

Republique Algerienne Democratique Et Populaire  
Ministere De L'enseignement Superieure  
Et De La Recherche Scientifique

Universite Mouhamed Boudiaf  
Faculte Des Sciences  
Departement De Chimie

N° d'ordre :.....

Série :.....



Domaine : Sciences de  
la Matière  
Filière : Chimie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master  
Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Intitulé

*Etude phytochimique et activité  
antioxydante des extraits du Juniperus  
oxycedrus*

Présenté par :

Negreche Soumia

Benattia Ahlem

*Devant le jury :*

<b>Président :</b>	H. Bouleghlem	M.A. Univ. Mouhamed Boudiaf	M'sila
<b>Examinatrice :</b>	S. Mohamadi	M.C. Univ. Mouhamed Boudiaf	M'sila
<b>Encadreur :</b>	O.Belhaddad	M.C. Univ. Mouhamed Boudiaf	M'sila

*Soutenu le 11/07/2019*

## **REMERCIEMENTS**

*Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.*

*Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre directrice de notre recherche Mme Belhaddad Oumelkheir, nous la remercions de nous avoir encadrés, orientés, aidés et conseillés.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mr BOULEGHLEM Hocine et Mme MOHAMADI Sabrina pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions,*

*Nous adressons aussi nos remerciements à toute l'équipe du laboratoire de Chimie et tous les enseignants, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à nous rencontrer et répondre à nos questions durant nos recherches.*



## *Dédicace*

*Je tiens à remercier en premier lieu dieu le tout puissant qui m'a donné le courage et la patience et qui a éclairé mon chemin pour achever ce travail.*

*Je tiens à remercier profondément mes chères parents qui m'ont toujours encouragé et poussé à réussir, pour tout ce qu'ils m'ont donné, leur aide éternel  
et leur amour.*

*Mes frères Abdllatif, Abdraouf, Badreddine et Zineddine*

*Ma soeur Meriem*

*Mes proches amies et tous ceux qui de près ou loin ont contribué à la réalisation de ce travail.*



*Soumia*



*Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

A ma Chère Mère Wahiba

A mon Père Zin Abidin

A mes Frères et ma Sœur

Mouhamed, Ziad, Islem, Randa

À La famille Ben Attia

A tous les gens m'aiment

**AHLEM**

## Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux antioxydants à partir de sources naturelles, le présent travail s'intéresse à la détermination des constituants phytochimiques et leurs richesses en composés phénoliques, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Juniperus oxycedrus*. *J. oxycedrus* possède de nombreuses propriétés pharmacologiques et thérapeutiques. Le screening phytochimique a révélé la présence de différents groupes de métabolites secondaires dans les feuilles de la plante tels que, les alcaloïdes, flavonoïdes, tannins, triterpènes, glucides. L'évaluation du contenu en polyphénols montre que les teneurs en ce composé varient entre 279.29 et 11.6  $\mu\text{g}$  EAG/ mg d'extrait. Des teneurs maximales ont été détectées dans l'extrait brut (  $279.29 \pm \mu\text{g}$  EAG/mg). De même le contenu en flavonoïdes des extraits varient entre 14.46 et 2.82  $\mu\text{g}$  EQ/ mg d'extrait. La teneur maximale est enregistré dans l'extrait d'acétate d'éthyle (  $14,46 \pm 0.65 \mu\text{g}$  EQ/mg). L'analyse de ces extraits chromatographie sur couche mince par a révélé la richesse de fraction acétate d'éthyle en flavonoïdes, ce qui confirme les résultats du dosage par la méthode d' $\text{AlCl}_3$ . L'activité antioxydante des extraits a été déterminée, par le test de DPPH l'extrait brut enregistre la plus grande capacité de piéger le radical DPPH avec une plus faible valeur d' $\text{IC}_{50}$  (  $2.67 \pm 0,087\text{mg/ml}$ ).

**Mots clés:** *Juniperus oxycedrus*, Activité antioxydante, Plantes médicinales, polyphénols, flavonoïde, CCM.

## المخلص

في اطار البحث على مضادات للأكسدة جديدة عن طريق مصادر طبيعية في هذه الدراسة تم تحديد مكونات الكيمائية النباتية وتقييم نشاط مضادات الأكسدة في المستخلصات وغناها في المركبات الفينولية في أوراق لنبته العرعر الشربيني. لنبته العرعر الشربيني العديد من الخصائص الدوائية و العلاجية و أهمها مضادات الأكسدة . بسبب هذه الأهمية تم تحليل الأوراق للدراسات الكيمائية النباتية الأولية . كشف الفحص الكيمائي النباتي وجود مختلف مجموعات من الأيضات الثانوية في الأجزاء العلوية للنبات مثل الألكلويد. الفلافونويد. التانان . التريتربان السكريات . وفي هذا السياق حاولنا تقدير كمية المركبات الفينولية لهذه النبتة حيث من خلال النتائج المتحصل عليها يظهر لنا جليا وجود المركبات الفينولية بكميات متقاربة بين (279.29 و 11.6 ميكروغرام /م غ مكافئ لحمض الغاليك).حيث ان أكبر كمية سجلت لدى مستخلص الخام (279.27 ميكروغرام /م غ مكافئ لحمض الغاليك ) بينما كانت كمية الفلافونويدات في المستخلصات تتراوح بين 14.46 و 2.82 ميكروغرام /م غ مكافئ للكارسيتين .حيث سجلت أكبر كمية عند مستخلص أسيتات الايثيل (0.65±14.46 ميكروغرام /م غ مكافئ للكارسيتين) . تحليل المستخلصات بواسطة كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة كشفت على وجود كمية معتبرة من الفلافونويدات في مستخلص أسيتات الايثيل مما يؤكد النتائج التحاليل الكيمائية الكمية.و تبين أن مستخلص الخام لديه أعظم قدرة على تثبيط جذر مع قيمة صغيرة (0.087 ±2.67مليغرام/ملييلتر).

