer les momies (Rachede, 2009).
- le thuya est un abortif dangereux à fortes doses (Boussaid, 2017).
- la sandaraque est utilisable par différentes manières :
  - leur gomme est employée, pour traiter l'inflammation des yeux (Un morceau de sandaraque humecté d'eau de rose est passé sur les paupières) (Bamm, et Douira, 2002), le soin dentaire ; comme l'élimination des noircissements, traitement des caries dentaires (Ladhem, 2016), les ciments dentaires (Bamm et Douira, 2002) et pathologie de la sphère bucco-dentaire (maux de dent, prévention des épidémies et colmater les dents cariées ou perforées) (Rached, 2009).
  - L'huile de la sandaraque, appelée en arabe Gatran el-ghalid (Goudron épais) est utilisée comme remplaçant dans le traitement des blessures chez le bétail (Ladhem, 2016).
- Les feuilles sont conseillées :
  - contre le vertige et la fièvre (Ladhem, 2016).
  - anti hémorragique pouvant survenir en cas d'accouchement (Boussaid, 2017).
  - un coiffant pour les cheveux (Zidane, 2017), Les feuilles en poudre associées au henné sont appliquées en cataplasme, sur le cuir chevelu comme adoucissant et traitement antichute (Boussaid, 2017).
  - Les feuilles en boisson avec le lait contre les fortes diarrhées (Zarrouki, 2009).

- Une macération des feuilles de thuya est utilisée contre le diabète (Boussaid, 2017). Il est principalement utilisé contre l'hypertension, fébrifuge, diurétique, antirhumatismal et hypoglycémiant oral (Herzi, 2013).
- une décoction de poudre des rameaux mélangée à la poudre de l'écorce de Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus L.*) est utilisée en bain contre la fièvre infantile (Boussaid, 2017).
- cette plante est utilisée pour les maladies de la peau dont, le prurit, les parasitoses, les mycoses, les infections bactériennes et piqure d'insecte (Rached, 2009).
- Il est utilisé sous forme de lotion ou d'huile essentielle diluée, agit sur les varices et les hémorroïdes en fortifiant les vaisseaux sanguins, aussi, un bain de pieds permet de réduire une transpiration excessive (Iserin, 2001).
- Pour l'usage interne, il prescrit en cas de rhumes, la grippe, les maux de gorge (Iserin, 2001).

### I.6.2. Autres applications

Le Thuya joue un rôle très important dans l'économie, les activités sociales et aussi dans le maintien de la biodiversité (UICN. 2011):

- **Bois d'œuvre pour la construction** : son bois, connu sous le nom de citre, est très solide. On l'utilise beaucoup pour la charpente de maisons traditionnelles ;
- **Artisanat** : les racines, surtout des vieux arbres, constituent un bois précieux et parfumé très utilisé en ébénisterie ;
- **Huiles essentielles** : c'est également une plante médicinale riche en huiles essentielles qui contient du camphre ;
- **Écologie** : il est parmi les rares conifères qui repoussent après les incendies. Il peut pousser sur des sols pauvres, et joue donc un rôle très important dans la protection contre l'érosion, surtout au niveau des montagnes.

## II. Métabolites secondaires

Les plantes produisent un grand nombre des métabolites secondaires, d'une variété structurale extraordinaire souvent complexe (Khiri et Lalaoui, 2007).

La variation des conditions écologiques, édaphiques et climatiques, interactions entre les végétaux, entre les végétaux et les animaux sont des facteurs qui peuvent stimuler

la production des métabolites secondaires. La concentration des ces derniers variée selon l'espèce, l'âge de la plante, la saison et la partie de la plante (Aneb, 2017).

Les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures (Khiri et Lalaoui, 2007). Ces composés sont localisés dans les vacuoles (flavonoïdes, alcaloïdes), dans des organites spéciaux tels que chloroplastes (avec la chlorophylle), chromoplastes (caroténoïdes) (Aneb, 2017).

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Bouzid, 2009).

## II.1. Activités biologiques des métabolites secondaires

Le spectre d'activité biologique des métabolites secondaires (Tableau 2) est très large, qui liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires et à leurs effets synergiques (Zhiri, 2006).

**Tableau 2.** Activités biologiques des métabolites secondaires.

| Activités biologiques |                  | Composants chimiques   | Références        |
|-----------------------|------------------|--|-------------------|
| Activité bactérienne  | Bactériostatique | Limonène, alpha-humulène, beta-pinène  | Moubarki, 2010    |
|                       | Bactéricide      | carvacrol, thymol, eugénol, néral, gèranial, citronnellal et cuminal                           | Merouane, 2013    |
| Activité antifongique | Fongistatique    | Limonène, alpha-humulène, beta-pinène  | Moubarki, 2010    |
|                       | Fongicide        | eugénol, chavicol 4-allyl-2-6 diméthoxyphénol  | Chemloul, 2014    |
|                       |                  | Phénols, alcools, cinnamaldehyde, cétone, ester, hydrocarbure                                  | Labioud, 2016     |
| Activité antivirale   |                  | acétate d'anéthole, carvone, bêta-caryophyllène, citral, eugénol, limonène, linalol, linalyle, | Merouane, 2013    |
|                       |                  | Quercétine, apigénine, catéchine, hespéridin, phénylpropanoïdes                                | Bouhaddouda, 2016 |

|                            |  |                |
|----------------------------|--|----------------|
|                            | l'alpha-terpinène, gamma-terpinène, alpha-pinène, p-cymène, terpinéol, thymol, citral, le 1,8 -cineol  | Aneb, 2017     |
| Activité anticancéreuse    | d-limonène, géraniol, a-humulène   | Piochon, 2008  |
|                            | lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline, épigallocatechine-3-gallate  | Zeghad, 2009   |
| Activité insecticide       | Phénothrine, pyrethrum   | Jouault, 2012  |
|                            | safrole et l'eugenol   | Achache, 2017  |
| Activité antiparasitaire   | aldéhydes aromatiques  | Leroyer, 2015  |
|                            | Phénols, alcools terpéniques, cétones  | Hélène, 2015   |
| Activité anticoagulant     | Cétones, coumarines  | Mohammed, 2010 |
| Activité antioxydant       | alcools, éthers, cétones, tinalool, 1,8-cinéole, géraniol/néral, citronellal, l'isomenthone, menthone, a-terpinène, y-terpinène, l'alpha-terpinolène | Piochon, 2008  |
|                            | Phénols, polyphénols   | Laib, 2011     |
| Activité antiinflammatoire | monoterpènes hydrocarbonés, sesquiterpènes hydrocarbonés, alcools sesquiterpéniques  | Roger, 2010    |
|                            | Aldéhydes  | Mayer, 2012    |
|                            | Cétones, acides  | Leroyer, 2015  |
|                            | Saponosides  | Touami, 2016   |
| Activité antiseptique      | Aldéhydes, terpènes  | Benayad, 2013  |
| Activité Immunostimulante  | Cétones, monoterpènes  | Mohammed, 2010 |
| Activité antalgique        | Aldéhydes terpéniques, acides  | Leroyer, 2015  |
|                            | Monoterpènes, éthers   | Achache, 2017  |
| Activité antiœdémateuse    | Coumarine  | Hamidi, 2013   |
|                            | Sponosides   | Touami, 2016   |

### III. Polyphénols

#### III.1. Définition

Le terme « phénol » regroupe un ensemble de molécules hydroxylées substituées, dérivées de benzène (phénols simples) et de ses homologues supérieurs (crésols) et de molécules à noyaux polycondensés (naphtols et naphtol sulfonés) (CEAEQ. 2016).

Le terme « polyphénol » désigne des corps dont la molécule contient plusieurs fonctions Phénol. Ce sont des substances qui possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques avec au moins un groupe hydroxyle (Urquiaga et Leighton, 2000 ; Bennick, 2000). D'une autre manière, les polyphénols sont des molécules composées d'au moins un groupe benzénique (six atomes de carbone liés en un hexagone, et chaque atome de carbone lié en outre à un atome d'hydrogène), dont certains hydrogènes peuvent être remplacés par des groupes hydroxyles OH (Cheynier et Sarni-Manchado, 2006).

Les polyphénols constituent un des plus répandu groupes de substances dans les plantes (Bennick, 2002). C'est une classe constituée d'environ 8 000 composés (Middleton et *al.*, 2000). Il devient, de plus en plus clair, que ces composés phénoliques sont essentiels à la survie de la plante, en assurant sa défense contre des attaques microbiennes et en rendant la nourriture désagréable aux prédateurs (Bennick, 2002).

### III.2. Classification et structures

Plusieurs classifications des composés phénoliques basées sur des critères différents ont été proposées :

- Selon le nombre de noyaux aromatiques qu'ils contiennent, et la nature de leur squelette carboné, les classes majeures des polyphénols sont : acides phénoliques (C6-C3), flavonoïdes (C6-C3-C6), stilbènes (C6-C2-C6) et lignanes (C6-C3-C3-C6) (Scalbert, 1999 ; Scalbert et Williamson, 2000 ; Garry et *al.*, 2003 ; Manach et *al.*, 2004 ; Horcajada, 2006).
- Selon le nombre d'atomes du carbone dans le squelette de base, la classification des polyphénols est la suivante (Tableau 3) :

**Tableau 3.** Principales classes des polyphénols (Bravo, 1998 ; Urquiaga et Leighton, 2000).

| Nombre d'atomes de C | Le squelette de base                | Classe  |
|----------------------|-------------------------------------|---|
| 6                    | C6                                  | Phénols Simple<br>Benzoquinones   |
| 7                    | C6-C1                               | Acides phénoliques  |
| 8                    | C6-C2                               | Acetophenones<br>Tyrosine derivatives<br>Acide Phenylacetique                         |
| 9                    | C6-C3                               | Acide Hydroxycinnamique<br>Phenylpropenes<br>Coumarines<br>Isocoumarines<br>Chromones |
| 10                   | C6-C4                               | Naphthoquinones   |
| 13                   | C6-C1-C6                            | Xanthonnes  |
| 14                   | C6-C2-C6                            | Stilbenes<br>Anthraquinones   |
| 15                   | C6-C3-C6                            | Flavonoids<br>Isoflavonoids   |
| 18                   | (C6-C3) <sub>2</sub>                | Lignans<br>Neolignans   |
| 30                   | (C6-C3-C6) <sub>2</sub>             | Biflavonoids  |
| N                    | (C6-C3) n<br>(C6) n<br>(C6-C3-C6) n | Lignins<br>Catéchol mélanines<br>Flavolans (Tannins condensés)                        |

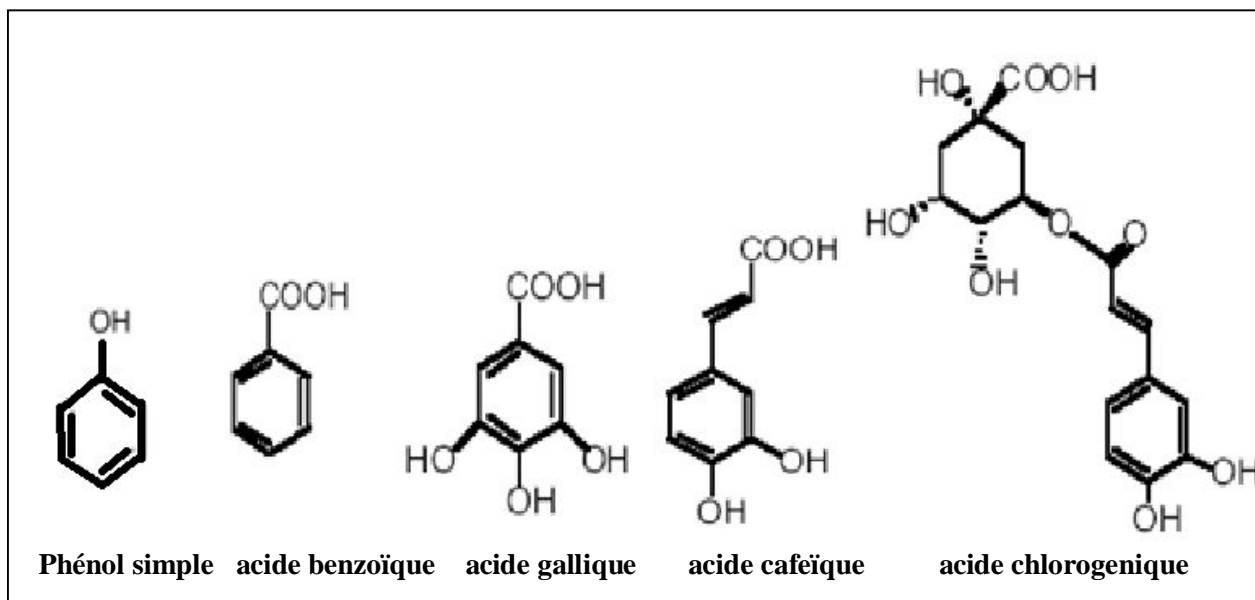
- Selon leur structure chimique, les polyphénols sont divisés en 4 classes majeures (Bennick, 2002): phénols, acides phénoliques, flavonoïdes et tannins (tannins hydrolysables et Tannins condensés).

### III.2.1. Phénol et acides phénoliques

Les phénols simples sont rares dans la nature (catéchol, phloroglucinol...) (Krief, 2003).

Les acides phénoliques sont tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Samadi, 2000). Deux classes d'acides phénoliques peuvent être distinguées: les dérivés de l'acide benzoïque (composés en C6-C1) tels que l'acide gallique élément constitutif des tanins hydrolysables ou les dérivés de l'acide cinnamique (composés en C6-C3) comme l'acide caféique qui sont souvent

estérifiés (Figure 4) (Samadi, 2000 ; Scalbert et Williamson, 2000 ; Garry *et al.*, 2003 ; Krief, 2003 ; Manach *et al.*, 2004 ; Cheynier, 2005).



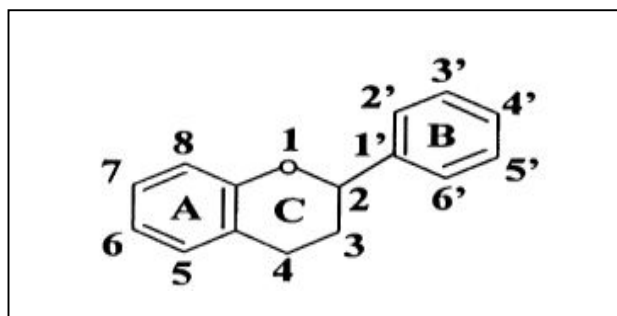
**Figure 4.** Structure chimique du phénol simple et différents acides phénoliques (Krief, 2003).

### III.2.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Marfak, 2003). Ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles, caroténoïdes et bétalaïnes (Ladhem, 2016 ; Zarrouki, 2009).

On trouve les flavonoïdes, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux (Zerargui, 2015).

Les flavonoïdes ont une structure de C6-C3-C6 à poids moléculaire faible. D'une autre manière, ce sont des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C). Ce sont des dérivés du noyau flavane (noyau de base) portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (Figure 5) (Hadi, 2004 ; Ladhem, 2016).



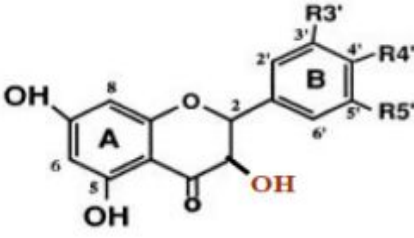
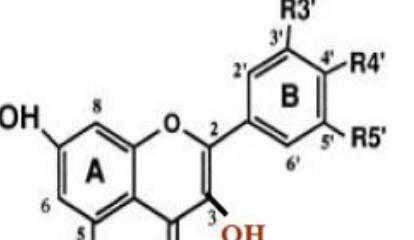
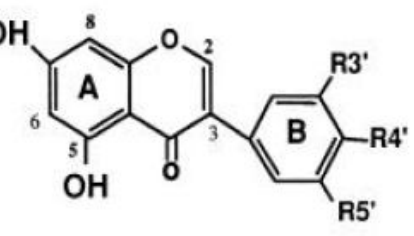
**Figure 5.** Structure de base des flavonoïdes (Marfak, 2003 ; Hadi, 2004).

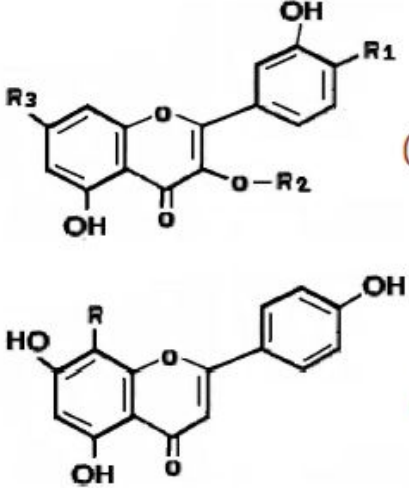
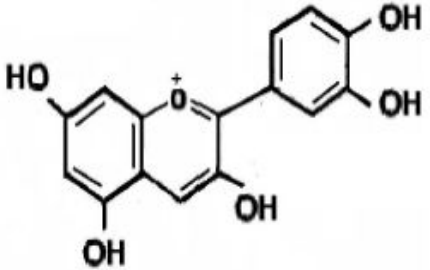
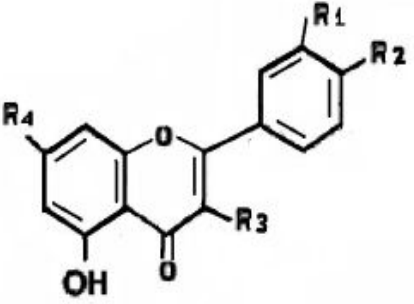
Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituant (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres. . .) sur les deux cycles aromatiques A et B (Heim *et al.*, 2002).

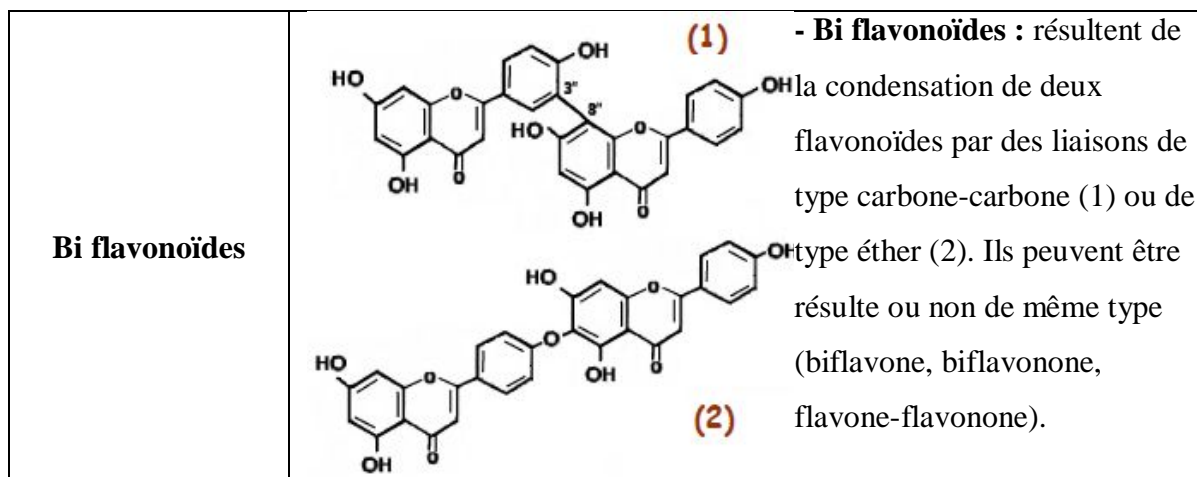
De point de vue structure, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituant portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Tableau 4) (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich, 2006).

**Tableau 4.** Principales classes des flavonoïdes.

| Classes              | Structures Chimique | Caractéristique  |
|----------------------|---------------------|--|
| Chalcones et Aurones |                     | <p>- <b>Chalcones (1):</b> présentent un chainon tricarboné cétonique <math>\alpha</math>-<math>\beta</math>-insaturé (Markham, 1982).</p> <p>- <b>Aurones(2):</b> l'hétérocycle comprend deux atomes de carbone (Harbone, 1994)</p> |

|   |   |   |
|---|---|---|
| <p><b>Flavanones et Flavanonols</b></p> |    | <p><b>-Flavanones et Flavanonols :</b><br/>         Caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 (Lee <i>et al.</i>, 1994)<br/> <b>-Les Flavanonols</b> diffèrent des <b>flavanones</b> par la présence de groupement hydroxyles en C3 (Pierpoint, 1986)</p>                               |
| <p><b>Flavones et Flavonols</b></p>     |    | <p><b>-Flavones et Flavonols :</b><br/>         caractérisés par la présence de la double liaison C2-C3 (Formica et Regelson, 1995).<br/> <b>-Flavonols:</b> possèdent en plus un groupement hydroxyle en C3 (Formica et Regelson, 1995).</p>   |
| <p><b>Iso flavonoïdes</b></p>           |  | <p><b>- Iso flavonoïdes:</b><br/>         caractérisés par un enchainement en C15. mais qui est ici réarrangé selon un motif 1,2-diphényl propanique (Bruneton, 1993).<br/>         -Dérivés par cyclisation des chalcones dans lesquels le noyau B est lié au C3 du noyau C (Hahlbrock, 1981).</p> |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p><b>Hétérosides flavonoïdiques</b></p> |  <p>(1)</p> <p>(2)</p>                       | <p><b>-Hétérosides Flavonoïdiques:</b></p> <p>Divisés en Flavonoïdes -O-glycosides et flavonoïdes -C-glycosides.</p> <p><b>- Flavonoïdes-O-glycosides</b></p> <p>(1): un ou plusieurs groupements hydroxyles sont liés à un ou plusieurs sucres par une liaison acide labile. Le sucre est habituellement un glucose, un galactose ou un rhamnose.</p> <p><b>- Flavonoïdes -C-glycosides</b></p> <p>(2): la liaison s'établit entre le C1 du sucre et le C6 ou C8 du flavonoïde.</p> |
| <p><b>Anthocyanidines</b></p>            |    | <p><b>- Anthocyanidines :</b></p> <p>Possèdent un hétérocycle de type benzopyroxonium à oxygène tétravalent. Ils sont responsables de la couleur rouge, bleu et pourpre des fruits.</p>  |
| <p><b>Flavonoïdes sulfatés</b></p>       |  <p><math>R_1=R_2=R_3=R_4=OSO_3</math></p> | <p><b>- Flavonoïdes sulfatés :</b></p> <p>flavonoïdes hydrosolubles, caractérisés par la présence de 1 à 4 résidus sulfates liés aux groupement hydroxyles du phénol ou du sucre (Vanin <i>et al.</i>, 1987).</p>  |



### III.2.3. Tannins

Le terme « tanin » vient du mot Celtique ancien pour le chêne, une source typique pour les tannins (Hagerman, 2002) utilisés dans la fabrication du cuir (Khanbabae et Ree, 2001 ; Peronny S. 2005).

Les tannins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau mais leur solubilité varie selon le degré de polymérisation. Ils sont solubles aussi dans les alcools et l'acétone. Leurs poids moléculaires sont très élevés (500-3000 Daltons) (Peronny, 2005 ; Zarrouki, 2009).

La caractéristique la plus déterminante des tannins est leur capacité de former des complexes (par précipitation) avec les polymères naturels comme les protéines nutritives, les enzymes digestives, les polysaccharides (l'amidon, la cellulose, l'hémicellulose...etc.), les lipides, les acides nucléiques et les acides aminés. De plus, ils sont capables de capter les ions métalliques et particulièrement le fer, les alcaloïdes (Kumbasli, 2005) et les métaux lourds (Bruneton, 1993).

Les deux principaux groupes basés sur des différences structurales sont :

#### III.2.3.1. Tannins hydrolysables

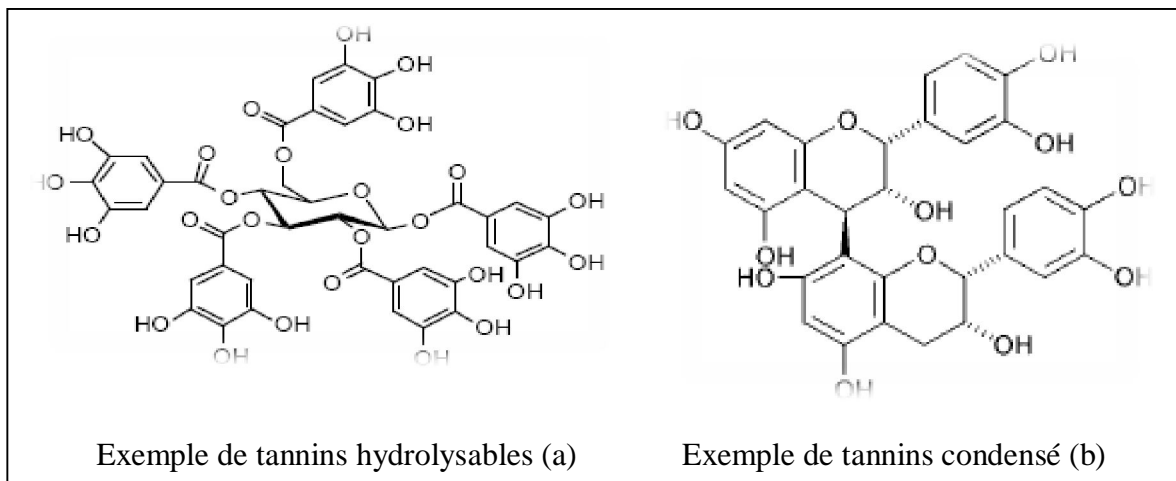
Les Tannins hydrolysables donnent par hydrolyse un ose et un nombre variable des molécules d'acides phénolique, acide gallique ou acide ellagique (Zarrouki, 2009).

Sont des esters de glucose, c'est-à-dire un noyau central de glucose (dans certain cas des polysaccharides ont été identifiés) sur lequel se fixent au moyen d'une liaison ester, des acides : acide gallique pour le groupe des gallotannins, l'acide hexahydroxydiphénique (ou ellagique) pour le groupe des ellagitannins (Figure 6). Leurs hydrolyses par des acides, des bases ou certains enzymes libère le glucose ainsi que les acides galliques ou

phénoliques lies. Ils n'existent que chez les dicotylédones (Bouزيد, 2009 et Zarrouki, 2009).

### III.2.3.2. Tannins condensés

On les appelle également les proanthocyanidines car les tannins condensés produisent les anthocyanidines quand on les chauffe dans des conditions acides. Ce sont des polymères de flavan-3-ols (appelés aussi catéchines) et de flavan-3,4-diols (appelés leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux liées entre elles par des liaisons type carbone-carbone le plus souvent 4→8 ou 4→6 (Figure 6) (Zarrouki, 2009). Les tannins condensés sont des polymères de très fort poids moléculaires, les plus couramment décrits faisant 5000 Da, mais on en a découvert de plus de 30 000 Da (Peronny, 2005). Plus le poids moléculaire des tannins condensés augmente (>5000 Da) plus ces derniers deviennent insolubles dans les solutions physiologiques et perdent leur capacité à précipiter les protéines (Kumbasli, 2005).

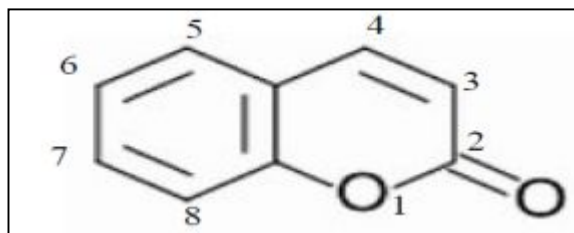


**Figure 6.** Structure chimique d'un tannin hydrolysable (a) et d'un tannin condensé (b)

(Kumbasli, 2005 ; Peronny, 2005).

### III.2.4. Coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorata* Wild., Fabaceae) d'où fut isolée en 1982 (Bruneton, 1993). Ils sont des composés aromatiques dérivant de l'acide O- hydroxy-Z- cinnamique connue dans la nomenclature interactionnelle comme 1-benzopyrane-2-one ou 1,2-benzopyrone (Figure 7) (Zarrouki, 2009).



**Figure 7.** Squelette de base des coumarines (Zarrouki, 2009).

Les coumarines sont classées principalement en coumarines simples, prenylées, furanocoumarines, pyranocoumarines (Tableau 5). C'est une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Deina et *al.*, 2003 ; Booth et *al.*, 2004).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée (Hofmann, 2003), Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (Hofmann, 2003).

Les coumarines sont solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, les solvants chlorés et les alcooles. Leurs formes hétérocycliques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont une absorption caractéristique en UV vue leurs structures aromatique (Zarrouki, 2009).

**Tableau 5.** Principales classes des coumarines (Bouزيد, 2009).

|  |   |
|--|---|
| <b>Coumarines simples</b>                              | Coumarine ; Ombelliferone   |
| <b>Coumarines prenylées</b>                            | Rutaculine ; Osthol   |
| <b>Furanocoumarines</b>                                | Furanocoumarines lineaires :<br>Bergaptene, Imperatorine<br>Furanocoumarines angulaires :<br>Angelicine, Pimpinéline. |
| <b>Pyranocoumarines</b>                                | La visnadine  |
| <b>Les coumarines à l'état dimerique ou trimerique</b> | Dicoumarines (coumarines dimerique) :<br>Dicoumarol<br>Tricoumarines :<br>Triumbellattine                             |

### III.3. Activités biologiques des polyphénols

Les activités biologiques de principales classes des polyphénols sont représentées dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Activités biologiques des polyphénols.

| <b>Composant phénolique</b> | <b>Activité biologique</b>  | <b>Référence</b>                 |
|-----------------------------|---|----------------------------------|
| Acide phénolique            | Antibactériennes<br>Antifongiques<br>Antioxydants   | Badereddine <i>et al.</i> , 2014 |
|                             | antiulcéreuses<br>antiparasitaires  | Nsemi Muanda, 2010               |
|                             | Anti tumorales<br>antiparasitaires<br>antibactériennes<br>anti-inflammatoires<br>analgésiques<br>hypotenseurs<br>antivirales<br>diurétiques<br>antioxydants<br>antithrombotique<br>anti-allergique<br>anticarcinogene | Nsemi Muanda, 2010               |
|                             | anti-ulcère   | Yezza <i>et al.</i> , 2014       |
|                             | antispasmodiques  | Hamza <i>et al.</i> , 2015       |

|             |   |                              |
|-------------|---|------------------------------|
| Flavonoïdes | anti-hépatotoxique<br>activité<br>hypocholestérolémiante<br>activité antidiabétique<br>activité antimitotique<br>activité anxiolytique  | Zoughlache, 2009             |
|             | Activités estrogéniques<br>anti-estrogéniques<br>Activité sur les maladies<br>neuro-dégénératives<br>Activité insecticide   | Morel, 2011                  |
|             | anti-influenza  | Khaldi, 2015                 |
|             | Vasodilatateur  | Tigrine, 2014                |
| Coumarine   | Protectrices vasculaires,<br>anti- inflammatoires,<br>anti parasitaires<br>analgésiques<br>anti œdémateuses   | Nsemi Muanda, 2010           |
| Tanin       | Anticoagulant<br>Antioxydant<br>Inductrice de l'apoptose<br>Anti diarrhéique<br>Anti tumorales<br>Immunostimulant<br>Antimutagène<br>Anti hypertensive<br>Antiinflammatoire<br>Anti virale<br>Antibactérienne<br>Antifongique | Biaye, 2002                  |
|             | antiulcéreuse<br>stabilisation du collagène   | Hamza et <i>al.</i> , 2015   |
|             | cicatrisant   | Aissous et <i>al.</i> , 2016 |
| Lignine     | Antiviral, anticancéreux,<br>antimicrobien<br>antioxydant   | Aissous et <i>al.</i> , 2016 |

## IV. Activités biologiques étudiées

### IV.1. Activité antioxydante

#### IV.1.1. Stress oxydant

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies où les mitochondries qui en utilisent la majeure partie comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production de l'énergie sous forme d'ATP. Ce métabolisme induit la production d'espèces réactives en équilibre avec les systèmes antioxydants (Roede et Jones, 2010).

Le stress oxydant est communément, défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006).

### **IV.1.1.1. Radicaux libres**

On définit comme radical libre, n'importe quelle molécule indépendante contenant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) sur la couche orbitale la plus externe (Christopher et *al.*, 1995) et cherchant la stabilité par appariement avec des électrons arraché sur les molécules les plus proches. Cette stabilité va entraîner une réaction en chaîne ou la neutralisation d'un radical passe par la création d'un autre (Dib et Boutarene, 2007).

L'oxygène est indispensable à la vie de la plupart des êtres vivants, Il possède deux électrons non appariés, ceci explique sa grande réactivité. Cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes, il est donc peu toxique par lui-même (Dacosta, 2003). Mais sous l'action des radiations ionisantes, de rayon UV, de métaux de transition « fer, cuivre...etc.» ou au cours de certaines réactions enzymatiques, des formes hautement réactives de l'oxygène apparaissent, on les désigne souvent comme espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Bouزيد, 2009).

#### **IV.1.1.1.1. Espèces réactives de l'oxygène**

L'appellation «espèces réactives de l'oxygène » inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (Le radical superoxyde ; hydroxyle ; l'oxyde nitrique) mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires (peroxyde d'hydrogène ; l'oxygène singulet ; l'anion hypochlorite ; le peroxydinitrite) dont la toxicité est importante (Novelli, 1997 ; Bartosikova et *al.*, 2003).

En effet, la toxicité des ERO n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demi vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (Kohen et Nyska, 2002).

#### IV.1.1.1.2. Sources des espèces réactives de l'oxygène

Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux radicaux libres par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normale et parfois en réponse à un stimulus spécifique (Boussoualim, 2014). Deux sources peuvent être citées :

##### ➤ Sources exogènes

Des facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans l'organisme par l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, etc...) peuvent contribuer à la production des ERO qui se forment comme un des produits de leur métabolisme *in vivo* (Desikan et al., 2003 ; Lykkesfeldt et Svendsen, 2007).

Le goudron, le tabac et les polluants industriels participent également à la genèse d'ERO, qui attaquent et causent des endommagements dans l'organisme que ce soit par interaction directe avec la peau ou après inhalation dans les poumons (Münzel et al., 2006 ; Důračková, 2008).

L'exposition prolongée au soleil, ainsi que les rayonnements X ou  $\gamma$  peuvent par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $1O_2$  et  $d'H_2O_2$ ) (Bouزيد, 2009).

Une alimentation raffinée riche en graisses saturées, en sucre et consommation d'alcool, sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Mena et al., 2009) qu'une alimentation déséquilibrée (carences en vitamines et oligo-éléments) (Zerargui, 2015).

##### ➤ Sources endogènes

À côté des sources exogènes des radicaux libres, les métabolismes intracellulaires (endogènes) sont des sources plus importantes d'ERO. Ils sont produits en continu durant toute la vie de chaque cellule dans l'organisme (Boussoualim, 2014).

L'une des sources physiologiques majeures de  $O_2^{\cdot-}$  est représentée par la chaîne respiratoire mitochondriale comme source permanente d'ERO (García, 2005).

De même, les radicaux libres sont produits *in vivo* sous l'action de plusieurs systèmes biochimiques tel que, les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages) (Boussoulim, 2014).

Des radicaux libres sont également produits sous l'influence d'autres facteurs endogènes, notamment le stress intellectuel ou thermique (Ansari, 1997 ; Valko et *al.*, 2006).

### **IV.1.1.2. Cibles des radicaux libres**

Lors d'un stress oxydant, les ERO non « détoxifiés » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN... directement à leur contact (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le HO<sup>•</sup>. Ce dernier est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction est appelée peroxydation lipidique qui aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques. Parmi ces dérivés, le malondialdéhyde ayant une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et qui diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène, et il provoque aussi une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (Fontaine, 2007 ; Miwa et *al.*, 2008).

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les radicaux libres sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels le OH<sup>•</sup> s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Schnackenberg, 2002). Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures. De nombreux enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydés et inactivés. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Důračková, 2008).

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. L'attaque radicalaire peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Fontaine, 2007 ; Orban, 2007).

### **IV.1.2. Pathologies liées au stress oxydant**

Tous les types de maladies est souvent associé au stress oxydant, bien qu'il ne soit pas toujours facile de déterminer s'il est la cause ou la conséquence (Song, 2004). Il est impliqué dans de très nombreux désordres et maladies : athérosclérose (Ko et *al.*, 1998 ; Harrison et *al.*, 2003), la cancérogenèse (Harrison et *al.*, 2003 ; Klaunig et Kamendulis, 2004), l'arthrite, l'asthme, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le mongolisme (Cavin, 1999), les maladies cardiovasculaires, arthrose, cataracte, le diabète, chute de cheveux et le vieillissement (Tohda et *al.*, 2004; Pastre et priymenko, 2007; Surveswaran et *al.*, 2007 ; Bekro et *al.*, 2008).

### **IV.1.3. Antioxydants**

#### **IV.1.3.1. Définition d'un antioxydant**

Un antioxydant peut être défini comme étant toute substance qui, lorsqu'elle est présente à des faibles concentrations par rapport à ceux d'un substrat produits par les oxydants, les radicaux libres, les métabolites réactifs de l'oxygène, retarde considérablement ou empêche l'oxydation de ce substrat (Ben Chibane T. 2013).

#### **IV.1.3.2. Principaux antioxydants**

##### **➤ Acides phénoliques**

L'acide phénolique est un composé qui possède au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Il est divisé en deux groupes : hydroxybenzoïques et cinnamiques (Bruneton, 1999). Le pouvoir antioxydant des acides phénoliques réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres (Ouerdane et Ramdani, 2007).

##### **➤ Flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Bruneton, 1999).

Les flavonols, fait partie des flavonoïdes, sont aussi connu par leur effet antioxydant très puissant. Ils possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs au jaune primevère. Parmi les flavonols les plus réponsus, on trouve le kaempférol, le quercétol ces deux flavonols sont incolores; le myricétol est l'isorhamétol (Alais et Linden, 1997).

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO comme la xanthine oxydase (Boussoulim, 2014).

### ➤ **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes constituent une famille de pigments liposolubles largement répandu dans le règne végétal responsable de la couleur jaune, orange ou rouge des fruits et légumes. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en double liaisons. Ils sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Goudable et Favier, 1997).

### ➤ **Tanins condensés**

Les tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) et des gallocatéchines (trihydroxylées) (Porter et *al.*, 1986). Les tanins réagissent comme antioxydants puissant contre les radicaux libres en les transformant en molécules stables (Boussoulim, 2014).

### ➤ **Acide ascorbique**

L'acide ascorbique ou la vitamine C, est une vitamine hydrosoluble et localisée dans le cytosol et le fluide extracellulaire, elle capte directement l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et l'OH<sup>•-</sup>. Elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Boussoulim, 2014).

### ➤ **Vitamine E**

La vitamine E est constituée de quatre isomères de tocophérol,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , avec une activité antioxydante variable (Limbach et Guillard, 2007). La forme  $\alpha$  est la plus active, elle est liposoluble et se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de

peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde ( $\text{LOO}^\circ$ ). Elle devient à son tour un radical moins actif que le  $\text{LOO}^\circ$  et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Boussoualim, 2014).

### ➤ **Enzymes**

Il s'agit principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Manallah, 2012).

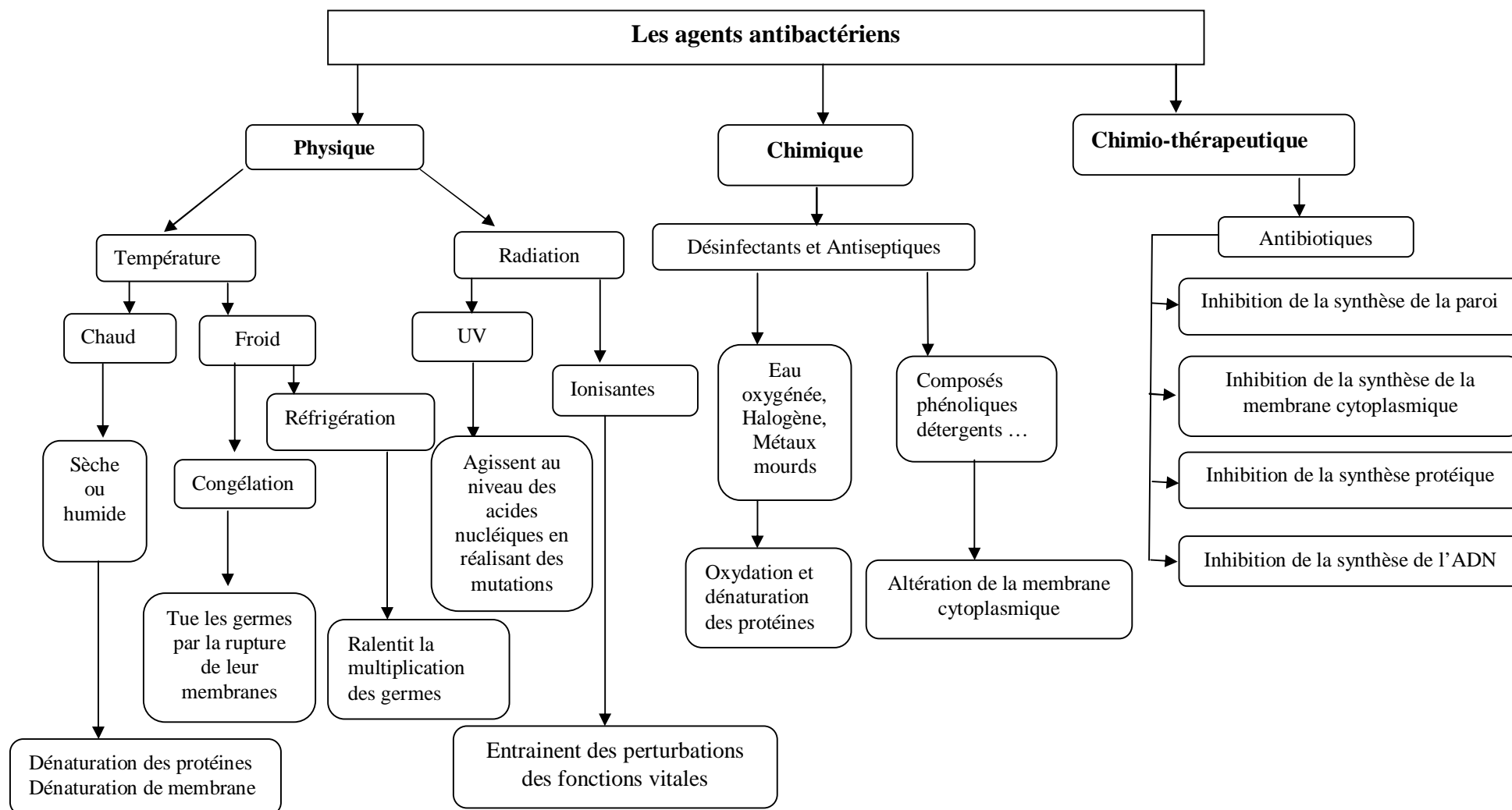
## **IV.2. Activité antibactérienne**

A l'heure actuelle, le phénomène de résistance bactérienne est connu pour toutes les familles d'antibiotiques. Il concerne toutes les espèces bactériennes qui pourront développer des mécanismes différents selon leur sensibilité initiale et leurs capacités à exprimer les diverses résistances d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plante (Beddou, 2015).

### **IV.2.1. Agents antibactériens**

Un agent antibactérien désigne tout facteur qui contrôle le développement d'une population bactérienne. Il est dit « bactériostatique » lorsqu'il crée un état d'inhibition momentanée de la multiplication bactérienne ou dit « bactéricide » lorsqu'il détruit totalement les bactéries (Hardy, 2002).

On distingue trois catégories des agents antibactériens : agents physiques, agents chimiques, agents chimio-thérapeutiques (Figure 8) (Benkhaled et *al.*, 2013), et agents naturels (Boussoualim, 2014).



**Figure 8.** Principaux agents antibactériens et leurs modes d'action (Benkhaled S. et al., 2013).

#### IV.2.1.1. Agents antibactériens naturels

##### ➤ Polyphénols

- **Phénols simples et acide phénolique** : ces substances montrent, en effet, une importante toxicité envers les microorganismes par la modification des propriétés physiques en s'intercalant dans la bicouche membranaire (Taylor, 2013). Les sites et le nombre des groupements OH sur les phénols seraient en relation avec cette toxicité. Cet effet antimicrobien augmente avec le nombre des groupements OH. Il concerne probablement l'inhibition de certaines enzymes via des réactions avec leurs groupements sulfhydriles ou par des interactions non spécifiques avec ces dernières (Cowan, 1999 ; Pistelli et Giorgi, 2012).
- **Quinones** : les protéines d'adhésion de surface, les polypeptides de la paroi et les enzymes membranaires de la cellule microbienne sont les cibles probables des quinones (Cowan, 1999).
- **Flavonoïdes** : les flavonoïdes exercent leurs effets via trois mécanismes : l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, inhibition de la fonction des membranes cytoplasmiques et aussi l'inhibition du métabolisme énergétique (Tim Cushine et Lamb, 2005).
- **Tannins** : ces composés sont caractérisés par une capacité à bloquer la membrane cytoplasmique par l'inactivation des adhésines de surface, les enzymes et les protéines de transport membranaires (Okuda, 2005).

##### ➤ Alcaloïdes

Le mécanisme d'action est attribué à sa capacité à intercaler l'ADN (Boussoulim, 2014).

##### ➤ Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont biosynthétisées par les végétaux supérieurs en réponse à des conditions de stress et surtout pour combattre les agents infectieux ou parasitaires. Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont: l'altération de la paroi cellulaire, la dégradation de la membrane cytoplasmique, l'altération des protéines membranaires, la fuite du contenu cellulaire, la coagulation du cytoplasme et l'épuisement de la force de mouvement des protons (Goetz et Ghedira, 2012).

### ➤ Polypeptides

La plupart des peptides inhibiteurs de la croissance des microorganismes agissent par la formation de canaux ioniques dans la membrane microbienne ou par inhibition compétitive de l'adhésion des protéines microbiennes aux polysaccharides des récepteurs de la cellule hôte (Yang *et al.*, 2006).

#### IV.2.1.2. Antibiotique

Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance» (Prescott *et al.*, 1995) ; ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides» (Guinoiseau, 2010).

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large (Guinoiseau, 2010).

Le mode d'action des antibiotiques est connu car ils sont développés en fonction de leur cible (Belkhiri, 2009). On les classe d'ailleurs selon leur mécanisme de destruction de la cellule bactérienne (Pibiri, 2006) :

- 1- Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.
- 2- Antibiotiques inhibant la synthèse de la membrane cytoplasmique.
- 3- Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique.
- 4- Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques et de la synthèse de l'ADN.
- 5- Antibiotiques agissant par inhibition compétitive.

#### IV.2.2. Résistance des bactéries aux antibiotiques

Le recours à des médicaments antimicrobiens comme les antibiotiques pour traiter les maladies infectieuses constitue un point marquant dans l'histoire de la médecine. Mais en raison de l'usage généralisé de ces types de médicaments, plusieurs souches de grandes familles de bactéries pathogènes sont devenues résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (Belkhiri, 2009). De fait, la prolifération de ces microorganismes résistants pose un grave

problème de santé à l'échelle mondiale, un problème dont les conséquences pourraient bien s'avérer irréversibles (Mehrotra *et al.*, 2003).

### ➤ **Résistance intrinsèque**

Une résistance intrinsèque se définit comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle conférant une certaine tolérance, voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries (une espèce, un genre ou parfois un groupe plus grand), vis-à-vis d'une classe antimicrobienne. L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à : (i) un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne, (ii) une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (impermeabilité de la membrane externe), (iii) une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques, ou encore (iv) une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (Muylaert et Mainil, 2012).

### ➤ **Résistance acquise**

C'est une caractéristique propre à quelques souches bactériennes d'un genre ou d'une espèce particulière, provoquant l'émergence et la diffusion de résistances au sein de population de germes normalement sensibles. On décrit deux phénomènes majeures à la base de l'acquisition de résistances par modification du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes. En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gène (Guardabassi et Courvalin, 2006)

### **IV.2.3. Synergie**

L'utilisation abusive des antibiotiques a induit le phénomène de résistance des bactéries infectieuses aux antibiotiques. Ce problème que rencontre la médecine actuelle, a relancé la recherche vers l'élaboration d'autres stratégies thérapeutiques visant à exploiter les propriétés antimicrobiennes des substances naturelles pouvant se substituer aux antibiotiques et/ou agir en synergie avec ces derniers (Ankli *et al.*, 2002; Newman et Cragg, 2007).

Selon Eaton et Klaassen (2001), le terme synergie signifie travailler ensemble. Il désigne l'interaction entre au moins deux « choses » dont les effets combinés sont

beaucoup plus supérieurs à la somme de leurs effets singuliers (effets de type « un plus un est supérieur à deux»). En plus du terme synergie, d'autres termes sont utilisés pour désigner les interactions entre deux molécules :

- **Additif** : phénomène qui survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux produits chimiques est égal à la somme des effets de chaque produit chimique pris individuellement (aucune interaction directe).
- **Potentialisation** : phénomène qui survient lorsqu'une substance qui n'a habituellement pas un effet est combinée à un produit chimique, ce qui a pour effet de rendre ce dernier beaucoup plus efficace.
- **Antagonisme** : ce phénomène est le contraire de la synergie. Il survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux composés est moins efficace que les effets individuels des substances.

### IV.3. Activité anti hémolytique

#### IV.3.1. Généralité sur l'hémolyse

L'hémolyse (hémo : sang, lyse : perturbation) est un état physiologique qui survient au terme d'une vie d'un globule rouge (GR) ; qui vise la destruction de la membrane érythrocytaire provoquant la libération d'hémoglobine (Hb) et d'autres composants. Si elles ne sont pas neutralisées par les mécanismes de protection, elles ont le potentiel d'activer de multiples voies inflammatoires, comme l'hème et des molécules puissants (protéines de choc (HSP), l'interleukine d'adinosine5'....etc).Cependant, dans certains cas l'hémolyse est exagérée, réduisant la durée de vie des hématies on parle alors d'une hémolyse pathogène, elle affecte toujours un des constituants vitaux du GR : membrane, enzyme, Hémoglobine (Ait Amar, 2010 ; Techer, 2013 ; Amrane et *al.*, 2017 ; Melaz et *al.*, 2017).

#### IV.3.2. Type des hémolyses

La nomination des types de l'hémolyse sa change selon :

- **Le siège de l'hémolyse**
  - Hémolyse intra-tissulaire est une phagocytose des globules rouges âgées, principalement au niveau de la moelle osseuse pour le sujet sain et au niveau de la rate et le foie en cas d'une maladie hémolytique (Meftah, 2016).
  - Hémolyse intravasculaire est une hémolyse qui se déroule au niveau de la circulation (Meftah, 2016).

➤ **Le mécanisme de l'hémolyse**

- Hémolyses intra corpusculaires c'est-à-dire la destruction des hématies provenant de sa fragilité et qui correspond à : la malformation des globules, déficit enzymatique des globules rouges comme déficit en pyruvate kinase ou un défaut de régénération de l'ATP (Ait Amar, 2010 ; Larab et *al.*, 2017).
- Hémolyses extra corpusculaires sont dues à diverses causes : toxiques (médicaments), immunologiques (Fixation d'un AC sur le GR), infectieuses (virus, bactéries, parasites), mécanique (Prothèses intracardiaques) (Ait Amar, 2010).

**IV.3.3. Signes de l'hémolyse**

**IV.3.3.1. Signes cliniques**

Les signes cliniques de l'hémolyse sont : Pâleur, asthénie, dyspnée, ictère, urines rouges, splénomégalie, essoufflement, tachycardie. On trouve des signes cliniques spécifiques à chaque type de l'hémolyse par exemple pour l'anémie hémolytique auto-immune, on a la thrombose veineuse, l'infarctus du myocarde dans leurs formes aiguës (Zandecki, 2006 ; Meftah, 2016).

**IV.3.3.2. Signes biologiques**

En cas de l'hémolyse, on distingue la modification des paramètres biologiques suivants : augmentation du taux d'hémoglobine, bilirubine non conjuguée, du lactate déshydrogénase (LDH), de fer dans les urines ; les réticulocytes augmenter environ 5 jours après début de l'hémolyse et une diminution du taux d'haptoglobine, d'hémoglobine (Zandecki, 2006 ; Ait Amar, 2010 ; Amrane et *al.*, 2017).

**IV.4. Traitement de l'hémolyse**

L'hémolyse est traitée par l'utilisation des médicaments anti-hémolytiques, qui présentent la capacité à retarder ou à inhiber la lyse des globules rouges. Mais ce traitement se change selon la cause de l'hémolyse (héréditaire ou acquises), par exemple l'anémie hémolytique est traitée par l'acide folique, un complément de fer, des corticoïdes et des suppléments de vitamine B (Larab et *al.*, 2017).

Plusieurs médicaments peuvent provoquer une hémolyse comme effet secondaire : l'alpha-méthyl dopa, le diclofénac, les céphalosporines de deuxième et troisième génération et les antibiotiques ont été identifiés comme inducteurs de l'anémie hémolytique auto-immune (Meftah, 2016).

## **IV.4. Activité anticoagulante**

### **IV.4.1. Généralité sur la coagulation**

L'hémostase regroupe différents mécanismes qui assurent la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas de rupture de la continuité de la paroi vasculaire et la réparation de la brèche vasculaire. Elle comprend différentes étapes : vasoconstriction, adhésion, agrégation plaquettaire et coagulation (Kramoroff, 1999).

La coagulation est activée lors d'une brèche vasculaire, pour consolider l'agrégat plaquettaire afin de colmater la brèche et arrêter le saignement du sang (Lemaoui, 2011), par l'activation en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs (Chalal, et Chibout, 2017).

### **IV.4.2. Mécanismes de la coagulation**

La coagulation plasmatique consiste en une cascade enzymatique (Figure 9) (Patrick, 2002) :

#### **IV.4.2.1. Formation de la prothrombinase**

Elle résulte de l'association, sur une matrice de phospholipides, du facteur Stuart (Xa), de la proaccéléline (Va) et de calcium. L'association de ces facteurs peut être déclenchée par deux mécanismes (Patrick, 2002) :

##### **➤ Voie exogène**

C'est le contact du plasma et du facteur tissulaire avec le facteur VIIa qui va entraîner l'activation du facteur X. celui-ci va alors former la prothrombinase en s'associant au facteur Va en présence de  $Ca^{2+}$  (Patrick, 2002).

##### **➤ Voie endogène**

Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII lors de ce contact aux matrices sous-endothéliales, une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kalikréine qui à son tour peut activer le facteur XII. Le facteur XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX. Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son cofacteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X. Ce dernier forme avec son cofacteur, le facteur V (pro-accéléline), les phospholipides

plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine (facteur II) en thrombine (Tlili, 2015).

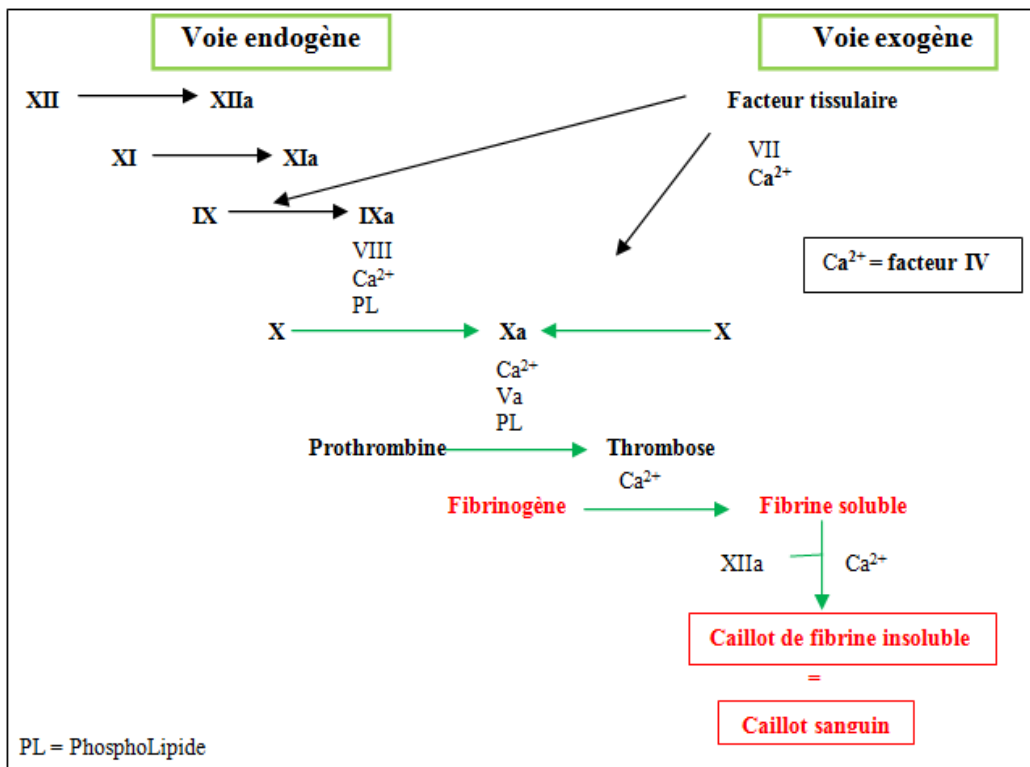


Figure 9. Voies de la coagulation (Lemaoui, 2011).

#### IV.4.2.2. Formation de la thrombine

Elle résulte de l'action de la prothrombinase sur la prothrombine (Patrick, 2002).

#### IV.4.2.3. Formation de la fibrine

La thrombine formée catalyse la conversion de fibrinogène en monomères de fibrine qui s'associent les unes aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (Tlili, 2015).

#### IV.4.3. Maladie de l'excès de la coagulation « thrombose »

La thrombose est une maladie vasculaire la plus fréquente, qui résulte d'une perturbation de l'une des étapes de l'hémostase (Lemaoui, 2015). De ce fait, on distingue deux types des thromboses : thromboses artérielles et thromboses veineuses.

#### **IV.4.3.1. Thrombose artérielle**

La thrombose artérielle est un caillot ou thrombus blanc constitué d'amas plaquettaire consolidé par un réseau fibrineux et elle se forme habituellement après l'érosion ou la rupture de la plaque athéromateuse liée à l'évolution de l'athérosclérose, cette thrombose est connue sous le nom d'athérothrombose qui est considérée comme la cause principale de la mortalité dans le monde (Beaudeau et *al.*, 2006).

Elle consiste en une accumulation focale de graisses (les lipides), de glucides complexes (les sucres), de sang, de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Le tout est accompagné de modification de la structure interne de l'artère qui est le principal générateur de la thrombose artérielle (Manallah, 2012).

La thrombose est responsable des complications cliniques très dangereuses regroupées en trois catégories : les syndromes coronariens aigus, l'accident vasculaire cérébral et l'ischémie aiguë des membres inférieurs (Bauters, 2002).

#### **IV.4.3.2. Thrombose veineuses**

La phlébite ou thrombose veineuse profonde est liée à la formation d'un caillot de sang (ou thrombus) qui bouche une veine. Elle survient le plus souvent dans une veine des jambes, mais elle peut survenir sur presque toutes les veines de l'organisme (bras, cerveau, tube digestif, reins, etc.) (Tlili, 2015).

Le caillot sanguin ou thrombus, va boucher la veine, entièrement ou partiellement et va empêcher le sang de circuler normalement à l'intérieur de la veine. Il faut savoir, qu'il y a deux types de phlébites, la phlébite superficielle, le caillot sanguin se forme dans une veine de surface, c'est souvent le cas des personnes qui ont déjà des varices, la phlébite profonde, ou le caillot dans la veine de la jambe peut se détacher, remonter dans les veines jusqu'au cœur, le traverser et atteindre les artères au niveau du poumon : c'est l'embolie pulmonaire ou la maladie thromboembolique veineuse (Belkheiri, 2010).

#### **IV.4.3.3. Traitement des thromboses**

Le traitement pharmacologique est primordial pour limiter les dommages des thromboses artérielles et veineuses, la récanalisation du vaisseau occlus et éviter une réocclusion précoce. Actuellement, il existe trois classes d'agents pharmacologiques antithrombotiques utilisables (Lemaoui, 2015) :

➤ Les antiagrégants (aspirine, clopidogrel, ticagrelor...) représentent à l'heure actuelle le traitement de référence des thromboses artérielles, mais les anticoagulants sont aussi recommandés en association avec les antiagrégants et les fibrinolytiques pour traiter les syndromes coronaires aigus et l'infarctus cérébral (Tlili, 2015).

➤ Les anticoagulants :

- Les héparines forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation (Manallah, 2012).
- Les antis vitamines K exercent leurs effets anticoagulants en inhibant le recyclage de vitamine K, ce qui conduit à la perte de l'activité enzymatique des facteurs vitamines K dépendants et par conséquent la ralentie de la vitesse de la coagulation (Mena, 2016).
- La classe des nouveaux anticoagulants sont actuellement utilisés à côté des anticoagulants classiques. Ces anticoagulants sont subdivisés selon leur mode d'action en deux catégories : les inhibiteurs indirects qui agissent en potentialisant l'activité de l'antithrombine III, et parmi les quelles, la fondaparinux et l'idraparinux et les inhibiteurs directs qui agissent directement sur le facteur Xa ou la thrombine, et parmi lesquelles, le DX-9065a, l'hirudine, L'argatroban...etc (Tlili, 2015).

➤ Les fibrinolytiques sont streptokinase, urokinase, activateur tissulaire de plasminogène...etc. Le but traitement fibrinolytique est de lyser le thrombus artériel ou veineux, ce traitement associé le plus souvent à un traitement antiagrégant et anticoagulant (Manallah, 2012).

## Chapitre II. Matériel et méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante, antibactérienne, antihémolytique et anticoagulante de l'extrait butanolique de la plante médicinale *Tetraclinis articulata*. La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie à l'université Abbes Laghrour - Khenchela- pendant le mois de mai 2018.

### I. Matériel

#### I.1. Matériel biologique

##### I.1.1. Matériel végétal

Il est constitué de l'extrait butanolique de la partie aérienne de la plante médicinale *T. articulata* (EBTA) récoltée dans la région de Zakor des environs de la wilaya de Mascara (ouest de la capitale Algérienne) en juin 2015 et identifiée par Belgharbi Benamer professeur à l'université de Mustapha Stambouli de Mascara et Righi Kada professeur à l'université d'Ibn Khaldoune de Tiaret.

##### I.1.2. Souches bactériennes

Afin de tester le potentiel antibactérien d'EBTA *in vitro*, cinq souches bactériennes ont été utilisés (Tableau 7).

**Tableau 7.** Souches utilisées dans l'activité antibactériennes.

| Microorganismes               | Gram    | Code       | Origine  |
|-------------------------------|---------|------------|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | Positif | ATCC 25923 | Laboratoire pédagogique de l'université Abbes Laghrour-Khenchela-                            |
| <i>Listeria monocytogenes</i> |         | ATCC 7644  |  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Négatif | ATCC 27893 |  |
| <i>Echerichia coli</i>        |         | ATCC 25922 |  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>  |         | ATCC 13182 | Institut de la Nutrition Alimentation et Technologie Agro Alimentaire (INATAA)- Constantine- |

##### I.1.3. Echantillons du sang

Six échantillons de sang ont été recueillis à partir de personnes saines pour l'évaluation de l'activité antihémolytique et anticoagulante d'EBTA.

## I.2. Médicaments

Quatre médicaments ont été utilisés comme contrôle positif pour l'évaluation des activités antibactérienne, antihémolytique et anticoagulante

- Les antibiotiques de pénicillines et d'ofloxacine (Optiflox) de concentration  $10^5$  UI et 3 mg respectivement pour l'activité antibactérienne ;
- Le médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI pour l'activité anticoagulante ;
- Le médicament antihémolytique « Dicynone » de concentration 250 mg pour l'activité antihémolytique.

## I.3. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits:  $\text{FeCl}_3$ , HCl, acide acétique, NaOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , KI,  $\text{I}_2$ , NaCl,  $\text{AlCl}_3$ , diméthyl sulfoxyde (DMSO), quercétine, méthanol, n-butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, toluène, acétone, éthanol, dichlorométhane, hexane ; proviennent tous de Sigma-Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Spectrophotomètre (spectrum SP-UV 2005), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (VILBER LOURMAT), Bain Marie (nüve bath, MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOGEX), Vortex (VELP), Balance analytique (OHAUS), Balance (KERN PCB), Centrifugeuses (EZ Swing 3K, Rotofix 32 A), Réfrigérateurs (Liebherr), Plaque chauffante (LabTech), Autoclave (Raypa) et pH mètre (Hanna instruments).

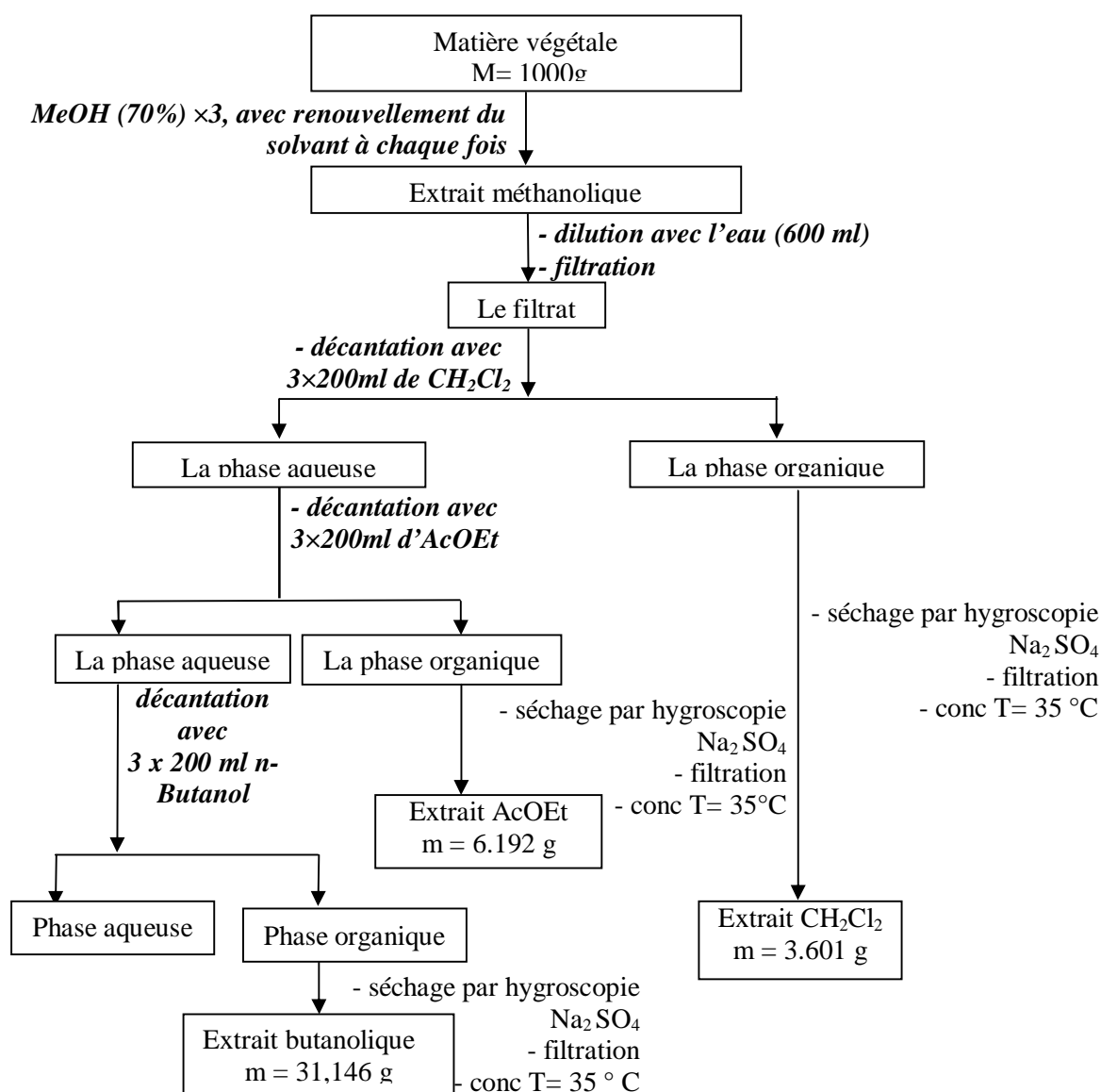
## II. Méthodes

Les différentes étapes réalisées dans cette étude sont : préparation de l'EBTA, étude qualitative par un screening phytochimique et un chromatographie sur couche mince, étude quantitative par le dosage des flavonoïdes, des flavonols et des tanins condensés, puis l'évaluation *in vitro* des activités antioxydante, antibactérienne, anticoagulante et antihémolytique d'EBTA.

### II.1. Préparation de l'extrait végétal

La partie aérienne (tiges, fleurs et feuilles) de la plante récoltée a été bien nettoyée et séchée à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil à température ambiante. Enfin, la plante sèche a été pulvérisée au broyeur pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

La méthode de Markham (Markham, 1982) était suivie pour l'extraction des flavonoïdes en utilisant des solvants organiques à polarité croissante. Suivant cette méthode ; 1000 g de la matière végétale obtenu est mise à une macération dans une solution de méthanol chaud (H<sub>2</sub>O : MeOH/ 30 : 70), cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, elle dure dans chaque fois 24 heures. L'extrait méthanolique a été concentré à sec, le résidu a été dissous dans de l'eau bouillante (600 ml). Après filtration, le résidu a été extrait successivement trois fois avec du dichlorométhane, acétate d'éthyle (AcOEt) et du n-butanol (3 x 200 ml) pour donner 3,601g ; 6,192 g et 31,146 g des résidus respectifs. Les solvants ont été évaporés et les résidus de chaque extrait ont été dissous dans de petits volumes de méthanol. Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 10.



**Figure 10.** Protocole d'extraction de l'espèce *Tetraclinis articulata* (Markham, 1982).

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée par l'utilisation de l'extrait butanolique de la plante.

## **II.2. Etude qualitative**

### **II.2.1. Screening phytochimique**

Il s'agit d'une étude qualitative visant la recherche des principales classes des flavonoïdes en se basant sur des réactions de coloration qui est provoquée par l'utilisation d'un réactif approprié et est due généralement à la formation d'une conjugaison ou d'une instauration dans une molécule (Daoudi et *al.*, 2015).

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'EBTA.

#### ➤ **Mise en évidence des flavonoïdes**

5 ml d'extrait ont été traités avec quelques gouttes d' $\text{AlCl}_3$  (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune qui est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (El-Haci et *al.*, 2012).

#### ➤ **Mise en évidence des anthocyanes**

2 ml d'extrait a été traités avec 2ml de HCl (2N) et quelques gouttes de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Un test positif est révélé par une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée (Mellouk, 2013).

#### ➤ **Mise en évidence des flavonols**

0,5 ml du HCl concentré ont été additionnés à 5 ml d'extrait. La couleur rouge pourpre après incubation dans un bain marie pendant 30 minutes, à température entre 80 – 90 C° indique la présence des flavonols (Guessoum et Lecheheb, 2015).

#### ➤ **Mise en évidence des flavones**

Quelques gouttes de KOH ont été ajoutées à un 1 ml d'extrait. La couleur orange indique la présence des flavones (Mellouk, 2013).

#### ➤ **Mise en évidence des flavonones**

Quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  ont été ajoutées à un 1 ml d'extrait. La couleur rouge violacé indique la présence des flavonones. Si le résultat est négatif cela indique la présence de chalcone ou isoflavone (Mellouk, 2013).

## II.2.2. Séparation chromatographique sur couche mince (CCM)

### II.2.2.1. Principe

La CCM repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation rechercher, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal -  $R_f$  - et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structure (Zeghad, 2009).

### II.2.2.2. Protocole de CCM sur gel de silice

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium 10x10cm. L'extrait est déposé à l'aide d'une micropipette (2  $\mu$ l) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque. Ensuite, les plaques ont été placées dans les cuves de développement dans les quelles se trouve un système de solvants approprié appelé phase mobile, à environ 0,5 cm de hauteur.

Différents systèmes de solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations (Tableau 8). Pour notre extrait, 15 systèmes de solvants ont été essayés, et 5 systèmes ont été réussis:

**Tableau 8.** Différents systèmes de solvants essayés et choisis pour la présente étude.

| <b>Systèmes</b>         | <b>Systèmes solvants</b>  | <b>Pourcentages</b> |
|-------------------------|---|---------------------|
| <b>Systèmes essayés</b> | Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau distille           | (100/11/11/26)      |
|                         | Butanol/acide acétique/eau distille                                   | (4/1/5)             |
|                         | Butanol/eau distillé/acide acétique glacial                           | (10/5/5)            |
|                         | Dichlorométhane/méthanol  | (5/2)               |
|                         | Acétate d'éthyle/acide acétique glaciale/ acide formique/eau distille | (100/11/11)         |
|                         | Butanol/acide acétique/eau distille                                   | (2/3/5)             |
|                         | Dichlorométhane/méthanol  | (90/10)             |
|                         | Toluène/acide d'éthyle/méthanol                                       | (5/3/1)             |
|                         | Acétate d'éthyle/chloroforme/acide acétique                           | (8/7/0,5)           |
|                         | Chloroforme/méthanol/eau distille                                     | (65/45/12)          |
| Chloroforme/méthanol    | (96/4)  |                     |

|                         |   |                |
|-------------------------|---|----------------|
|                         | Acétate d'éthyle/éther de pétrole                                     | (20/80)        |
|                         | Acétone/eau distille  | (1/1)          |
|                         | Acide acétique- eau distille  | (15/85)        |
|                         | Chloroforme/acétone/ammoniaque (10%)                                  | (80/40/18)     |
| <b>Systèmes choisis</b> | Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau distille           | (100/11/11/26) |
|                         | Butanol/acide acétique/eau distille                                   | (4/1/5)        |
|                         | Acétone/eau distillée   | (1/1)          |
|                         | Butanol/acide acétique/eau distille                                   | (2/3/5)        |
|                         | Acétate d'éthyle/acide acétique glaciale/ acide formique/eau distille | (100/11/11)    |

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 365 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les R<sub>f</sub>.

### II.2.2.3. Révélation

Après développement, les plaques ont été séchées, puis visualisées séparément par une lampe UV à 254 et 365 nm dans une chambre noire. Les rapports frontaux (R<sub>f</sub>) des spots issus de la séparation ont été calculés selon le rapport suivant:

$$R_f = d / D$$

d: Distance parcourue par la substance.

D: Distance parcourue par le solvant.

Ce facteur permet de mentionner une information préliminaire sur la structure des substances des flavonoïdes.

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité (Zeghad, 2009) :

- Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de R<sub>f</sub> (0,00-0,25) ;
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de R<sub>f</sub> comprises entre (0,3-0,5) ;
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de R<sub>f</sub> (0,5-0,75).

## II.3. Etude quantitative

### II.3.1. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes d'EBTA ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et *al.*, 1996) ; 1 ml de l'EBTA (préparé dans le méthanol pour avoir une concentration convenable) a été ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans l'EBTA a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-40 µg / ml, chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que l'EBTA servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g E) (Figure 11).

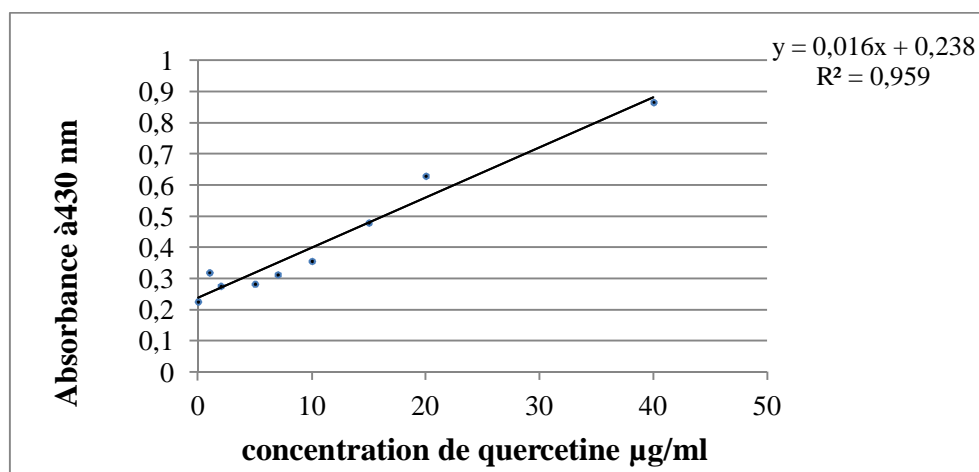


Figure 11. Courbe d'étalonnage de la quercétine.

### II.3.2. Dosage des flavonols

Le contenu des flavonols a été déterminé par la méthode décrite par Kumaran et *al.* (2007). Une quantité de 0,25 ml d'EBTA a été mélangée avec 0,25 ml d'AlCl<sub>3</sub> (2 mg/ ml) et 1,5 ml d'acétate de sodium (50 mg/ ml). L'absorbance à 430 nm a été enregistrée après 2,5 h.

La teneur en flavonols a été exprimée en milligramme (mg) équivalents de quercétine par gramme du poids d'extrait (mg QE/g E) (Figure 11).

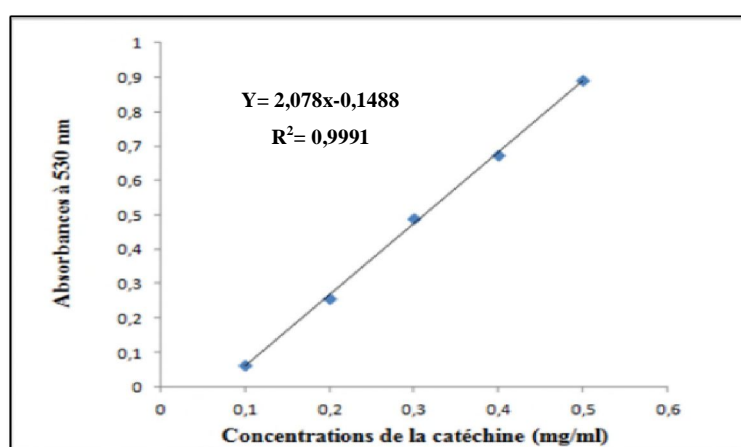
### II.3.3. Dosage des proanthocyanidines

La méthode butanol-HCl a été employée pour estimer la quantité des proanthocyanidines (Dérivé polymériques de flavan-3-ol) présents dans l'EBTA. Cette

méthode est basée sur la dépolymérisation catalysée par une hydrolyse acide des tanins condensés en anthocyanidines (Manolaraki, 2011).

1 ml de l'EBTA (préparé dans le méthanol pour avoir une concentration convenable) a été ajouté à 1 ml de Butanol-HCL (95/5). Après 15 minutes d'incubation à 95°C, l'absorbance a été lue à 530 nm.

La teneur en proanthocyanidines est déterminée à partir d'une équation de régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage réalisée avec la catéchine (Figure 12) et les résultats ont été exprimés en mg équivalents de catéchine par g d'extrait (Ben Chibane, 2013).



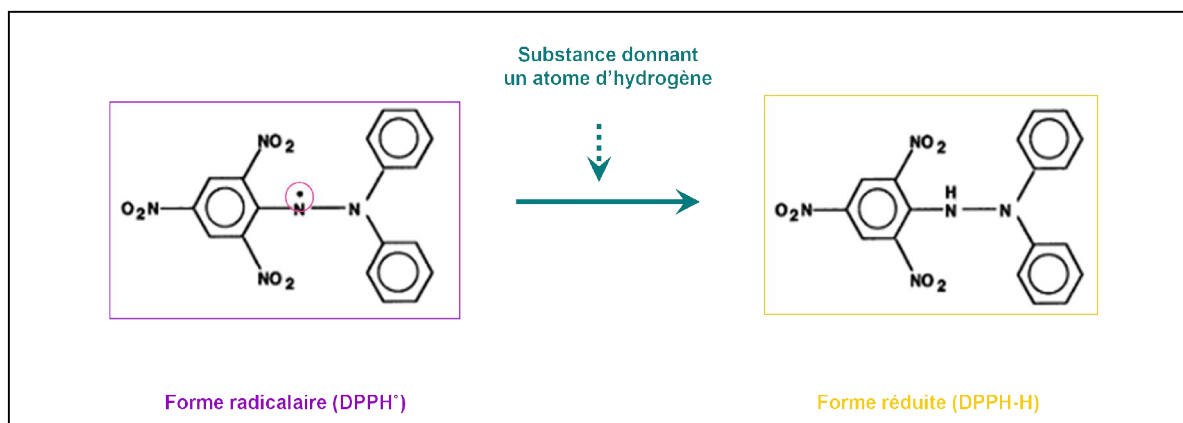
**Figure 12.** Courbe d'étalonnage de catéchine (Ben Chibane, 2013).

## II.4. Activités biologiques

### II.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante

#### II.4.1.1. Principe de l'essai

La capacité de l'extrait à piéger les radicaux libres a été déterminée par une méthode colorimétrique, simple et rapide; la méthode de Koleva (Koleva et *al.*, 2002) qui utilise le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) qui, à l'état stable, possède une coloration violette foncée qui absorbe à 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution en jaune pâle (Figure 13).



**Figure 13.** Réduction du DPPH<sup>•</sup> par un antioxydant (Molyneux, 2004)

#### II. 4.1.2. Réalisation de l'essai

Le DPPH<sup>•</sup> 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) a été solubilisé dans du méthanol absolu pour avoir une solution de 100µM. A partir d'une solution méthanolique mère de C<sub>1</sub>= 10 mg/ml de l'extrait, les dilutions suivantes ont été préparées : C2: 5 mg/ml, C3: 3 mg/ml, C4: 2 mg/ml, C5: 1mg/ml, C6: 0,5mg/ml.

A chaque volume de 1,5 ml de la solution méthanolique du DPPH<sup>•</sup>, un volume de 15 µl de chaque concentration préparée de l'extrait est ajouté. Après agitation et incubation à la température ambiante pendant 15 min, les densités optiques des mélanges réactionnels ont été mesurées par le spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions par le méthanol.

L'activité antioxydante est comparée à celle d'un flavonoïde commercial -la quercétine- qui est à son tour déterminée de la même façon que celle de l'extrait.

#### II.4.1.3. Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (% PI) et par la valeur d'IC<sub>50</sub> ;

- Le % PI du DPPH<sup>•</sup> a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ PI du DPPH}^{\bullet} = [(A_B - A_E) / A_B] \times 100$$

- L'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50 %) appelée aussi EC<sub>50</sub> (Efficient concentration 50), concentration de l'extrait ou du standard qui permet la réduction de 50 % de DPPH. L'IC<sub>50</sub> a été calculé graphiquement par le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait testé (Molyneux, 2004). Une courbe de régression linéaire ( $y = ax + b$ ) a été établie afin de calculer l'IC<sub>50</sub> qui permettra la

caractérisation du pouvoir antioxydant de l'extrait. Une faible valeur de l'IC50 indique une forte activité antioxydante (Saffidine, 2015).

#### II.4.2. Etude de l'activité antibactérienne

Dans cette partie, nous recherchons des composés antibactériens synthétisés par la plante médicinale *Tetraclinis articulata* connue pour leurs propriétés thérapeutiques. Nous avons utilisé la technique de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri en adaptant la méthode de disques décrite par Bauer et *al.* (1966).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'EBTA a été déterminée pour les souches montrant un effet positif.

##### II.4.2.1. Méthode des disques -Tests d'efficacité-

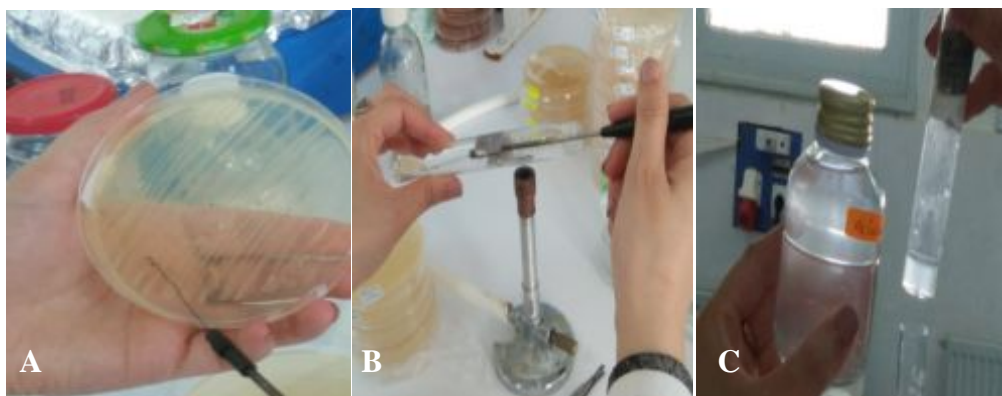
L'étude du pouvoir antibactérien de l'EBTA par cette méthode est identique à celui de l'antibiogramme.

##### A. Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) ont été repiquées par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

##### B. Préparation de l'inoculum

L'inoculum bactérien a été préparé dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à partir de culture pure de 24 h. La densité a été ajustée à 0.5 Mack Ferland (Annexe 1) (DO=0.08-0.10 lue à 625nm) (Figure 14).



**Figure 14.** Préparation de l'inoculum (A) : prélèvement d'une colonie, (B) : préparation de l'inoculum dans l'eau physiologique, (C): l'inoculum.

### C. Ensemencement

L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum. Les différentes étapes de l'ensemencement sont :

- Couler 20 ml de la gélose Muller-Hinton (Annexe 2) dans chaque boîte de pétri, et laisser solidifier.
- 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.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétri 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (Figure 15).



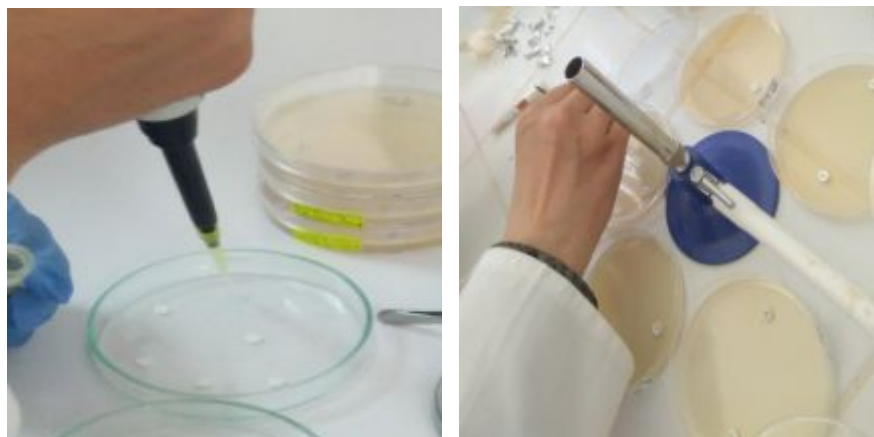
**Figure 15.** Méthode de l'ensemencement.

### D. Préparation des disques d'aromatogramme

Les étapes de préparation des disques d'aromatogrammes en présence de l'EBTA sont :

- Stériliser du papier Wattman n°3 coupé en disques de 6mm de diamètre à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes ;
- Imprégner les disques avec 10µl d'EBTA (100 mg/ml) repris dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) ;
- Préparer les disques de contrôle négatif imprégnés de diméthylsulfoxyde (DMSO) ;

- Des disques de pénicilline et d'ofloxacine ont été également utilisés comme antibiotiques de références (contrôle positif) pour déterminer la sensibilité de chaque souche bactérienne testée;
- Les disques imprégnés de l'EBTA sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Il en est de même pour les disques de contrôle (Figure 16).

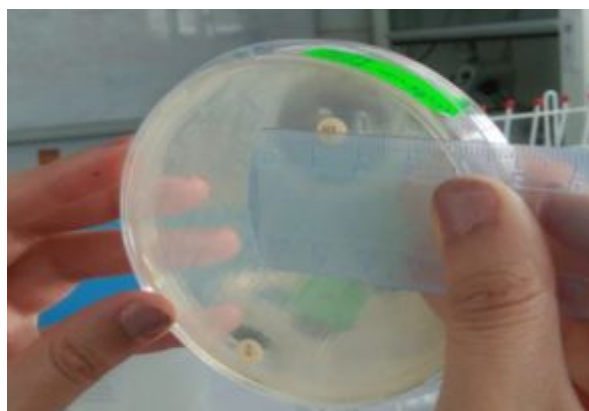


**Figure 16.** Préparation des disques d'aromatogramme.

### E. Incubation et lecture

Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) ont été mesurés autour des disques après une pré-incubation de 30 minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 (Figure 17).

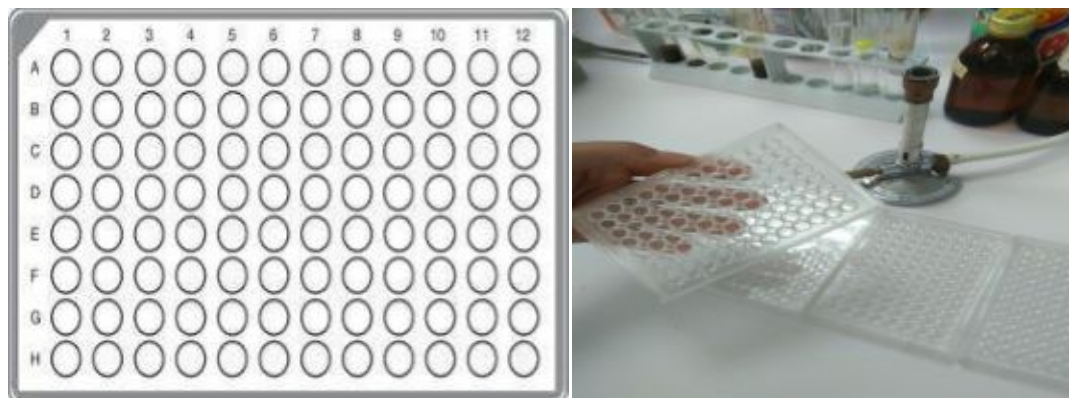
Les expériences ont été réalisées en deux répétitions et les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (standard déviation). La souche ayant un diamètre  $D < 8\text{mm}$ ,  $9 \leq D \leq 14\text{mm}$ ,  $15 \leq D \leq 19\text{mm}$ ,  $D > 20\text{mm}$  est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++).



**Figure 17.** Mesure de diamètres des zones d'inhibition.

#### II.4.2.2. Détermination de la concentration Minimale inhibitrice (CMI)

La CMI a été déterminée en utilisant la technique de micro-dilution avec le bouillon Muller Hinton par des microplaques à fond en U (Figure 18) (Oussou et *al.*, 2004).



**Figure 18.** Plaque 96 puits pour la détermination la CMI.

La CMI de l'EBTA a été déterminée selon le protocole suivant :

- 90 µl de bouillon Muller Hinton ont été répartis dans tous les puits de la microplaque;
- 100 µl d'EBTA de concentration 100 mg /ml ont été distribué dans les premiers puits de la microplaque (A1, A2, A3) puis effectuons les dilutions successives (100 µl de A1 dans B1 et ainsi de suite) préciser les dilutions.
- Les microplaques ont été inoculées avec de 10 µl de la suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (diluée au 1/10ème) pour obtenir un volume final de 200 µl ;
- Les puits A6, A7, A8 et A9 ont été réservés pour les antibiotiques (contrôles positifs) ;
- Les puits A11 et A12 représentent respectivement le témoin de culture des bactéries et le témoin de stérilité du milieu de culture MH (contrôles négatifs) ;
- Les microplaques préparées ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, la croissance bactérienne (traduit par une turbidité) a été examiné dans chaque puits ;

La CMI d'un EBTA vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe (Bolou et *al.*, 2011).

#### II.4.2.3. Synergie entre l'EBTA de plante et les antibiotiques

L'effet synergique de l'extrait avec les antibiotiques a été évalué par la méthode de diffusion des disques décrite précédemment. Des disques d'antibiotique ont été imprégnés par 10 µl d'EBTA, ensuite déposés délicatement sur la gélose MHensemencé

préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurés en mm (Saffidine, 2015).

Les zones d'inhibition observées pour les combinaisons ont été comparées à la moyenne des zones d'inhibition pour les antibiotiques testés seul. Une différence significative ( $\geq 5\text{mm}$ ) montre un effet synergique (Saffidine, 2015).

### **II.4.3. Evaluation de l'activité antihémolytique *in vitro***

L'effet antihémolytique de l'EBTA a été réalisé selon la méthode de Yang *et al.* (2005) :

#### **II.4.3.1. Préparation des globules rouges**

5 ml de sang d'une personne saine ont été recueillis dans des tubes traités à l'EDTA, puis centrifugés pendant 5 min à 1000 tr/min.

Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé trois fois avec du tampon phosphate saline (PBS) (0,2 M et pH 7,4) (Annexe 3) puis remis en suspension dans une solution saline (4 %).

L'opération de lavage a consisté en une série de centrifugation à 1000 tr/min pendant 5 min de la suspension du culot dans le PBS.

Après la dernière centrifugation, 0,4 ml du culot ont été additionné à 9,6 ml de tampon phosphate saline (0,2 M à un pH de 7,4) pour obtenir une solution érythrocytaire d'hématocrite à 4%.

#### **II.4.3.2. Préparation de l'extrait**

Différentes concentrations de l'EBTA (1 mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25 mg/ml) ont été préparés dans le PBS.

#### **II.4.3.3. Protocole expérimentale**

Les différentes étapes de l'essai sont :

- Mettre dans des tubes 1 ml de la solution érythrocytaire préparée avec 0,5 ml de l'EBTA (dilué avec le PBS) à différentes concentration initiales ;
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 20 min ;
- Ajouter 0,5 ml de la solution de NaCl (2 %) dilué avec le PBS au mélange réactionnelle ;
- Centrifuger les tubes à 1000 tr/min pendant 10 min ;
- Récupérer le surnageant ;

- Lire l'absorbance du surnageant (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre ;
- L'hémolyse relative a été évalué en comparaison avec l'hémolyse induit par NaCl en absence d'EBTA (contrôle négatif).
- Un médicament antihémodolytique (Dicynone 250 mg) dissout dans le tampon PBS et en absence d'EBTA a été utilisé comme contrôle positif.
- Chaque série d'expérience a été effectuée en triplicata et le % d'inhibition de l'hémolyse par l'EBTA a été calculé.

#### **II.4.3.4. Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule suivante (Miki et *al.*, 1987) :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_c - A_{\text{ext}}/A_c)100$$

**A<sub>c</sub>**: absorbance du control négatif.

**A<sub>ext</sub>**: absorbance de l'extrait.

#### **II.4.4. Evaluation de l'activité anticoagulante *in vitro***

L'activité anti coagulante de l'EBTA a été évalué *in vitro* vis-à-vis la voie exogène et endogène de la coagulation, et ceci sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de 2 tests globales et chronométriques, le temps de Quick (TQ) ou nommé également Taux de Prothrombine (TP), et le Temps de Céphaline Kaolin (TCK).

##### **II.4.4.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaquettés**

Le pool plasmatique déplaquettés est un mélange de plasma déplaquettés des volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables.

Le sang de chaque volontaire a été prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur en solution anti coagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 3 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes.

##### **II.4.4.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène**

L'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène de la coagulation a été évalué en utilisant un test de coagulation de Quick (TK) ou le temps de prothrombine (TP) qui permet une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation (Brummel et *al.*, 2002).

### **A. Principe de l'essai**

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine). Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'EBTA exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

### **B. Protocole expérimentale**

Effet de l'EBTA sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon les étapes suivantes; 10 µl de l'EBTA (0,5 mg/ml) préparé dans le DMSO ont été additionné à 90 µl du plasma standard, le mélange a été incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200 µl de thromboplastine pré incubé à 37 °C pendant 15 min. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide du chronomètre.

#### **II.4.4.3. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène**

Le test du temps de Céphaline Kaolin (TCK) est un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de voie endogène.

### **A. Principe de l'essai**

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'EBTA exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

### **B. Protocole expérimentale**

L'effet de l'EBTA sur la voie endogène de la coagulation a été évalué selon les étapes suivantes :

10 µl de l'EBTA (0,5 mg/ml) préparé dans le DMSO ont été additionné à 90 µl du plasma pauvre en plaquettes qui est ensuite incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, 100 µl d'une solution de céphaline Kaolin ont été additionnés puis le mélange est réincubé à 37 °C pendant 3 min et la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100 µl d'une solution aqueuse de 0,025 M CaCl<sub>2</sub>.

Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide du chronomètre.

Un médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI dissout dans le DMSO a été utilisé comme contrôle positif.

### **II.4.5. Analyse statistique**

Toutes les expériences ont été faites en triple sauf pour étude de l'activité antibactérienne qui a été faite en doublet. Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  (déviation standard (n=3)).

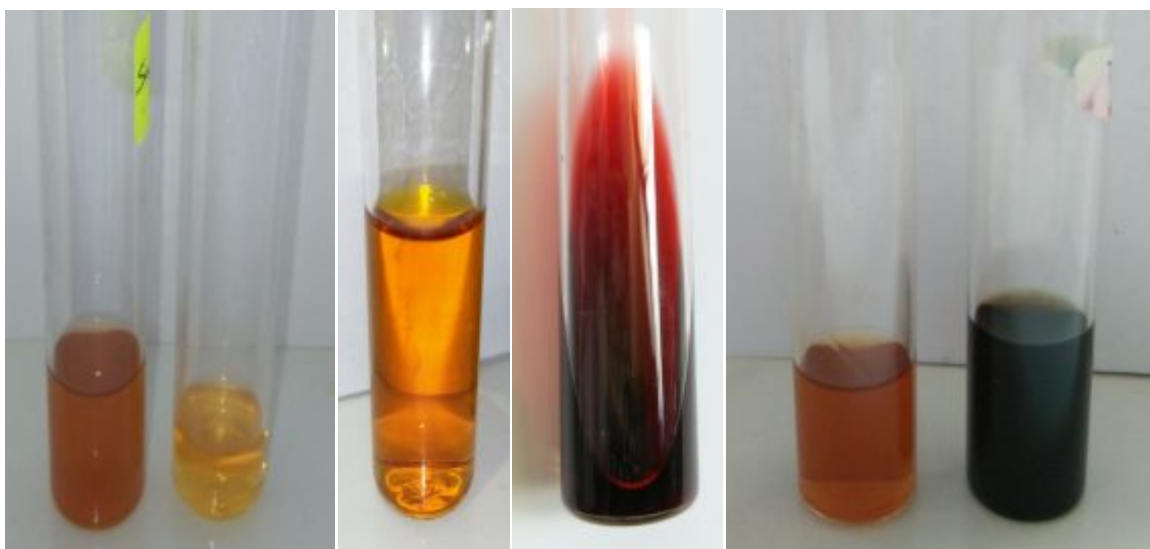
## Chapitre III. Résultats et discussion

### I. Résultat de l'étude qualitative

#### I.1. Résultat de tests phytochimiques

Dans le but de rechercher les différentes classes des flavonoïdes dans l'extrait butanolique *Tetraclinis articulata*, nous avons effectuée un screening phytochimiques par la mise en évidence d'un ensemble des réactions de caractérisation de différents composés flavonoïques à savoir : flavonoïdes, flavonols, flavonones, flavones et anthocyanes.

Les résultats de l'examen phytochimique de ces métabolites sont représentés dans la figure 19 et le tableau 9.



Témoignage T. Anthocyane T. Flavonoïdes T. Flavonols T. Flavone T. Flavonone

**Figure 19.** Résultats des tests phytochimiques sur l'extrait de *Tetraclinis articulata*.

**Tableau 9.** Résultats des tests phytochimiques sur l'extrait butanolique de *T. articulata*.

| Classes recherchées | Résultat trouvé |
|---------------------|-----------------|
| Flavonoïdes         | +++             |
| Flavonoles          | +++             |
| Flavone             | ++              |
| Flavonone           | -               |
| Anthocyane          | +               |

Les résultats sont interprétés comme suit : (-) : test négatif ; (+) : test faiblement positif ; (++) : test positif ; (+++) : test fortement positif.

Les essais phytochimiques effectuées sur L'EBTA ont révélé la présence des flavonoïdes, flavonols, flavones et anthocyane. Ce qui est en accord avec les travaux des Abi-Ayad, (2009) et Zarrouki, (2009) et différent de ce qui a été rapporté par Elalaoui, (2015). Ces résultats pourraient être expliqués par la variation de facteurs écologiques, environnementaux et même génétiques (Achache, 2017).

Il est important de noter que c'est la première identification des flavonols et des flavones pour la plante de *Tetraclinis articulata*.

La présence de ces métabolites permet de justifier l'utilisation de *Tetraclinis articulata* comme substance antihépatotoxique, anti-allergique, antioxydant, anti-inflammatoire, antivirale, anti-tumorale, anticancéreuse et anti-spasmodique (Dohou et al., 2004 ; Zoughlache, 2009 ; Nsemi Muanda, 2010 ; Hamza et al., 2015).

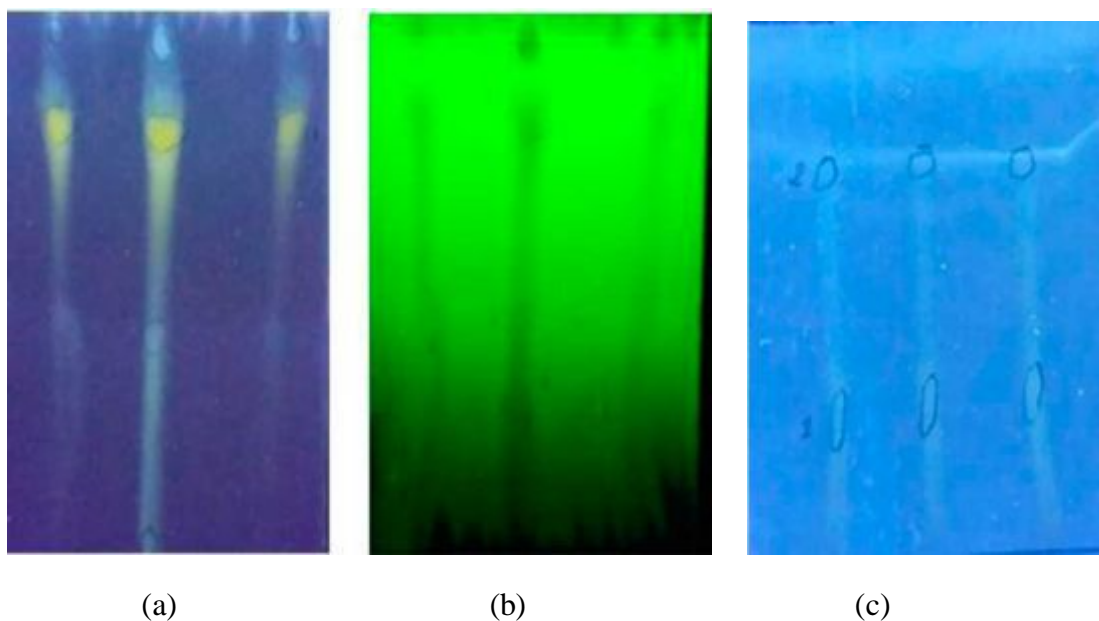
## **I.2. Résultats de l'étude qualitative par CCM**

L'analyse qualitative de contenu phénolique par l'utilisation de CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavonoïques d'EBTA. L'identification des composés été basées sur la comparaison des Rf's et des couleurs observés sous lampes UV des taches apparus sur CCM.

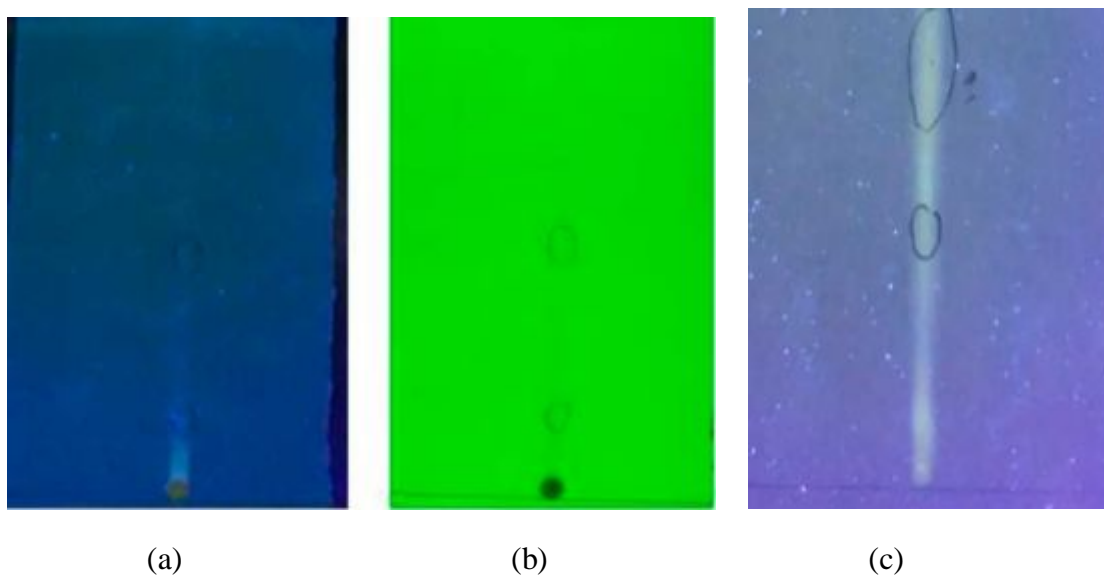
Nous avons réalisé la séparation de l'EBTA avec les systèmes de solvants suivants :

- Système 1 : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau distille (100/11/11/26) ;
- Système 2 : butanol/acide acétique/eau distille (4/1/5) ;
- Système 3 : acétate d'éthyle/acide acétique glaciale/ acide formique/eau distille (100/11/11) ;
- Système 4 : butanol/acide acétique/eau distille (2/3/5) ;
- Systems 5 : acétone/eau distillée (1/1).

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 20 et 21 et le tableau 10.



**Figure 20.** Photo de Chromatogramme résultant de l'analyse de l'EBTA par CCM sur gel de silice par le système de solvant 1: (a) à 365 nm et (b) à 254 nm et le système de solvant 2 : (c) à 365 nm.



**Figure 21.** Photo de Chromatogramme résultant de l'analyse de l'EBTA par CCM sur gel de silice par le système de solvant 3: (a) à 365 nm et (b) à 254 nm et le système de solvant 5: (c) à 365 nm.

**Tableau 10.** Résultats de la CCM de l'EBTA.

| Systèmes  | Longueur d'onde (nm) | Couleur sous UV        | Rf (cm) | Constituants possibles  | Figure | Références  |
|-----------|----------------------|------------------------|---------|---|--------|---|
| Système 1 | 254                  | Marron claire          | 0,81    | - Flavones<br>- Flavone méthyle,<br>Hydroxy flavonol  | 20 (b) | Kholkhal, (2014)<br>Mamyrbekova-Bekro et <i>al.</i> , (2013)            |
|           | 365                  | Jaune orange           |         | 20(a)   |        |   |
|           | 254                  | Marron foncé           | 0,93    | Flavone méthyle<br>Hydroxy flavonol   | -      | Mamyrbekova-Bekro et <i>al.</i> , (2013)                                |
|           | 365                  | Jaune orange           |         | -   |        |   |
| Système 2 | 365                  | Jaune orange           | 0,2     | Flavones  | 20 (c) | Kholkhal, (2014)  |
|           |                      | Jaune                  | 0,54    | Flavonols   | -      | Madjour, (2014)   |
| Système 3 | 365                  | Mauve foncé            | 0,15    | flavanones  | 21 (a) | Said et <i>al.</i> , (2016) ; Belfadel, (2013)                          |
|           | 254                  | Marron foncé           | 0,78    | -Dihydroflavonol,<br>Chalcones, Flavones 5-<br>OH et 4' OH, Flavones<br>3-OR, Flavones 6 ou 8<br>OH, flavanones<br>-flavone méthyle | 21(b)  | Said et <i>al.</i> , (2016)<br>Mamyrbekova-Bekro et <i>al.</i> , (2013) |
|           | 365                  | Violet                 |         | -   |        |   |
| Système 4 | 365                  | Jaune vert             | 0,67    | Aurone ; Kaempférol   | -      | Belfadel, (2013) ; Meziti, (2009)                                       |
|           |                      | Bleu blanc fluorescent | 0,77    | Flavonols, flavones,<br>isoflavones, flavanones   | -      | Said et <i>al.</i> , (2016)   |
| Système 5 | 365                  | Jaune                  | 0,41    | flavonols   | 21 (c) | Kholkhal, (2014) ; Belfadel, (2013)                                     |

Le tableau 10 représente les Rf des différents composés apparus avec les différents systèmes solvants utilisés, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV pour EBTA. Un ensemble des spots a été obtenu par les différents systèmes solvants utilisés ; avec plus de composés (quatre composés) par les systèmes 4 (butanol/acide acétique/eau distille à 2/3/5), trois composés ont été ségrégués des dépôts de l'extrait par le système de solvant 3 (acétate d'éthyle/acide acétique glaciale/ acide formique/eau distille à 100/11/11), par contre le système 2 (butanol/acide acétique/eau distille à 4/1/5) et 4 (butanol/acide acétique/eau distille à 2/3/5) ont donné deux spots, alors que le cinquième système (acétone/eau distillée à 1/1) n'a pu séparer qu'un seul composé.

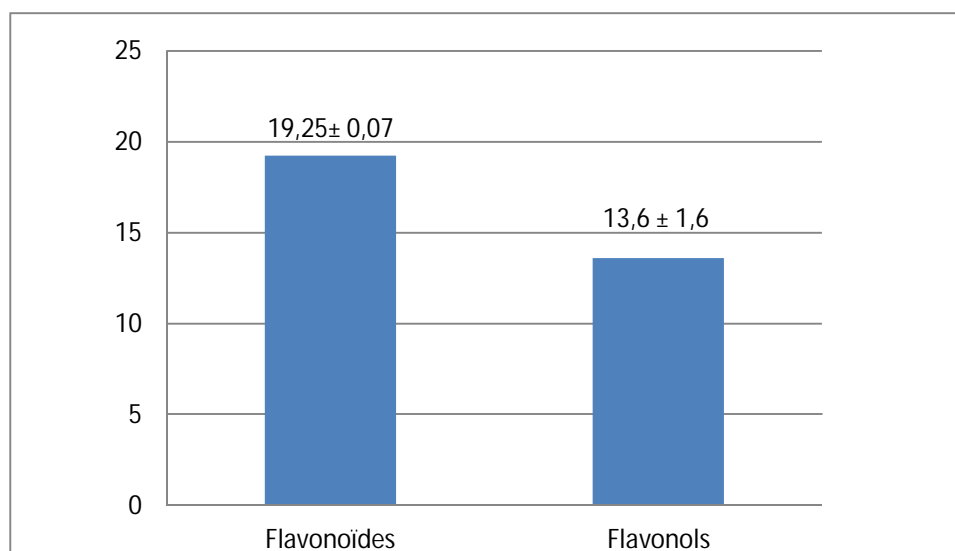
La CCM nous a permis de contrôler la qualité de notre extrait, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis. Elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de notre extrait (fluorescence, coloration et facteurs de rétention).

D'après la littérature (mentionné dans le tableau 10), les couleurs des spots et leurs Rf nous ont permis de déduire que L'EBTA est majoritairement composé de flavonols et flavones.

## **II. Résultats de l'étude quantitative**

### **II.1. Dosage des flavonols et des flavonoïdes de l'EBTA**

Un dosage spectrophotométrique avec du trichlorure d'aluminium a été effectué à partir d'extrait butanolique de la partie aérienne de *Tetraclinis articulata* afin de déterminer la teneur en flavonoïdes et en flavonols. Une courbe d'étalonnage a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine à différentes concentrations. Des mesures de densité pour l'extrait ont été réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes et des flavonols correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait (Figure 22) et déterminées par l'équation :  $Y = 0,016x + 0,238$  ( $R^2 = 0,959$ ).



**Figure 22.** Résultats de dosages de flavonoïdes et flavonols.

Les résultats des dosages en flavonols et flavonoïdes, exprimés en mg équivalent quercétine par g extrait montrent que EBTA a permis d'enregistrer une teneur de  $13,6 \pm 1,6$  et  $19,25 \pm 0,07$  mg EQ/g E respectivement pour les flavonols et les flavonoïdes.

Il est important de noter que c'est la première quantification des flavonols pour la plante de *T.articulata*.

Tigrine et Moudache, (2013) ont prouvé que la teneur en flavonols varie selon la nature de l'organe de la plante concerné par l'étude.

Le résultat du dosage des flavonoïdes dans notre étude est supérieure par rapport à celle rapporté par Kerbouche, (2010) qui a révélé une teneur de l'ordre de 18 mg EQ/ gE. Alors que Rached, (2009) a rapporté une teneur largement supérieure à celle de la présente étude qui est égale à 48,73 mg EQ/ g E.

La différence de la teneur en flavonoïdes est due peut être aux conditions de croissance de la plante, comme le sol, le lieu géographique, conditions de développement de l'organe, degré de maturité, et les différences génétiques (Tigrine et Moudache, 2013), à savoir aussi la méthode d'extraction et la nature de solvant utilisé (Mellouk, 2013).

Il a été montré que les flavonoïdes agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes ; tel que l'anion peroxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes. Les données de la littérature montrent aussi une mise en évidence de certains rapports entre la structure flavonique et l'activité antioxydante (Ababsa, 2017).

Cette valeur considérable en flavonoïdes serait responsable de leurs propriétés analgésiques, antifongiques, antimicrobiennes, hémostatiques, aphrodisiaques et astringente (Kabran Guy et *al.*, 2012).

## **II.2. Dosage des tannins condensés de l'EBTA**

La teneur en tannins condensés a été effectuée au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de butanol-HCl. La catéchine a été utilisée comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 530 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:  $Y = 2,078 x - 0,1488$  ( $R^2 = 0,9991$ ).

Les résultats des teneurs en proanthocyanidines, exprimés en mg équivalent catéchine par g extrait montrent que l'EBTA représente une quantité de  $2246,56 \pm 5,20$  mg EC/g E qui a été dosé pour la première fois pour cette plante.

La teneur en proanthocyanidines varie à la fois à la nature de l'organe concerné par l'étude qui sont localisé principalement dans les feuilles, et aussi à la nature du solvant d'extraction (Tigrine et Moudache, 2013 ; Beddou, 2015).

D'après le résultat obtenu de l'examen phytochimique quantitatif, *Tetraclinis articulata* est riche en tanins condensés qui sont connus par leurs effets astringents, anti-diarrhéiques, diurétiques, hémostatiques, antioxydants, anti-inflammatoires et antimicrobiens. Ce résultat est conforme au travail réalisé par Abdelli, (2017).

## **III. Evaluations des activités biologiques**

### **III.1. Evaluation de l'activité antioxydante de l'EBTA**

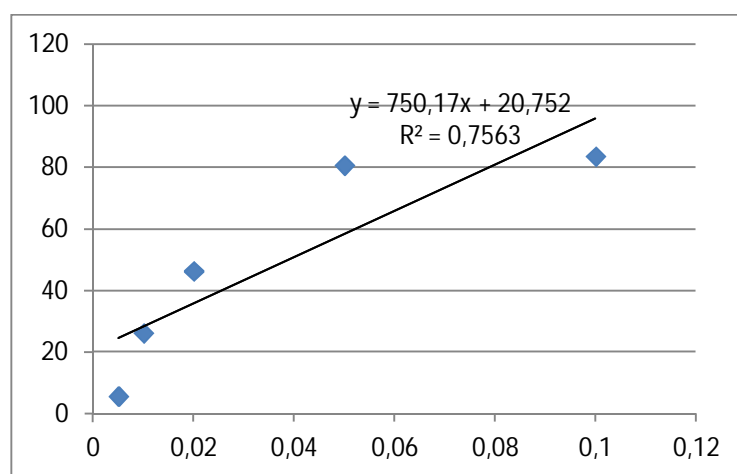
L'activité antioxydante de l'EBTA vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

En faisant varier la concentration de l'extrait et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI %), nous avons établi le profil d'activité oxydante, et c'est à partir de ce profil que nous avons déduit également la valeur correspondante à la IC<sub>50</sub>.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 11 et la figure 23.

**Tableau 11.** Pourcentages de la réduction du radical DPPH° de l'EBTA.

| Concentrations initiales en (mg/ml) | Concentrions dans le mélange réactionnel en (mg/ml) | (%) de réduction de EBTA |
|-------------------------------------|---|--------------------------|
| 10                                  | 0,1   | 83,58±0.72               |
| 5                                   | 0,05  | 80,68±1.18               |
| 2                                   | 0,02  | 46,35±1.03               |
| 1                                   | 0,01  | 26,23±2,09               |
| 0,5                                 | 0,005   | 5,71±0.08                |

**Figure 23.** Courbe présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait.

Le profil de l'activité antioxydante obtenu révèle une augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) en fonction des concentrations de l'extrait de *T. articulata*. A la plus faible concentration (0,005 mg/ml), l'extrait a présenté un PI de 5,71 % tandis qu'à la plus grande concentration (0,1 mg/ml), le PI a atteint 83,58 %. Ceci montre que l'espèce *T. articulata* possède un grand potentiel antioxydant.

A partir de la courbe illustrée dans la figure 23, nous pouvons calculer la concentration IC<sub>50</sub> pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant. Nous constatons une concentration d'IC<sub>50</sub> égale à 0,04 mg/ml.

Bourkhiss et *al.*, (2010), ont démontré une bonne efficacité antioxydante en enregistrant une valeur d'IC<sub>50</sub> identique à celle trouvée dans la présente étude.

Nos résultats se montrent plus efficaces par rapport à l'étude de Houari et Slimani, (2013) qui ont enregistré un PI plus de 70 % à la concentration de 0,21 mg/ml d'extrait et

une  $IC_{50}$  à l'ordre de 0,072 mg/ml. Aussi pour l'étude de Ladhem (2016), qui a constatée que les extraits des collectes de 2013 et 2016 ont exercé un effet antioxydants en enregistrant des taux maximaux respectifs de l'ordre de 75 et 90 % à la concentration de 2,7 mg/ml et en enregistrant des  $IC_{50}$  respectifs de 1,5875 et 0,4439 mg/ml.

Cependant, Ben Jemiaa et *al.* (2013), dans une étude réalisée sur thuya de la Tunisie, a révélé une efficacité à piéger le radical DPPH avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de 0,005 mg/ml. Sliti et *al.* (2016) ont constaté aussi une forte activité antioxydante (60,2 %) vis à vis du radical DPPH en enregistrant un  $IC_{50}$  de l'ordre de 0,023 mg/ml.

Kerbouche (2010) a trouvée que l'extrait à la plus faible concentration (0,005 mg/ml) a présenté un PI de 8,20 % alors qu'à la plus grande concentration (0,1 mg/ml), le PI a atteint 89,17 %. L' $IC_{50}$  est enregistré à 0,01 mg/ml.

Cette grande activité antioxydante de l'extrait peut être expliquée par leur forte teneur en flavonoïdes qui sont considérés comme d'excellents antioxydants dont les propriétés oxydo-réducteurs leurs permettent d'agir comme les agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et inhibiteurs de l'oxygène singulet et triplet (Kerbouche, 2010).

La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres s'explique par leurs structures chimiques comportant un nombre important d'atomes d'hydrogène, des groupement hydroxylés, des noyaux phényles qui seraient capables de capter les radicaux libres en démobilisant leurs électrons célibataires (Calliste et *al.*, 2001 ; Wojdylo et *al.*, 2007 ; Zeghad, 2009).

En outre des flavonoïdes, des corrélations très hautement significative sont aussi trouvées entre l'activité antiradical DPPH et les teneurs en proanthocyanidines, flavonols et les orthodiphénols avec un même coefficient de corrélation ( $r = 0,99$ ). Cette confirmation a été reportée par plusieurs auteurs (Montoro et *al.*, 2006 ; Ben Chibane, 2013 ; Mellouk, 2013).

## **III.2. Evaluation de l'activité antibactérienne**

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'EBTA se fait par l'antibiogramme, la détermination de la CMI et la synergie avec les antibiotiques.

### III.2.1. Résultats de l'antibiogramme

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien d'EBTA par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

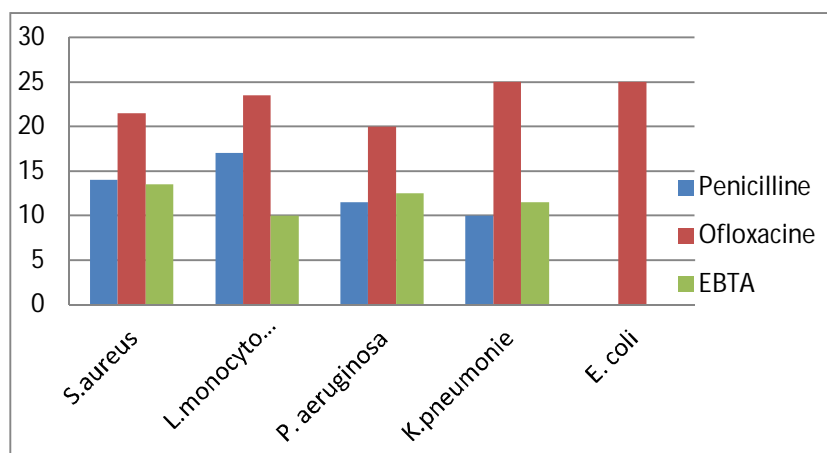
L'activité antibactérienne a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait vis-à-vis de cinq germes pathogènes après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Les résultats de l'antibiogramme effectué sont représentés dans le tableau 12 et les figures 24, 25 et 26.

**Tableau 12.** Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne.

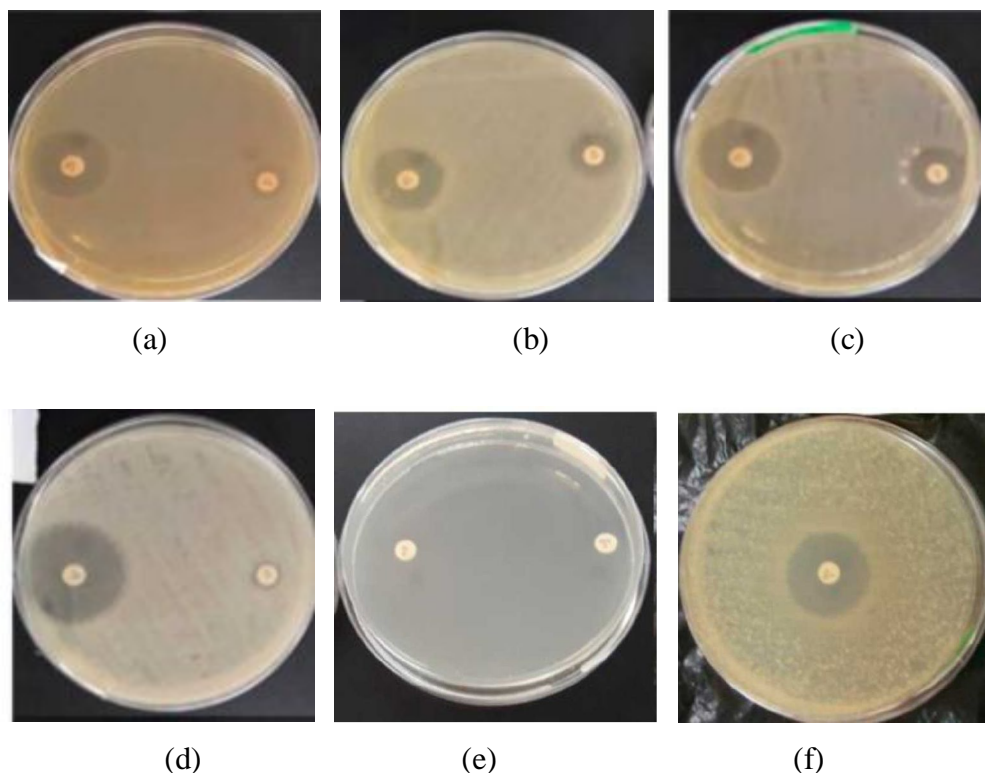
| Souches bactériennes          | Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne (mm) |                |      |      |
|-------------------------------|---|----------------|------|------|
|                               | EBTA 10mg/ml  | EBTA 100 mg/ml | OFLO | PENI |
| <i>Escherichia coli</i>       | PA  | -              | +++  | -    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | PA  | ++             | +++  | +    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | PA  | +              | +++  | +    |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | PA  | +              | +++  | ++   |
| <i>Klebsiela oxytoca</i>      | -   | +              | +++  | +    |

Diamètre :  $D < 8\text{mm}$ ,  $9 \leq D \leq 14\text{mm}$ ,  $15 \leq D \leq 19\text{mm}$ ,  $D > 20\text{mm}$  est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++). PA : pas d'activité.



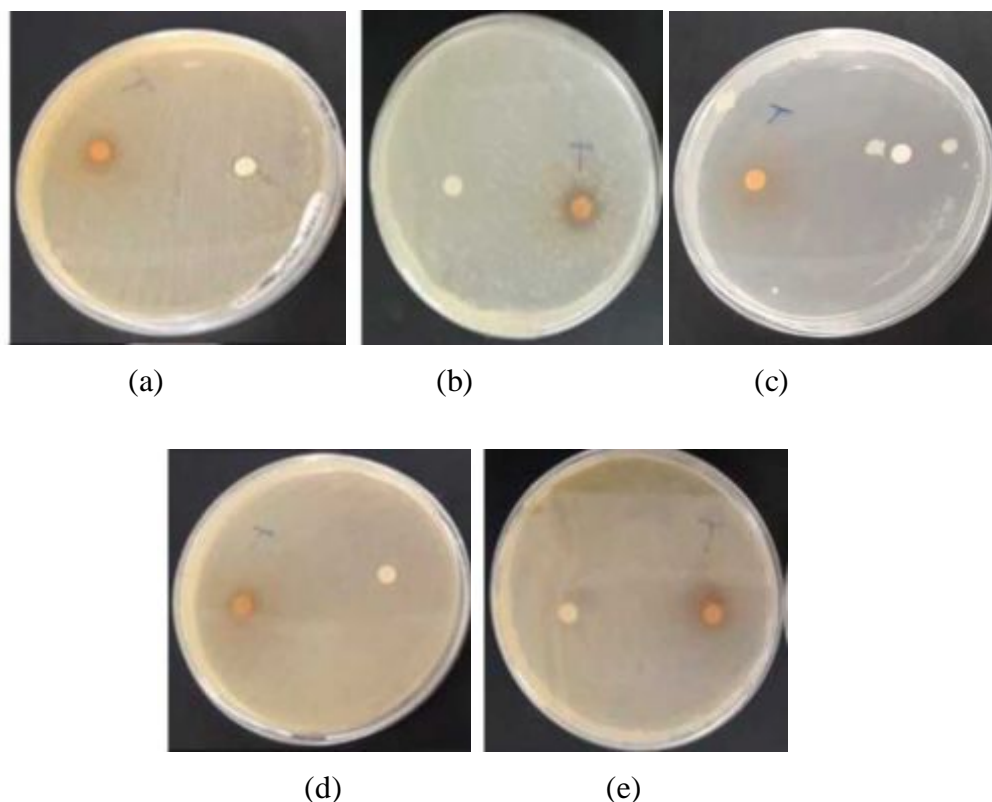
**Figure 24.** Résultats de l'antibiogramme de l'EBTA.

Les résultats du tableau 12 et la figure 24 révèlent que le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) se change selon la souche bactérienne utilisé. On note une sensibilité extrême des souches vis-à-vis l'ofloxacin, une sensibilité modère vers la pénicilline sauf pour l'*E.coli* car elle a une résistance naturelle et acquise vers la pénicilline (figure 25) (Archambaud, 2009).



**Figure 25.** Photo d'antibiogramme de pénicilline et ofloxacin sur *k.Pneumonie* (a), *L.monocytogene* (b), *P.aeruginosa* (c), *S.aureus* (d) et *E.coli* (e,f).

Aucune activité antibactérienne n'a été remarquée à la concentration de 10 mg/ml d'EBTA qui peut être expliqué par l'insuffisance de la concentration des principes actifs dans le volume d'extrait étudiées (figure 26) (Ladhem, 2016). Par ailleurs, à la concentration de 100 mg/ml, l'activité est importante pour toutes les souches étudiées sauf pour l'*E.coli* qui a été montré résistante.



**Figure 26.** Photo d'antibiogramme d'EBTA à 100 mg/ml sur *P.aeruginosa* (a), *S.aureus* (b), *E.coli* (c), *L.monocytogene* (d) et *k.Pneumonie* (e).

Il en ressort donc que EBTA agit différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, qu'il peut avoir une action très importante sur un germe (la sensibilité élevée de *Pseudomonas aeruginosa*) ou une action moindre, voire même nulle sur un autre (la résistance d'*Escherichia coli*).

La sensibilité des souches utilisées traduit l'action antibactérienne des flavonoïdes. En fait, cette sensibilité est en relation avec le nombre des hydroxyles libres (Zeghad, 2009). Cowan (1999) supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus.

Notre extrait butanolique est constituée principalement des flavonoïdes, qui sont théoriquement pourraient exercer des effets antibactériens important puisqu'ils sont des inhibiteurs puissants *in vitro* de l'ADN gyrase (Akroum, 2011 ; Madjour, 2014), donc l'ADN est incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement, donc les mécanismes de résistance qui reposent sur différents facteurs génétiques deviennent inactifs (Akroum, 2011 ; Paulette et al., 1998).

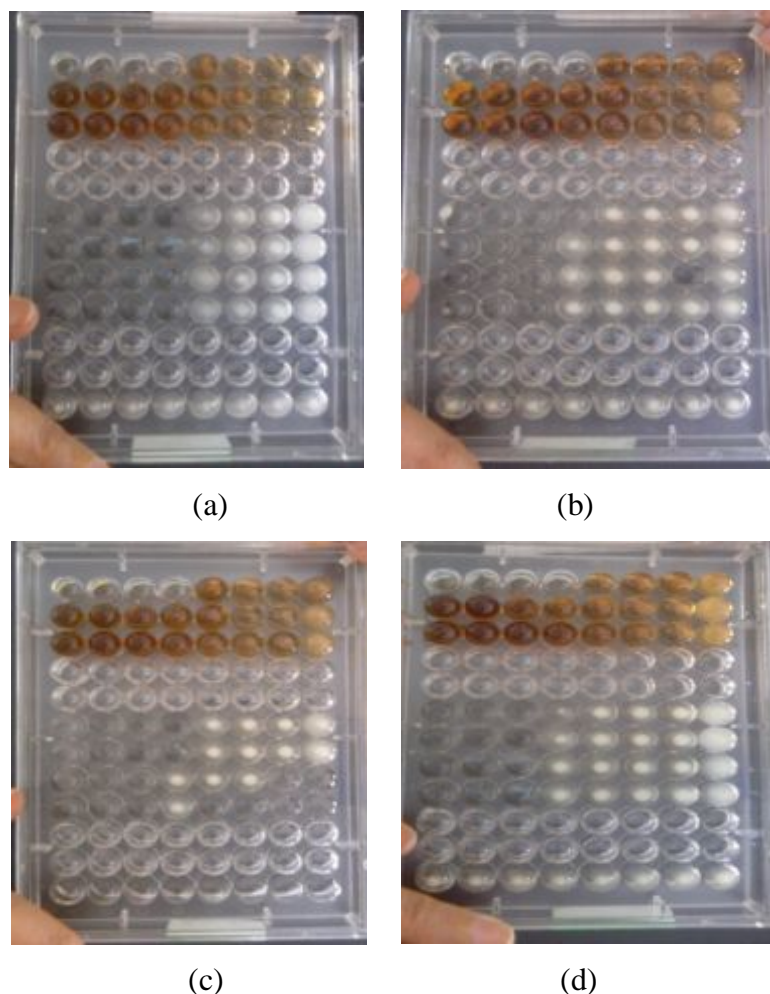
L'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être expliquée aussi par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou et *al.*, 2005).

### III.2.2. Détermination de concentrations minimale inhibitrice (CMI)

L'efficacité de l'EBTA sur les souches bactériennes sensibles (*P.aeruginosa*, *S.aureus*, *L.monocytogene* et *k.Pneumonie*) a été déterminée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats sont rapportés dans le tableau 13 et la figure 27.

**Tableau 13.** Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques et de l'EBTA.

| Souches bactériennes  | Antibiotiques et l'extrait | concentration (mg/ml) |    |    |   |     |      |       |        |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----|----|---|-----|------|-------|--------|
|                       |                            | 40                    | 20 | 10 | 5 | 2,5 | 1,25 | 0,625 | 0,3125 |
| <i>P. aeruginosa</i>  | Peni                       | -                     | -  | -  | - | +   | +    | +     | +      |
|                       | Oflo                       | -                     | -  | -  | + | +   | +    | +     | +      |
|                       | EBTA                       | -                     | -  | -  | - | +   | +    | +     | +      |
| <i>L.monocytogène</i> | Peni                       | -                     | -  | -  | - | +   | +    | +     | +      |
|                       | Oflx                       | -                     | -  | -  | - | -   | +    | +     | +      |
|                       | EBTA                       | -                     | -  | -  | - | +   | +    | +     | +      |
| <i>S.aureus</i>       | Peni                       | -                     | -  | -  | - | +   | +    | +     | +      |
|                       | Oflx                       | -                     | -  | -  | + | +   | +    | +     | +      |
|                       | EBTA                       | -                     | -  | -  | - | +   | +    | +     | +      |
| <i>K. pneumonie</i>   | Peni                       | -                     | -  | -  | - | -   | -    | +     | +      |
|                       | Oflx                       | -                     | -  | -  | - | -   | +    | +     | +      |
|                       | EBTA                       | -                     | -  | -  | - | +   | +    | +     | +      |



**Figure 27.** Résultats de la CMI pour les antibiotiques penicilline et ofloxacin et les bactéries *k.Pneumonie* (a), *L.monocytogene* (b), *S.aureus* (c) et *P.aeruginosa* (d).

Selon le tableau 13 et, nous remarquons que les valeurs de CMI de penicilline est de l'ordre de 5 mg/ml pour toute les souches sauf pour *K. pneumoniae* qui est égale à 1,25 mg/ml. Tandis que la CMI de ofloxacin pour *P. aeruginosa* et *S.aureus* a été estimé à 10 mg/ml contre 2,5 mg/ml pour *L.monocytogène* et *K. pneumoniae*.

Contrairement à la littérature, nos résultats sont largement supérieurs à l'étude de Bonnet et al. (2015) qui rapporte des valeurs de CMI de l'ofloxacin : 0,12-1 mg/ml pour la *S.aureus* et 1 mg/ml pour *L.monocytogène*. Cependant, la CMI de la pénicilline a été rapporté à l'ordre de 0,125-0,500 mg/ml pour *P. aeruginosa* (Soussy, 2012), 0,25-2 mg/ml pour *S.aureus* (Jehl, 2015).

A partir des résultats représentés dans le tableau 13 et la figure 27, on a conclu que la CMI de l'EBTA pour toutes les souches utilisées dans cette étude est 5 mg/ml.

La CMI enregistré par l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* sur *S.aureus*, *E.coli* et *P.aeruginosa* sont respectivement de 7,5 µl/ml, 10 µl/ml et de 15µ/ml (Abi-Ayad, 2009). Quant à Boussaid (2017), la teneur de CMI sur *S.aureus* a été estimée à 4-6µl/ml.

Comparativement à la CMI d'huile essentiel de *Tetraclinis articulata*, l'EBTA a une activité antibactérienne faible, malgré son richesse en flavonoïdes qui ont un effet antibactérien important. De plus, il se peut qu'une activité observée résulte de la somme d'activités de plusieurs constituants ce que permet de justifier la différence trouvée (Abi-Ayad, 2009).

L'absence de comparaison directe dans notre travail entre les valeurs de CMI enregistrée par l'EBTA envers les quatre souches bactériennes étudiées avec la littérature est due à l'absence de valeurs de CMI enregistrée antérieurement pour un extrait de la même plante.

L'absence d'une standardisation dans la prise du volume d'inoculum, dans la composition et le volume du milieu, dans le pH et dans la température influe considérablement sur les résultats obtenus et empêche toute comparaison rigoureuse (Ahmed, 2006 ; Abi-Ayad, 2009).

#### III.2.3. Evaluation de la synergie de l'EBTA avec les antibiotiques

Des combinaisons entre l'EBTA et les antibiotiques de penicilline et ofloxacine ont été testées sur toutes les souches bactériennes pour déterminer s'il existe une éventuelle synergie. Les résultats obtenus sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition de l'EBTA vis-à-vis des souches testées et sont comparées aux diamètres des zones d'inhibitions de l'EBTA et les antibiotiques séparément (Tableau 14 ; Figure 28). L'effet antibactérien de l'association de l'EBTA aux antibiotiques, est défini en réponse aux interactions de manières suivantes (Saffidine, 2015):

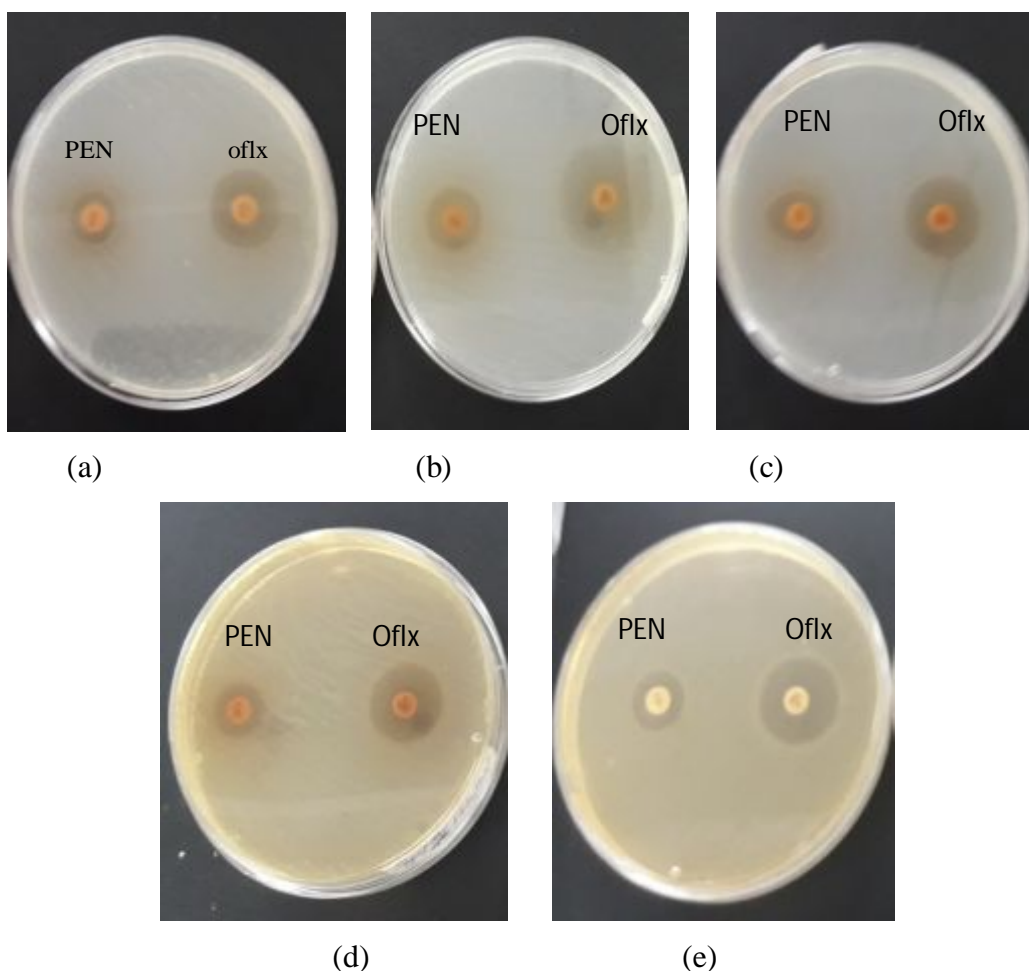
- **Indifférence:** l'activité d'un composé n'est pas affectée par l'autre:  $(A + B) = \text{effet A ou effet B}$ .
- **Addition:** l'effet de l'association des composés est égal à la somme des effets de chaque extrait étudiée isolément:  $(A + B) = \text{effet A} + \text{effet B}$ .
- **Synergie:** l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque composé étudiée isolément:  $(A + B) > \text{effet A} + \text{effet B}$ .

- **Antagonisme:** l'association diminue l'activité. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque composé pris séparément:  $(A+B) < \text{effet A ou effet B}$ .

**Tableau 14.** Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes combinaisons de l'EBTA avec les antibiotiques de pénicilline et ofloxacine.

| Souches bactériennes  | Diamètre de zone d'inhibition (mm) |             |          |             |
|-----------------------|------------------------------------|-------------|----------|-------------|
|                       | (P+Ext)                            | Effet       | Oflx+Ext | Effet       |
| <i>S.aureus</i>       | 20                                 | additif     | 20       | antagoniste |
| <i>L. monocytogén</i> | 16                                 | antagoniste | 21       | antagoniste |
| <i>P. aeruginosa</i>  | 23                                 | antagoniste | 22       | antagoniste |
| <i>K. pneumonie</i>   | 18                                 | antagoniste | 31       | antagoniste |
| <i>E.coli</i>         | 13                                 | Synergique  | 14       | antagoniste |

P : pénicilline ; Oflx : ofloxacine ; Ext : extrait.



**Figure 28.** Différentes combinaisons de l'EBTA avec les antibiotiques de pénicilline et ofloxacine (*S.aureus* (a), *k.Pneumonie* (b), *P.aeruginosa* (c), *L.monocytogene* (d) *E.coli* (e)).

Un seul effet synergique a été obtenu vis-à-vis d'*Escherichia coli* pour la combinaison de la pénicilline avec l'EBTA. La combinaison avec l'ofloxacine a été montrée un effet antagoniste par toutes les souches étudiées. L'effet additif a été observé chez *S.aureus* par la combinaison de l'EBTA avec la pénicilline.

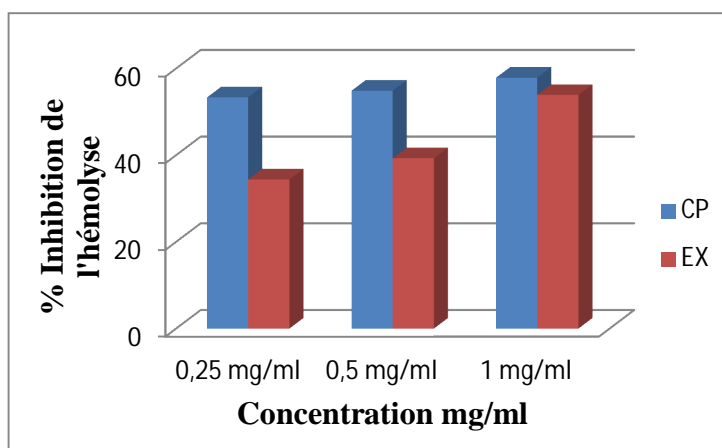
L'effet synergique des extraits de plantes peut être exploité pour réduire la dose de l'antibiotique, et en minimiser les effets indésirables (Saffidine, 2015). Plusieurs travaux réalisés sur l'activité antibactérienne des extraits de plantes combinés aux antibiotiques ont pu montrer une bonne synergie vis-à-vis des souches testées (Saffidine, 2015).

Cependant, les mécanismes par lesquels les composés phénoliques agissent en synergie avec les antibiotiques ne sont pas encore élucidés, mais certains auteurs pensent qu'il s'agit d'un effet conjugué sur la perméabilité de la membrane cytoplasmique des germes, facilitant l'influx des antibiotiques (Sibanda, 2007) ; ou bien l'inhibition des  $\beta$ -lactamases (Kusuda et al., 2006).

### **III.3. Evaluation de l'activité antihémolytique**

Le choix d'étudier l'activité antihémolytique de l'extrait de la plante *Tetraclinis articulata* est motivé en raison de son utilisation déclarée en médecine traditionnelle (Boussaid, 2017).

Les résultats relatifs de l'effet antihémolytique en fonction de concentration, dans un milieu tampon phosphate saline PBS (0,2 M et Ph 7,4) contenant une suspension érythrocytaire, incubé à 37 °C et en présence des différentes concentrations d'extrait de *Tetraclinis articulata* (0,25 mg/ml ; 0,5 mg/ml et 1 mg/ml), comparées à un témoin négatif (tube contenant le PBS, solution érythrocytaire et NaCl à 5%), et un témoin positif (tube contenant le PBS, solution érythrocytaire et un médicament antihémolytique) sont représenté dans la figure 29.



**Figure 29.** Evolution de l'effet antihémolytique de l'extrait de *Tetraclinis articulata* en fonction de leur concentration en comparaison avec un témoin positif.

Les résultats obtenus (Figure 29), montrent que les pourcentages d'effets antihémolytiques sont directement proportionnels à l'augmentation des concentrations de l'extrait.

Il est à noter que l'extrait a présenté un effet inhibiteur d'hémolyse par toutes les concentrations étudiées. A des concentrations de 0,25 mg/ml et 0,5 mg/ml, nous avons enregistré des pourcentages d'inhibition d'hémolyses faibles à l'ordre de 34,42 % et 39,33 % respectivement par rapport au témoin positif qui donne pour les mêmes concentrations des pourcentages d'inhibitions à l'ordre de 53,37 % et 54,90 % respectivement.

Cependant, à une concentration de 1 mg/ml, nous avons noté une augmentation significative de pourcentage d'inhibition qui a arrivé à 53,92 % par rapport à 57,90 % du témoin positif.

Zhang et al. (1997) ont trouvé que l'activité antihémolytique pourrait être attribuée aux flavonoïdes qui possèdent une activité antioxydante importante. Selon une étude menée par Asgary et al. (2005) ; la rutine a entraîné une inhibition de l'hémolyse de 42,5% à une concentration de 10 µg/ml uniquement. De même, ils ont démontré que la quercétine a inhibé l'hémolyse de 35,5% et le kaempférol a inhibé l'hémolyse de 26,9 % à la concentration maximale (10 µg/ml).

Cette activité antihémolytique pourrait être attribué également aux tannins ; des études ont montré que les tannins ont eu une inhibition très fortes de la formation des corps

de Heinz, cette même étude a révélé une corrélation élevée entre le pourcentage d'inhibition des corps de Heinz et la concentration en tannins (Chalal et Chibout, 2017).

Plusieurs travaux effectués sur les plantes médicinales ont montrés que les conditions climatiques, l'origine géographique et le mode d'extraction peuvent affecter la quantité et la composition en métabolites secondaires et par conséquent les activités biologiques (Elalaoui, 2015), donc l'effet antihémodolytique exercé réellement par la plante *Tetraclinis articulata* est plus important que celui trouvé dans la présente étude.

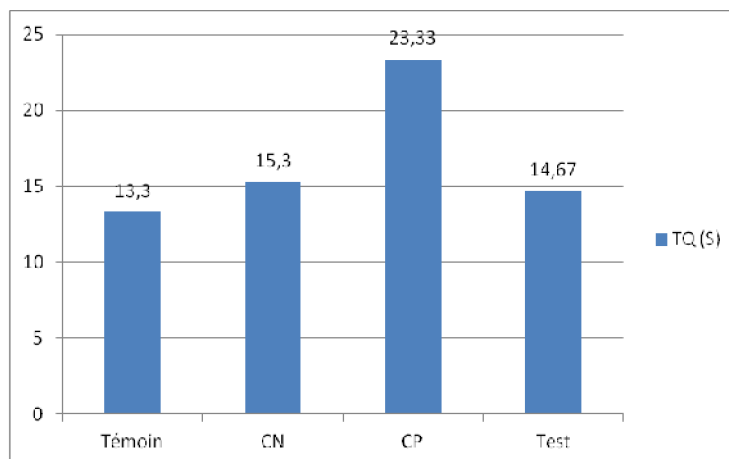
Nos résultats sont en accord avec les résultats de Zhang A. *et al.* (1997), Zubair *et al.* (2013) ; Khenfer et Medjouel (2016) et Chalal et Chibout (2017) où les extraits de plusieurs plantes médicinales étudiées ont montrées des effets antihémodolytiques contre les érythrocytes humains. C'est une justification scientifique à l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle contre certaines troubles d'hémolyse.

#### **III.4. Evaluation de l'activité anticoagulante de l'EBTA *in vitro***

Le pouvoir anticoagulant d'EBTA a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie exogène et la voie endogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TQ et le TCK respectivement. Un temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante du matériel testé (Tlili, 2015).

##### **III.4.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène**

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène a été réalisée à l'aide du test de temps de Quick (TQ), qui explore la voie extrinsèque (VII) et la voie commune (X, V, II, fibrinogène) de la coagulation sanguine où le facteur tissulaire (thromboplastine) est le déclencheur de cette voie (Manallah, 2012). Les résultats sont présentés dans la figuré 30.

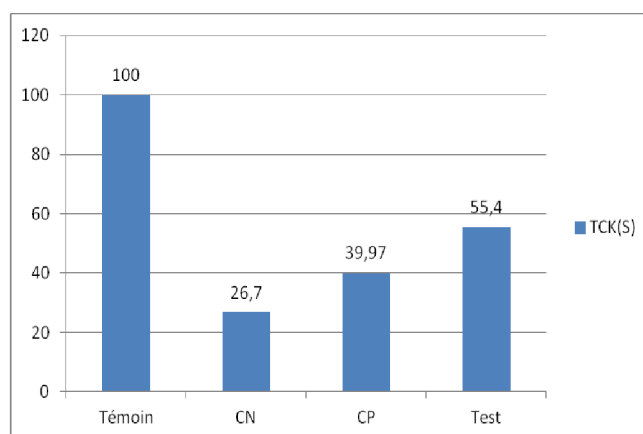


**Figure 30.** Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.

La figure 30 présente les résultats de l'activité anticoagulante, on note que l'EBTA donne un TQ égale à 14,67s, proche à celui du control négatif (15,33s) et du témoin (13,3). Donc, l'extrait testé n'a pas une activité anticoagulante remarquable vis-à-vis de la voie exogène.

#### III.4.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène est réalisée à l'aide du test de Temps de céphaline Kaolin (TCK). Cette voie de coagulation est activée par le contact entre le facteur XII et l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif in vivo). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquence l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (Lemaoui, 2011). Les résultats sont représentés dans la figure 31.



**Figure 31.** Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.

A partir de la figure 31, Nous avons constaté une valeur à l'ordre de 55,4 s pour le TCK de l'EBTA par rapport à celui de CN à 26,7 s et de CP à 39,97 s. Donc, l'extrait testé a une bonne activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.

L'évaluation de l'effet anticoagulant de l'EBTA à l'aide des deux tests (TQ, TCK) a montré que cet extrait a une importante activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène par rapport au contrôle positif. Ce dernier appartient au groupe des héparines exactement les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM) qui forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III qui inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (Manallah, 2012) ; ce qui explique leur faible effet par rapport à notre extrait.

L'activité anticoagulante de l'EBTA est due à leur richesse aux flavonoïdes ; ces derniers participent à la prévention des maladies cardiovasculaires ; ils inhibent l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, améliorent le fonctionnement de l'endothélium la couche cellulaire et assure le bon fonctionnement du système vasculaire en réduisant les risques d'athérosclérose. De plus, les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes (Manallah, 2012). Il présente un remplaceant d'origine naturelle des anticoagulants utilisés qui sont obtenus par différents procédés chimiques ou enzymatiques (Zandecki, 2006).

## Conclusion et perspectives

Dans le cadre d'une valorisation de la flore méditerranéenne Algérienne, l'extrait méthanolique de la plante médicinale *Tetraclinis articulata* qui appartient à la famille des *Cupressaceae*, l'une des familles les plus importantes de la flore Algérienne, a été testé pour leur composition chimique, et leur activités biologiques telles que, l'activité antibactérienne, antioxydante, antihémolytique et anticoagulante.

Il nous est apparu important de commencer notre travail par un criblage phytochimique sur la plante *T.articulata*. Nos résultats indiquent la richesse de cette plante en flavonoïdes, flavonols, flavones et anthocyanidine. Ces métabolites sont connus par leurs diverses propriétés biologiques pouvant ainsi, contribuer à leur utilisation comme remèdes en médecine traditionnelle.

Ainsi la détermination de la teneur des flavonoïdes, des flavonols et des proanthocyanidines dans l'extrait butanolique de *Tetraclinis articulata* au moyen des dosages spectrophotométriques et l'analyse du contenu des flavonoïdes par la CCM nous a confirmé la présence des flavonoïdes.

L'étude du pouvoir antioxydant par le test de DPPH a révélé un fort pouvoir antioxydant. En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de la diffusion de disque, toutes les souches utilisées dans cette étude ont été montrées sensibles à l'extrait sauf *E.coli* qui a été apparu résistante avec un effet synergique remarquable.

L'estimation de l'activité anti-hémolytique *in vitro*, a révélé un pouvoir antihémolytique important, ce qui permet d'entrer dans une préparation thérapeutique qui sert à la guérison des maladies hémolytiques. L'évaluation de l'effet anticoagulant de l'extrait butanolique sur les deux voies de coagulation a été démontrée que leur effet est plus important sur la voie endogène que la voie exogène, c'est-à-dire que la *Tetraclinis articulata* peut être utilisé comme un anticoagulant contre les complications des maladies thrombotiques.

Par ailleurs, les résultats de cette étude restent préliminaires et ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, donc, de nombreuses perspectives expérimentales découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies nécessaires concluant plusieurs points à savoir:

- Caractérisation quantitative des flavonoïdes par des méthodes de séparation plus performantes (CLHP, CL/SM, CG/SM...);
- Evaluer et tester ces molécules actives pour d'autres propriétés biologiques *in vivo* dans le cadre d'application pharmacologique et industrielle ;
- Faire une étude comparative avec les autres fractions extraites à partir la même plante.

## Références bibliographiques

- **Ababsa Z.E. (2017).** Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Tetraclinis articulata* de la famille des *Cupressaceae* et Synthèse d'aminoacides et de peptides thioglycosylés par couplage de Buchwald-Hartwig. Mémoire de Doctorat en science. Option chimie organique. Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie. 74 p.
- **Abdelaziz M. (2013).** Caractérisation, activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de trois espèces de sauges (*Salviaalgeriensis*, *Salviaargentea* et *Salviabarrelieri*). Mémoire de magister en agronomie. Université Hassiba Ben Bouali à Chlef. 22.23 p.
- **Abdelli W. (2017).** Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperusphoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Mémoire de Doctorat. Option Interactions micro-organismes, hôtes et environnements. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie. 166 p.
- **Abi-Ayad F.Z. (2009).** Analyse de l'huile essentielle du thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Mémoire de Magister, option substances naturelles activités biologiques et synthèse laboratoire des produits naturels. Université de Tlemcen, Algérie. 102 p.
- **Abi-Ayad F, Abi-Ayad M, Lazouni H, Rebiahi S. (2013).** Evaluation of *Tetraclinis articulata* essential oil from Algeria flora as a potential source of antifungal activity and study of its chemical composition. Indian Academy of Wood Science. 10 p.
- **Achache W. (2017).** Effet insecticide des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* sur l'insecte ravageur de blé en post-récolte *Triboliumcastaneum*. Mémoire de Master, option Gestion qualitative des productions agricoles. Université Djilali Bounamaa de Khemis-Miliana, Maroc. 13. 14. 48 p.
- **Adouane S. (2016).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales de la région méridionales des Aurés. Mémoire de magistère en sciences agronomiques. Université Mohamed Khider – Biskra. 191 p.
- **Agrawal S., Kulkarni G.T. et Sharma V.N. (2011).** A comparative study of the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminaliapaniculata* and *Madhucalongifolia*. Free Radical Antioxidant. 1. 62 p.

## Références bibliographiques

---

- **Ahmed H, Dominique L, Alain M, Meriem K.H. et Gérard J. (2006).** Caractéristiques papetières de la pâte de bois de thuya de Berbérie (Algérie) (*Tetraclinis articulata* Vahl) obtenue par un procédé soude-anthraquinone. Ann. For. Sci, 63. 493 p.
- **Aissous A. et Bechara R. (2016).** Caractérisation chimique et activités biologiques d'extrait brut hydroalcoolique des graines de *Lepidium sativum*. Master en biochimie moléculaire et sante. Université des Frères Mentouri Constantine. 16.18 p.
- **Ait A.E.(2010).** Diagnostic des anémies hémolytiques auto immunes. Doctorat en pharmacie. Université Mohammed v. 41. 111 p.
- **Akroum S. (2011).** Étude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de doctorat en sciences. Université Mentouri de Constantine. 18 p.
- **Alais C. et Linden G. (1997).** Biochimie alimentaire. Masson, Paris. 120 p.
- **Alexandra K. (1999).** Modalisation de la voie intrinsèque de la coagulation sanguine en corrélation avec le temps de céphaline + activateur(TCA). Docteur de l'université de Cergy Pontoise, 13 p.
- **Amine M. (2016).** Anémies hémolytiques auto immunes, anémies hémolytiques auto immunes. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed V-Rabat. 7.13.32.68.76 p.
- **Amrane H. et Babahani M. (2017).** Recherche des extraits végétaux à activité anti-hémolytique. Mémoire de master en biochimie appliquée. Université A. Mira – Bejaia.12 p.
- **Anders B. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. University of Toronto-Canada, 13(2). 184 p.
- **Aneb M. (2017).** Caractérisation phytochimique et propriétés antiproliférative, antibactérienne et antiparasitaire de seize plantes médicinales. Thèse de Doctorat, option biochimie ethnopharmacologie. Université Mohammed V-Maroc.23.69.104 p
- **Ankli A., Heinrich M., Bork P., Wolfram L., Bauerfeind P., Brun R., Schmid C., Weiss C., Bruggisser R., Gertsch J., Wasescha M. et Sticher O. (2002).** *Yucatec Mayan* medicinal plants: Evaluation based on indigenous uses. Journal of Ethnopharmacology, 79 (1) .43 p.

## Références bibliographiques

---

- **Ansari K.N. (1997).** The free radicals-the hidden culprits-an update. Indian Journal of Medical Sciences.51. 319 p.
- **ArchambaudM. (2009).** Les Antibiotiques, Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse. 28p.
- **Asgary S., Naden G.H. etAskan N. (2005).** Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. Experimental cardiology.10. 88p.
- **Badereddine M. etMoussaoui H. (2014).** Etude phytochimique comparative des extraits de feuilles de *Phoenix dactylifera .L* obtenue par différents méthodes. Mémoire de master génie chimique. Université d'El-Oued. 37 p.
- **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. etPinkas M. (1996).**Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from nawthern fresh plant organs and pharmaceutical preparations. ArzneimForsch drugResearch, 46.1086 p.
- **BammiJ. et Allal D. (2002).** Les plantes médicinales dans leforêt de l'achach (plateau central, Maroc). Acta BotanicaMalacitana 27. Málaga. 143 p.
- **Barouki R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. Médecine/Sciences, 22. 266 p.
- **Bartosikova L., necas J., Suchy V. etKubinova R. (2003).** Antioxydative effects of morineinischemia, reperfusion of kidney in the laboratory. Drug and Chemical Toxicology, 72. 87 p.
- **Bartosz G. (2005).** Superoxide dismutases and catalase. Vol 2. Part ODans: The handbook of environmental chemistry. Berlin. Springer Verlag Heidelberg. 108 p.
- **Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris T.C. et Truck M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology, 45. 493 p.
- **Beddou F. (2015).**Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales *sahariennes Rumex vesicarius L.* et *AnvillearadiataCoss.* Et Dur. Mémoire de Doctorat. Option produits naturels, aspects nutritionnels et acvtivités biologiques. UniversitéAboubakrBelkaid-Tlemcen. 144p.
- **Bekro J.A.M., Konan K.M., Békro Y.A., Djié Bi M.G., Zomi Bi T.J, Mambo V. etBouaB.B. (2008).** Phytocompounds of the extracts of four medicinal plants of Cote D'ivoire and assensment of their potential antioxidant by thin layer chromatography. Euro Journal Publishing, 24 (2). 219 p.

## Références bibliographiques

---

- **Belkhiri F. (2009).** Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tamus communis L.* et *Carthamus caeruleus L.* Mémoire de Magister, option microbiologie appliquée. Université Farhet Abbès-Sétif. 108 p.
- **Belfadel A. (2013).** Etude phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de la partie aérienne de la plante médicinale. Mémoire de Master. Option microbiologie moléculaire et cellulaire. Université Abbès Laghrour Khenchela- Algérie. 61 p.
- **Ben Chibane T. (2013).** Détermination de l'activité antioxydante de deux céréales : blé dur et blé tendre. Mémoire d'Ingénieur d'Etat. Option contrôle de qualité et analyse. Université de Bejaia, Algérie. 39 p.
- **Benabid A. (1977).** Étude sylvo pastorale de la *tétraclinaie de l'Amsittène*. *Ecologia Mediterranea* 3, 125 p.
- **Benali Toumi F, Benyahia M, Hamel L, Mohamedi H, Boudaghen L. (2011).** Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie. *Acta Botanica Gallica*, 158 (1). 93 p.
- **Benali Toumi F, Benyahia M et Hamel L. (2011).** Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie. *Acta Botanica Gallica*, 158 (1). 93 p.
- **Benguerba. A. (2008).** Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *Inula crithmoides L.* Mémoire de magister en chimie organique. Université Mentouri-Constantine. 17 p.
- **Benkhaled S, Ghedir E.M, Sid I. (2013).** Etude de l'activité antibactérienne des composés phénoliques issus des produits de l'olivier (Feuilles et Margines). Mémoire de Master, option: Microbiologie. Université Abbès Laghrour Khenchela- Algérie. 47 p.
- **Biaye M. (2002).** Action pharmacologique des tanins. Docteur en pharmacie. Université Cheikh Anata Diop de Dakar. 26 p.
- **Bolou G.E. K, Attiou B, N'guessan A.C, Coulibaly A, N'guessan J. Det Djaman A.J. (2011).** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol 80. 772 p.
- **Boneu B. et Fauvel J.M. (2001).** Prescription et surveillance des antithrombotiques. 15 p.

## Références bibliographiques

---

- **Bouayad Alam S., GaouarBenyelles N., Dib M., ElaDjabou N., Tabti L., Paolini J., Muselli A., Costa J. (2014).** Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western Algeria against five fungal pathogens of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 87p.
- **Bouhaddouda N. (2016).** Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*. Mémoire de master en biochimie. Université Badji Mokhtar-Annaba. 22.23 p.
- **Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhsine M, Chaouch A, Satrani B. (2009).** Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agrosolutions*, 20 (1) .44 p.
- **Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhsine M, Chaouch A, Satrani B. (2010).** Production et caractérisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *tetraclinis articulata*, *Bulletin de la société Royal des sciences de Liège*.
- **Bourkhiss M. Lakhlifi T. Chaouch A. et Ouhsine M. (2016).** Intérêt de l'huile essentielle du Thuya de Barbarie interest of essential oil of Barbary Thuya. *Phytothérapie*, 14. 109 p.
- **Bourgeois C.M, Mescle J.F. et Zucca J (2003).** Microbiologie alimentaire. Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Technique and doc Lavoisier-Paris*. 672 p.
- **Boussaid M. (2017).** Caractérisation des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Thuya de Barbarie) de la région de Tlemcen et étude de leurs activités biologiques. Thèse de Doctorat en Biologie, Option produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologiques. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie. 10. 101. 102. 103. 173 p.
- **Boussoualim N. (2014).** Activités biologiques de plantes médicinales : *Anchusa azurea* Mill. et *Globularia alypum* L. Thèse de Doctorat en microbiologie. Université Farhet Abbas Sétif 1-Algérie. 115 p.
- **Bouyahyaoui A. (2017).** Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l'Atlas Algérien. Thèse Doctorat, option microbiologie. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem-Algérie. 76p.

## Références bibliographiques

---

- **Bouزيد W. (2009).** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Crataegus monogyna* Jacq. Thèse de Magister, option biochimie appliquée. Université El Hadj Lakhder-Batna-Algérie. 62 p
- **Bruneton J. (1993).** Eléments de phytochimie et de pharmacologie. Technique et documentation Ed. Lavoisier-Paris .405 p.
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier-Paris. 1120p.
- **Cavin A. (1999).** Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires, *Tinospora crispa* (Menispermaceae) ; *Merremia marginata* (convolvulaceae) et *Orpheanandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat. Lausanne. 243 p.
- **Chalal F, Chibout M. (2017).** Effet préventif de pathologies hémolytiques liées au stress oxydatif des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Mémoire de Master. Option biochimie physiopathologie. Université A. MIRA, Bejaia. 36 p.
- **Charles D.J. (2013).** Natural antioxidants. Chapitre 3. Dans: Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. New York. Springer science, Business Media. 39 p. tailored for a challenging environment. Microbiology and molecular biology reviews, 70 (2). 344 p.
- **Chemloul F. (2014).** Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* de la région de Tlemcen. Mémoire de master en Agronomie. Université Abou Beker Belkaid. 11 p.
- **Comhair S.A.A, Erzurum S.C. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases, American Journal Physiology Lung Cell. Molecular physiology, 283. 246 p.
- **Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews 12(4). 564 p.
- **Desikan R, Hancock J.T, Neill S.J. (2003).** Oxidative stress signalling. Chapitre 5. Dans: Topics in current genetics. Vol. 4 Plant Responses to Abiotic Stress. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 121 p.
- **Dib S et Boutarene F. (2007).** Le pouvoir antioxydant de quelques jus de fruits «Toudja». Mémoire d'Ingénieur.
- **Djemai. Z. S. (2009).** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. Magister en biologie. Université -El Hadj Lakhder –Batna. 12 p.

## Références bibliographiques

---

- **Djouahri A, Boualem S, Boudarene L, Baaliouamer A. (2015).** Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata*(Vahl) Masters. *Industrial Crops and Products*. 63. 138 p.
- **Djouahri A, Boudarene L, Meklati B. (2013)** Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algerian *Tetraclinis articulata*(Vahl) Masters. *Industrial crops and products*. 44. 32 p.
- **Djouahri A, Saka B, Boudarene L, Baaliouamer A. (2016)** Essential oil variability and biological activities of *Tetraclinis articulata*(Vahl) Masters wood according to the extraction time *Sous-press*.
- **Djoudi M, Ghebrioua S. (2017).** Etude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique des extraits de feuilles de citrus limon. Mémoire de master biochimie et biologie moléculaire. Université Abderrahmane Mira – Bejaia. 1.10 p.
- **Dohou N, Yamni K, Gmira N et Hassani I.M. (2004).** Etude de polyphénols des feuilles d'une *Endémique ibéro marocaine, thymelaealythroïdes*. *Acta Botanica Malacitan*, 29. 233 p
- **Dr Abdesselam. Z. (2006).** Nutra news (1-16), Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. 10 p.
- **Dr. Vincent C. (2006).** Etude in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Cours de DCEM 1. Faculté de Médecine de Créteil. 18 p.
- **D ra ková Z. (2008).** Oxidants, antioxidants and oxidative stress. Chapitre 2. Dans: mitochondrial medicine. Springer Science and Business Media B.V. 19 p.
- **Elalaoui R. (2015).** Contribution à la recherche d'effet hémolytique à partir d'extraits de *Berberis vulgaris*. Mémoire de Master. Option biochimie appliquée. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen- Algérie. 50 p.
- **El Haci I.A, Atik B.F, Didi A, Gherib M et Didi M.A. (2012).** Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara Algérien. *Phytothérapie*. 10. 280 p
- **Evans W.J. (2000).** Vitamin E, vitamin C, and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72. 647 p.
- **Fidah A, Salhi N, Rahouti M, Kabouchi B, Ismaili M. R, Ziani M, Aberchane M, Famiri A. (2017).** Chemical variability and antifungal activity of

## Références bibliographiques

---

- Tetraclinis articulata*(Vahl) Masters woods and leaves essential oils against wood decaying fungi. International Journal of Pharmacognosy and PhytochemicalResearch, 9 (1). 123 p.
- **Florence M. (2012)**. Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite. Diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine. 26 p.
  - **Fontaine E. (2007)**. Radicaux libres. Dans: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer-Verlag, France. 251 p.
  - **Foyer C.H, Trebst .A etNoctor G. (2008)**. Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione. Chapitre 16. Dans: Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment, netherlands. Springer Science, Business Media B.V. 241 p.
  - **García M.J. (2005)**.Ros Generation, Antioxidants, and Cell Death. dans: Mitochondria and the heart, developments in cardiovascular medicine. Volume 256 Springer Science, Business Media, Inc, USA. 99 p.
  - **Garry G, Duthie, Peter T, Gardner J, Janet A etKyle M. (2003)**. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? UK. Proceedings of the Nutrition Society, 62. 599 p.
  - **Goetz P et Ghedira K. (2012)**. Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. Dans: Phytothérapie anti-infectieuse. Collection phytothérapie pratique. Springer Verlag, France. 193 p
  - **Guardabassi L etCourvalin P. (2006)**. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aarestrup F.M. (Ed.), antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press :Washington. 18 p.
  - **Goudable A et Favier D. (1997)**. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique et Métabolisme. 11. 5 p.
  - **Guessoum D et Lecheheb H. (2015)**. Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes Chez *Urticadioica L*. Evaluation de leur Pouvoir antibactérien. Mémoire du Master. Option métabolisme secondaire et molécule bioactive. Université des Frères Mentouri-Constantine-Algérie. 46 p.
  - **Guinoiseau E. (2010)**. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : Séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, option biochimie, biologie moléculaire. Université de Corse Pascale Paoli-France. 114 p

## Références bibliographiques

---

- **Haddad A. et Reghmit A. (2017).** Optimisation de l'extraction des polyphénols à partir d'une plante locale *Calicotomevillosa* (Poir.) Link par une technique innovante et l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Mémoire de Master. Option biochimie appliqué. Université M'hamedBougaraBoumerdes,-Algérie. 58 p.
- **Hadjadj K. et LetreuchBelarouci A. (2017).** Synthèse bibliographique sur le thuya de berbérie (*Tetraclinisarticulata* (Vahl) Master. Geo-Eco-Trop, 41(1). 13 p.
- **Hagerman A.E. (2002).**Tannin chemistry. Department for chemistry and biochemistry Miami University Oxford, OH45056 USA.
- **Halliwell B. (1999).** How to characterize a biological antioxydant free radical. Res.Comm, 9. 32 p
- **Hamza. K et Meziani. A. (2015).** Etude de l'activité biologique de l'extrait aqueux des feuilles de *Zizyphus lotus L.* Mémoire de master en biochimie moléculaire et sante. Université des Frères Mentouri-Constantine. 13.18 p.
- **Hassaine. S. (2013).** Etude de la résistance de *Klebsiellapneumoniae* aux antibiotiques au niveau du CHU de Tlemcen. Mémoire de master en biologie. Université Abou BekrBelkaid-Tlemcen. 25.30 p.
- **Hardy S.P. (2002).** Human microbiology. Taylor and Francis. 257 p.
- **Heim K.E., Tagliaferro A.R. et Bobilya D.J. (2002).**Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. Journal of Nutritional Biochemistry, 13. 572 p.
- **Hennebelle T. (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamiles productrices d'antioxydants: *Marrubiumperegrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus*(Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de Doctorat-Lille. 304p.
- **Hendrich A.B. (2006).** Flavonoid membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. Acta pharmacologicasinica, 27 (1).27 p.
- **Herzi N. (2013).** Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO2-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de Doctorat. Option génie des procédés et de l'environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse-France. 40. 177 p.
- **Horcajada M. (2006).** Unité de Nutrition Humaine (UNH). INRA Equation Nutrition n°62.

## Références bibliographiques

---

- **Iserin P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Dorling Kindersley Limited, Londres. 334 p.
- **Jacquot J.P, Dietz K.J, Rouhier N, Meux E, Lallement P.A, Selles B et Hecker A. (2013).** Chapitre 8. Redox regulation in plants: Glutathione and “Redoxin” related families. Dans: Oxidative stress and redox regulation. Springer Science Business Media Dordrecht. 213 p.
- **Jehl François. (2015).** Recommandation 2015. Comité de l’antibiogramme de la société Française de microbiologie. 18. 93 P.
- **Kabran G.R.M, Ambeu N.C, Mamyrbékova-B.J.A et Békro Y.A. (2012).** Phénols et flavonoïdes totaux dans les extraits organiques de dix plantes utilisées dans la tradithérapie du cancer du Sein en Côte d’Ivoire. European Journal of Scientific Research ISSN 1450-216X. Vol 68. No.2. 182 p.
- **Kerbouche L. (2010).** Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de quelques plantes des familles de *labiacées* et de *cupressacées*. Thèse de Magister. Option science alimentaires. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach-Alger-Algérie. 130 p.
- **Khalidi. F. Z. (2015).** Evaluation de l’activité antioxydant et anti inflammatoire des plantes médicinales algériennes *Thymus vulgaris*, *Matricaria recutita* *Anethum graveolens*. Mémoire de master biologie cellulaire et physiopathologie. Université frères Mentouri-Constantine. 22 p.
- **khenfer S. et Medjouel M. (2016).** Optimisation des conditions d’extraction des compositions phénoliques d’une plante médicinale de la région sud de Sahara Algérien. Mémoire de Master. Option biochimie appliquée. Université KasdiMerbah-Ouargla-Algérie. 57 p.
- **Khiri Fet Lalaoui B. (2007).** Activité antimicrobienne des polyphénols le cas d’extrait d’*Arbutus unedo*. Mémoire d’Ingénieur. Option contrôle de qualité et analyse. Université Abderrahmane Mira-Bejaia-Algérie. 42 p.
- **Kholkhal Fatima. (2014).** Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* *ssp coloratus* et *ssp ciliatus*. Thèse de doctorat en biologie. Université Abou Baker Belkaid Tlemcen. 110 p.
- **Klaunig J.E et Kamendulis L.M. (2004).** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 44. 239 p.

## Références bibliographiques

---

- **Ko F.N, Cheng Z.J, Lin C.N et Teng C.m. (1998).** Scavenger and antioxidant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpusheterophyllus*. *Free Radical Biology and Medicine*, 25. 160 p.
- **Koechlin R.C. (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*. 20. 165 p.
- **Kohen R et Nyska A. (2002).** Oxidation of biological systems, oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30. 620 p.
- **Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Muséum National d'Histoire Naturelle. Thèse de Doctorat.
- **Kumaran S.P, Kutty B.C, Chatterji A, Subrayan P.P et Mishra K.P. (2007).** Radioprotection against DNA damage by an extract of Indian green mussel, *Pernaviridis l*. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 26 (4). 263 p.
- **Labiod. R. (2016).** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat en biochimie. Université Badji Mokhtar-Annaba. 1.19.20.75.78.79 p.
- **Ladhem H. (2016).** Contribution à l'étude de l'effet antibactérien et antioxydant de l'extrait aqueux de *Tetraclinis articulata* (Thuya de Berbérie). Mémoire de Master, option sciences des aliments. Université de Tlemcen, Algérie. 1. 22.52 p.
- **Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M et Hseini S. (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Revue de botanique nouvelle série* N° 186. 10 p.
- **Laib Imène. (2011).** Etude des activités antioxydantes et antifongiques de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, mémoire de magister en sciences alimentaires. Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires- Constantine. 26 p.

## Références bibliographiques

---

- **Larabi. F, Benhassaini. HetBennaoum Z. (2015).** Essential oil composition of *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters. Leaves from Algeria. Internat J Herbal Med, 2(6). 31 p.
- **Larab. S et Makhoulf. A. (2017).** Caractérisation phytochimique et activité antihémolytique des extraits de Citrus. Mémoire master biochimie et biologie moléculaire. Université A. Mira – Bejaia. 10. 9 p.
- **Lemaoui. A. (2011).** Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*.L. Algérienne. Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas –Sétif. 1. 23. 24. 62.
- **Limbach S etGuilland J.C. (2007).** Vitamines. Dans: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 2eme éd. France: Springer Verlag. 127 p.
- **Lorraine. L. (2015).** Les huiles, essentielles pour le travail social ?! , HES·SO//Valais. Diplôme Bachelor of Arts HES·SO en travail social. 16.17.19p.
- **Lykkesfeldt J etSvendesen O. (2007).** Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. The Veterinary Journal. 173. 502 p.
- **Madjour.S. (2014).** Etude pharmacologique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *Rosmarinus officinalis*. Master en Chimie pharmaceutique. Université Med Khider-Biskra. 51 p.
- **Mamrybekova. B. J. A, Boua. B. B, Kouassi. K. C et Békro Y. A. (2013).** Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à N'gramanssabo en Côte d'Ivoire, Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques. n° 08. 8.9 p.
- **Manallah A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de Magister. Option biochimie appliquée. Université Farhet Abbes-Sétif-Algérie. 1.15.20.29.30.77. 86 p.
- **Manolaraki F. (2011).** Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis vicifoliae*) : Analyse des facteurs de variation et du rôle des composés phénoliques. Thèse : Science Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition. Institut National Polytechnique de Toulouse. 143 p.
- **Marfak. A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Université de Limoges. Thèse de Doctorat.

## Références bibliographiques

---

- **Marianne. P. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire d'exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelable. Université du Québec-Chicoutimi ; 19. 20. 21. 22 p.
- **Markham K.R. (1982).** Techniques of flavonoids identification. Academic press, London. Chap 1 et 2. 113 p.
- **Mates J.M, Perez G.C et Nunez C.I. (1999).**Antioxidant enzymes and humandiseases. Clinical Biochemistry.32. 595 p.
- **Maydani M. (2000).** Vitamine E and prevention of heart disease in high risk patients.Nutrition, 58. 278 p.
- **Mehrotra M, Dougherty J etPoppe C. (2003).**La resistance aux antimicrobiens : De quoi s'agit il ? Recherche sur les politiques de santé (Canada). 6 p.
- **Mellouk K. (2013).** Étude des activités antioxydante et antimicrobienne des flavonoïdes et des fractions flavoniques de la partie aérienne de *Pituranthoschloranthus*(Guezzeh) de la région de Biskra. Mémoire de Master. Option alimentation et nutrition. Université Abou BekrBelkaid-Tlemcen-Algérie. 57 p.
- **Mena. H. (2016).** Activités anticoagulante et phagocytaire de quelques épices (curcuma, gingembre et poivre noir). Mémoire de master académique biochimie appliqué. Université KasdiMerbah-Ouargla. 15 p.
- **Meriç K. (2005).** Études sur les composés poly phénoliques en relation avec l'alimentation de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneurafumiferana* (Clem.)). Université Laval-Québec.
- **Meziti Asma. (2009).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigellasativa* l'Étude in vitro et in vivo. Mémoire de magister en biochimie appliquée. Université EL-Haj Lakhdar-Batna. 65 p.
- **Middleton E. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart, disease, and cancer. Pharmacological review, 52 (4). 673 p.
- **Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Université Louis Pasteur (Strasbourg).

## Références bibliographiques

---

- **Miw. A. S, Muller F.L et Beckman K.B. (2008).** The basics of oxidative biochemistry. Dans: Oxidative stress in aging. Aging Medicine. 11 p.
- **Mohammed. J. (2010).** Extraction et caractérisation de la composition des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* & *Juniperus oxycedrus* du Moyen Atlas. Mémoire de master Sciences et Techniques. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. 24. 25 p.
- **Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical DiPhenylPicrylHydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. Journal of Science and Technology. 26(2). 211 P.
- **Montoro P, Tuberoso C.I.G, Piacente S, Perrone A, De Feo V, Cabras P, Pizza C. (2006).** Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. Berries used for the preparation of myrtle liqueur. J. Pharm. Biomed. Anal. 41. 1614 p.
- **Moubarki. N. (2010).** Extraction des huiles essentielles de thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuses- antimicrobienne, mémoire de magister en génie des procédés chimiques et pharmaceutiques. Université de M'hamed Bougara-Boumardes. 9 p.
- **Muanda. F. N. (2010).** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydants et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat en chimie organique. Ecole doctorale Lorraine de chimie et physique moléculaires. 78 p.
- **Münzel T, Post F et Warnholtz A. (2006).** Smoking and oxidative stress: Vascular damage dans: Cigarette smoke and oxidative stress, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany. 339 p.
- **Muylaert A et Mainil J.G. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». Annales de Médecine Vétérinaire. 156. 109 p.
- **Nisrin. B. (2013).** Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. Thèse de doctorat en chimie organique. Université Mohammed V – Agdal, 38 p.
- **Newman D. Jet Cragg G.M. (2007).** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of Natural Product 70 (3). 461 p.

## Références bibliographiques

---

- **Novelli G.P. (1997).** Role of free radicals in septic shock .Journal of PhysiolPharmacol. 48. 517 p.
- **Okuda T. (2005).** Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. Phytochemistry. 66. 2012 p.
- **Orban J.C, Sibon S et Ichai C. (2007).** Ischémie/reperfusion, stress oxydant, pré conditionnement et insuffisance rénale aiguë. Dans: L'insuffisance rénale aiguë, Le point sur. Springer-Verlag, France. 85 p
- **Ouerdane S et Ramdani F. (2007).** Etude du pouvoir antioxydant de deux agrumes : Le citron et le pamplemousse. Mémoire d'Ingénieur d'Etat. Option contrôle de qualité et analyse. Université Abderrahmane Mira-Bejaia-Algérie. 34 p.
- **Oukaci L. (2017).** Etude de l'effet des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* et *Myrtus communis* sur la vitalité et les paramètres de mobilité du sperme humain. Mémoire de Master, option bio-bessources animales et biologie intégrative. Université Abderrahmane Mir-Bejaia-Algérie.
- **Pastre J, Priymenko N. (2007).** Intérêt des antioxydants de l'alimentation des carnivores domestiques. Revue Med. Vet, 158(4). 180 p.
- **Paulette. C, Jacque. C, Dominique. D, Georges. D, colette. D, Jean. D, Eviline. F, Claudine. F, Jean. M. F, Moreno. G, Colette. G, Bernard. J. J, Lamotte. B. M et Nguyen. D. (1998).** Résistance bactérienne aux B-lactamine. médecine/science n°5. vol 14. 544 p.
- **Pibiri M.C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Docteur. Lausanne Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL).
- **Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products. 63. 1035 p.
- **Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K et Defraigne J.O. (2002).** Physiological action of antioxidant defences. Nutrition clinique et métabolisme. 16. 233 p.
- **Pistelli L et Giorgi I. (2012).** Antimicrobial properties of flavonoids. Chapitre 2. Dietary phytochemicals and microbes. Springer Science, Business Media Dordrecht. 33 p.
- **Pons P. A. A. (2002).** Exploration de la coagulation plasmatique chez le chien essai du SAC 2000. Thèse de docteur vétérinaire. Université de Paul Sabatier de Toulouse. 11 p.

## Références bibliographiques

---

- **Porter L. J, Hirtstich L. N et Change B.J. (1986).** The conversion of procianidins and prodlephinidins to cyanidines and delphenidins, *Phytochemistry*, 25. 223 p.
- **Prescott L.M, Harley J.PnetKlein D.A. (1995).** *Microbiologie*. De Boeck ed. 1014 p.
- **Pr Soussy C. J. (2012).** Recommandation 2012. Comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie. 8 p.
- **Pr Zandecki. M, Benjamin. B. (2006).** Hémolyse et son exploration, Faculté de Médecine – CHU 49000 Angers France, Hématologie biologique. 1. 5 p.
- **RACHED .W. (2009).** Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Thèse de Magister. Option biochimie végétal appliquée. Université d'Oran Es-Sénia, Algérie. 17. 120 p.
- **Randerianarivelo R. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *cinnamosmafragrans* », alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Docteur en science de la vie. Université d'Antananarivo. 38 p.
- **Reynaud. A, EP. Espaze, S. Papin et Al. Courtieu. (1983).** *Annale de l'institut Pasteur (microbiologie)*. 133 p.
- **Roede J.R et Jones D.P. (2010).** Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and molecular mutagenesis*. 51. 380 p.
- **Saffidine K. (2015).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamuscaeruleus L.* et de *Plantago major L.* Mémoire de Doctorat. Option microbiologie. Université Ferhat Abbas-Sétif-Algérie. 92 p.
- **Sahli S et Zaidi SA. (2017).** Évaluations du potentiel antioxydant et étude de la cytotoxicité des alcaloïdes totaux et des extraits phénoliques bruts de *Fumariaagraria*. Mémoire de master pharmacologie moléculaire. Université A. Mira – Bejaia. 1 p.
- **Said I et Aouina I. (2016).** Caractérisation et mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du blé dur (*Triticumdurum*). Mémoire master biochimie moléculaire et santé. Université des Frères Mentouri Constantine. 41.42.43 p.
- **Samadi A. (2000).** Etude de l'extrait chloroformique d'*Oudneyaafriicana*. Université El Hadj Lakhdar Batna. Thèse de Magister.

## Références bibliographiques

---

- **Sanchez M.C, Larrauri J.A. et Saura C.F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76. 270 p
- **Scalbert A. (1999).** Alimentation et vieillissement. Colloque Clermont Ferrand.
- **Scalbert A et Gary W. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *U.K. J. Nutr*, 130. 2073 p.
- **Slimane H. (2010).** La fabrication de lait et ses dérivées au SARL S. Rapport de stage. Université des FrèresMentouri, INATAAConstantine-Algérie. 38 p.
- **Solène J. (2012).** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Mémoire de diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine. 99 p.
- **Song O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes rendus biologies*. 327. 649 p.
- **Sophie T. (2013).** Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Thèse de doctorat en sciences discipline : chimie criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de la Réunion. Université de la Reunion, 62 p.
- **Surveswaran S, Cai Z.Y, Cark H et Sun M. (2007).** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 indian medicinal plants. *Food chemistry*. 102. 938 p.
- **Sylvie M. (2011).** Etude phytochimique et évaluation biologique de *DerrisferrugineaBenth.* (Fabaceae). Thèse de doctorat en chimie biomolécules. Université d'Angers. 63.73 p.
- **Sylvie P. (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez les Maki. Muséum National d'Histoire Naturelle. Thèse de Doctorat.
- **Tigrine C. (2014).** Effets anticancéreux et chimio protecteur de l'extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de *Cléome arabica*. Thèse de doctorat en science. Université Ferhat Abbas Sétif. 34 p.
- **Tlili ML. (2015).** Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire de magister en biologie biochimie et analyse de bioproducts. Université KasdiMerbah – Ouargla. 27.82 p.

## Références bibliographiques

---

- **Touami O. (2016).** Etude des propriétés phyto thérapeutique de la plante médicinale *MalvaSylvestris*. Mémoire de master chimie organique et chimie des matériaux organiques. Université de Larbi Tébessi-Tébessa.13 p.
- **Union internationale pour la conservation de la nature(2011).***Le Thuya de Berbérie*. Découvre la biodiversité du Parc National d’Al Hoceima. Gland, Suisse et Malaga, Espagne.
- **Urquiaga I et Leighton F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress.Biol. Res. 33 (2).
- **Valko. M, Rhodes. C.J, Moncol. J, Izakovic. M, Mazur. M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico biological interactions, 160 (1). 40 p.
- **Velé H. (2015).** Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments, Docteur en Pharmacie. Université d’Anger. 68 p.
- **Yang X, Li J, Li X, She R.et Pei Y. (2005).** Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein like antimicrobial protein from motherwort (*LeonurusjaponicusHoutt*) seeds. Peptides.27. 3122 p.
- **Yeum K.J, Aldini G, Russell R.M. et Krinsky N.I. (2009).**Antioxidant/Pro-oxidant actions of carotenoids. Chapitre 12. Dans: Nutrition and health. Volume 5. Birkhauserverlagbasel. 235 p.
- **Yezza S, Bouchama S. (2014).** Index des métabolites secondaires végétaux. Mémoire de licence biochimie fondamentale et appliquée. Université KasdiMerbah –Ouargla. 10 p.
- **Zeghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d’intérêt économique (*Thymus vulgaris, Rosmarinusofficinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale. Université Mentouri-Constantine. 26.28. 84 p.
- **Zelek L, Latino M.P, Pecollo N, Barrandon E, Czernichow S, Galan P. et Hercberg S. (2010).** Vitamines et micronutriments. Dans: Aider á vivre après un cancer oncologie pratique. Paris: Springer Verlag. 277 p.
- **Zerargui F. (2015).** Activité antioxydante des extraits de racines *Tamuscommunis L.* et caractérisation des substances bioactives. Thèse de Doctorat en Biochimie. Université Farhet Abbes-Sétif 1-Algérie.126 p.

## Références bibliographiques

---

- **Zarrouki N. (2009).** Contribution à l'étude phytochimique de la plante *Tetraclinis articulata*, activité biologique et biochimique de la plante. Mémoire de magister en chimie organique. Université d'Oran. 46 p.
- **Zhang A, Zhou Q Y, Luk Y S, Fung K.P. et Chen K.Y. (1997).** Inhibitory effects of jasmine Green tea epicatechin isomers on free radical induced lysis of red blood cells. Life sciences. 61. 383 p.
- **Zidane Mousaab. (2017).** Recensement des plantes médicinales et aromatiques à travers les massifs forestières de la wilaya de Chleff pour une gestion et préservation durable. (Cas de la forêt de Bissa). Master en foresterie. Université de Tlemcen. 44 p.
- **Zubair M, Bibi Z, Rizwan K, Rasool N, FawadZahoor A. et Riaz M. (2013).** In Vitro Antimicrobial and Haemolytic Studies of *Bambusaarundinaceae* leaves. Journal of Applied Pharmaceutical Science .Vol 3 (04). 111 p.

## **Annexe 1**

La Mc Farland standard 0.5 est une solution utilisée lors de la préparation des inocula bactériens.

Il se prépare en mélangeant 99.5ml d'Acide Sulfurique (0.18M) et 0.5ml de Chlorure de baryum (0.048 M) dans des tubes identiques aux tubes utilisés pour la préparation de l'inoculum. Il faut le stocker dans l'obscurité à une température de 22°C à 25°C.

Après la préparation de la solution, on doit vérifier l'exactitude de la densité de Mc Farland par le spectrophotomètre à longueur d'onde de 625nm devrait être compris entre 0.08 et 0.13. Avant chaque utilisation, agité le tube pour mélanger le fin précipité blanc de Sulfate de Baryum.

## Annexe 2

Gélose de Muller Hinton est une gélose standardisée pour les tests de sensibilité aux antibiotiques et sulfamides.

Pour la préparation de la gélose de Muller Hinton, on a besoin :

- 21g de la poudre du Muller Hinton.
- 25g de l'agar agar.

Les étapes de préparation sont :

1. Dans un bécher, en dissolvant la poudre dans un litre de l'eau distillé, il faut l'homogénéiser et chauffer en agitant.
2. porté à ébullition environ une minute
3. met dans des flacons de verre bien fermé pour stériliser à l'autoclave pendant 15min à 121.1°C.

Pour l'utiliser, laisser le refroidir, puis couler en boite de pétri (25ml par boite) dans un milieu stérile et laisser reposer. Ils sont prête à l'utilisation immédiatement ou stocker à 2°C à 8°C pendant une semaine au plus.

### Annexe 3

Phosphate buffer saline (PBS) est une solution isotonique et non toxique utilisée couramment en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate dipotassique et de chlorure de potassium. Il est utilisé pour lavage ou dilution des cellules.

Pour la préparation de PBS à pH égale à 7.2 on a besoin de :

- 13.21g/l de la base  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
- 20.29g/l de l'acide  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ .
- 80g/l de  $\text{NaCl}$ .
- 2g/l de  $\text{KCl}$ .

Dissoudre les composants dans 500ml de l'eau distillé, en agitant jusqu'il s'homogénéise à l'aide d'un agitateur et conservé à 4°C dans des fioles propre au réfrigérateur, jusqu'au moment de l'utilisation. Il ne faut pas congeler, surchauffés, conditionner dans des fioles présentant une fissure ...etc.

Pour faciliter la préparation, il y a des comprimés commerciaux de tampon PBS qui donner une solution PBS prête à l'emploi après leur dissolution dans une certaine quantité de l'eau.

**Thème: Etude des activités biologiques de la plante médicinale « *Tetraclinis articulata* »**

### Résumé

Dans le but de valoriser les plantes médicinales Algérienne, nous sommes intéressés dans cette étude d'une part, à la caractérisation qualitative et quantitative de l'extrait butanolique de la plante médicinale *Tetraclinis articulata* (EBTA), et d'autre part, à la détermination des activités biologiques.

La première partie concerne la caractérisation chimique de l'EBTA par le screening phytochimique, la chromatographie sur couche mince (CCM) et le dosage des différents métabolites. Le criblage phytochimique a été pu de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des anthocyanes, des flavonols et des flavones, et la présence de ces deux derniers métabolites a été confirmée par la CCM.

Quantitativement le dosage des flavonoïdes, des flavonols et des proanthocyanidines dans l'EBTA a montré une teneur de  $19,25 \pm 0,07$  mg EQ/ g E,  $13,6 \pm 1,6$  mg EQ/ g E et  $2246,56 \pm 5,20$  mg EC/ g E respectivement.

La deuxième partie a été consacrée à l'étude de l'activité antioxydante, antibactérienne, anticoagulante et antihémolytique de l'EBTA. Concernant l'activité antioxydante, le résultat obtenu a révélé une très grande activité en comparaison à la littérature, avec une IC50 de 0,04 mg/ml. L'EBTA agissent de façon très active contre les souches de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. La CMI de l'extrait a été estimé à 10 mg/ml pour toutes les souches étudiées, de plus, *Echerichia coli* est la seule souche qui présente un effet synergique en combinaison avec la pénicilline. L'activité antihémolytique de l'EBTA a été avéré plus importante. De même, l'effet anticoagulant a été avéré plus intéressant pour la voie endogène avec un temps de coagulation de 55,4 s contre un témoin positif à 39,97 s.

**Mots clés:** Activité antibactérienne, Activité anticoagulante, Activité antihémolytique, Activité antioxydante, Flavonoïdes, *Tetraclinis articulata*.

**Laboratoire pédagogique, Université Abbès Laghrour kenchela**

**Topic: Study of the biological activities of the medicinal plant “*Tetraclinis articulata*”**

**Abstract**

In the aim of developing the Algerian medicinal plants, we are interested in this study on the one hand, with the qualitative and quantitative characterization of the extract butanolic of the medicinal plant *Tetraclinis articulata* (EBTA), and on the other hand, with the determination of the biological activities.

The first part relates to the chemical characterization of the EBTA with the phytochemical screening, thin layer chromatography (CCM) and the determination of different metabolites. The phytochemical screening was able to highlight the presence of the flavonoïdes, the anthocyanes, flavonols and flavones, and the presence of these two last metabolites was confirmed by the CCM.

Quantitatively the proportioning of the flavonoïdes, flavonols and the proanthocyanidines in the EBTA showed a content of  $19,25 \pm 0,07$  Mg EQ/G E,  $13,6 \pm 1,6$  Mg EQ/G E and  $2246,56 \pm 1,182$  Mg EC./G E respectively.

The second part was devoted to the study of the antioxydant, antibacterial, anticoagulant and antihemolytic activity of the EBTA. Regarding the antioxidant activity, the result obtained revealed a very high activity in comparison with the literature, with a IC50 of 0,04 mg/ml. EBTA is very active against strains of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The CMI of the extract were estimated at 10 mg/ml for all the studied stocks, moreover, *E.coli* is the only stock which presents a synergistic effect in combination with penicillin. The antihemolytic activity of the EBTA was proven more significant. The same of the anticoagulant effect of the EBTA which was proven to be more interesting for the endogenous way with a time of coagulation of 55,4 s against a positive witness with 39,97 s

---

**Key words:** antibactérienne, anticoagulant, antihemolytic, antioxydant, flavonoïdes, *Tetraclinis articulata*.

**Laboratory of the university Abbès Laghrour –khenchela-**

## ملخص

من اجل اعطاء قيمة للنباتات الطبية الجزئية, نحن مهتمون في هذه الدراسة من جهة بالوصف النوعي و الكمي للمستخلص البيتانولي للنبتة *Tetraclinis articulata*, ومن جهة ثانية بتحديد انشطتها البيولوجية.

الجزء الاول يتعلق بالوصف الكيميائي للمستخلص البيتانولي للنبتة *Tetraclinis articulata* بواسطة الفحص الكيميائي النباتي, كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) و تقدير كميات مختلف مكونات الايض. كان الفحص الكيميائي قادرا على تحديد وجود الفلافونات, الانثوسيانينات, الفلافونولات و الفلافانات. وجود مادتي الايض الاخيرتين اكدته فحص CCM.

كميا, تقدير كمية الفلافونات, الفلافونولات و البروانتوسيانينات في المستخلص البيتانولي للنبتة *Tetraclinis articulata* اظهر قيمة  $0.07+19.25$ ,  $1.6+13.6$  و  $5.20+2246.56$  ملغ بما يكافئ الكارستين / غ من المستخلص على التوالي.

الجزء الثاني خصص لدراسة النشاط المضادة للاكسدة, المضاد للجراثيم, المضاد لتخثر الدم و المضاد لتحلل الدم للمستخلص البيتانولي للنبتة *Tetraclinis articulata*. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للاكسدة, النتيجة المتحصل عليها اظهرت نشاط كبير بالمقارنة مع الابحاث السابقة, مع  $IC_{50}$  ب  $0.04$  ملغ/مل. المستخلص البيتانولي للعرعارتفاعل بشكل نشط جدا ضد *P.aeruginosa*, *S.aurus*, *L.monocytogene*, *K,pneumonie* و قدرت CMI ب  $10$  ملغ/مل لجميع البكتيريات المدروسة, بالاضافة الى ذلك *E.coli* هي البكتيريا الوحيدة التي اظهرت مفعول تعاوني مع البنسيلين. وجد ان المفعول المضاد للتخثر مثير للاهتمام بالنسبة للمسار الداخلي مع وقت تخثر  $55.4$  د بالمقارنة مع شاهد ايجابي  $39.97$  د. ايضا , بالنسبة للنشاط المضاد لتحلل الدم للمستخلص البيتانولي للنبتة *Tetraclinis articulata* الذي وجد انه مهم جدا.

**الكلمات المفتاحية:** النشاط المضاد للبكتيريا, المضاد لتحلل الدم, المضاد للتخثر و المضاد للاكسدة, الفلافونويدات *Tetraclinis articulata*.

**Thème: Etude des activités biologiques de la plante médicinale « *Tetraclinis articulata* »**

### Résumé

Dans le but de valoriser les plantes médicinales Algérienne, nous sommes intéressés dans cette étude d'une part, à la caractérisation qualitative et quantitative de l'extrait butanolique de la plante médicinale *Tetraclinis articulata* (EBTA), et d'autre part, à la détermination des activités biologiques.

La première partie concerne la caractérisation chimique de l'EBTA par le screening phytochimique, la chromatographie sur couche mince (CCM) et le dosage des différents métabolites. Le criblage phytochimique a été pu de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des anthocyanes, des flavonols et des flavones, et la présence de ces deux derniers métabolites a été confirmée par la CCM.

Quantitativement le dosage des flavonoïdes, des flavonols et des proanthocyanidines dans l'EBTA a montré une teneur de  $19,25 \pm 0,07$  mg EQ/ g E,  $13,6 \pm 1,6$  mg EQ/ g E et  $2246,56 \pm 5,20$  mg EC/ g E respectivement.

La deuxième partie a été consacrée à l'étude de l'activité antioxydante, antibactérienne, anticoagulante et antihémolytique de l'EBTA. Concernant l'activité antioxydante, le résultat obtenu a révélé une très grande activité en comparaison à la littérature, avec une IC50 de 0,04 mg/ml. L'EBTA agissent de façon très active contre les souches de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. La CMI de l'extrait a été estimé à 10 mg/ml pour toutes les souches étudiées, de plus, *Echerichia coli* est la seule souche qui présente un effet synergique en combinaison avec la pénicilline. L'activité antihémolytique de l'EBTA a été avéré plus importante. De même, l'effet anticoagulant a été avéré plus intéressant pour la voie endogène avec un temps de coagulation de 55,4 s contre un témoin positif à 39,97 s.

**Mots clés:** Activité antibactérienne, Activité anticoagulante, Activité antihémolytique, Activité antioxydante, Flavonoïdes, *Tetraclinis articulata*.

**Laboratoire pédagogique, Université Abbès Laghrour kenchela**

# ***INTRODUCTION***

**CHAPITRE I.**  
**REVUE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

**CONCLUSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

# **ANNEXE**

***CHAPITRE II.***

***MATERIEL***

***ET***

***METHODES***

**CHAPITRE III**  
**RESULTATS ET**  
**DISCUSSION.**