**كلمات مفتاحية :** العرعر الشربيني<sup>3</sup> مركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة<sup>4</sup> النباتات الطبية المركبات الفينولية الفلافونويدات<sup>5</sup> كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة

### *çListe des abréviations*

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**DPPH :** Radical 1,1-diphényl 2-picrylhydrazyl.

**EAG :** Equivalent en acide gallique

**EOA :** Espèce oxygénée activée

**EQ :** Equivalent en quercétine

**ERA :** espèces réactives de l'azote

**ERO :** espèces réactives de l'oxygène.

**NADPH:** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NADH :**Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

**OX :**xanthine oxydase

**RL :** Radical libre

**SOD :** Peroxyde dismutase.

**UV:** Ultra violet

## Sommaire

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

#### Chapitre I -les métabolite secondaire

1.Généralité.....	02
2.Classification.....	02
2.1. Familles des polyphénols.....	02
2.1.1. Acides phénoliques.....	03
2.1.2. Les flavonoïdes.....	04
2.1.3.Tannins.....	06
2.2 . alcaloïdes.....	08
2.3. huiles essentielles.....	09
2.4. terpénoïdes.....	09

#### Chapitre II : Plante médicinale étudiée

1.Répartition géographique de l'espèce <i>juniperus oxycedrus</i> .....	11
2. Description botanique de <i>juniperus oxycedrus</i> .....	12
3.Classification botanique de <i>juniperus oxycedrus</i> .....	13
4.Composition chimique.....	13
5.Utilisation traditionnelles.....	13

#### Chapitre III :Activité antioxydant

1.Généralité.....	14
2.Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA).....	14

2.1. Qu'est-ce qu'un radical libre ?.....	14
2.2. Classification botanique de <i>Juniperus oxycedrus</i> .....	14
3. Sources des radicaux libres.....	15
3.1. Sources endogènes .....	15
3.2. Sources exogènes .....	16
4. Dommages oxydatifs des radicaux libres.....	16
5. Moyens de défense contre les radicaux libres (les antioxydants).....	16
6. Type des antioxydants.....	17
6.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques).....	17
6.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques) .....	17

## *PARTIE EXPERIMENTALE*

### **Chapitre I: Matériels et méthodes**

1. Matériel végétal.....	19
2. Les Méthodes.....	19
2.1. Méthodes d'extraction.....	19
2.2. Criblage phytochimique.....	22
2.3. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	23
3. Dosage des polyphénols .....	25
4. Dosage des flavonoïdes.....	25
5. Etude de l'activité antioxydante par Test de DPPH.....	26

### **Chapitre II :Résultats et discussion**

1. Caractérisation des extraits obtenus.....	28
----------------------------------------------	----

2.Résultats phytochimique.....	29
3.Chromatographie sur couche mince (CCM).....	31
4.Dosage des composés phénoliques.....	33
4.1.Dosage des polyphénols totaux.....	33
4.2.Dosage des flavonoïdes.....	34
5.Pouvoir antioxydant évalué par le test DPPH.....	37
<b>Conclusion.....</b>	<b>40</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> La structure générale acide hydroxybenzoïque.....	03
<b>Figure 02:</b> La structure générale acide hydroxy_cinnamique.....	03
<b>Figure 03:</b> Structure générale des flavonoïdes.....	04
<b>Figure 04:</b> Structures de l'acide gallique et ellagique.....	07
<b>Figure 05:</b> Structure des tanins condensés.....	07
<b>Figure 06:</b> Quelques exemples des alcaloïdes.....	08
<b>Figure 07:</b> Structure chimique de l'isoprène.....	10
<b>Figure 08:</b> Structure de quelques monoterpènes.....	10
<b>Figure 09</b> Répartition du genre <i>Juniperus</i> dans le monde.....	11
<b>Figure 10:</b> Morphologie de <i>Juniperus oxycedrus</i> .....	12
<b>Figure11:</b> Les processus de formation des ERO et ERA.....	15
<b>Figure 12 :</b> Arbustes de genévrier oxycèdre.....	19
<b>Figure 13:</b> Protocole de l'extraction solide-liquide (macération).....	20
<b>Figure 14:</b> Les étapes du fractionnement de l'extrait brut des plantes étudiées.....	21
<b>Figure15 :</b> Mode de dépôt pour une CCM.....	24
<b>Figure 16 :</b> Développement du chromatogramme.....	24
<b>Figure17 :</b> Image de la fixation des ions $Al^{3+}$ sur les atomes d'oxygène.....	26
<b>Figure 18 :</b> Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant.....	27
<b>Figure19:</b> Les images des quelques résultantes de la réaction de caractérisation des principaux métabolites secondaires.....	30
<b>Figure20 :</b> CCM des différents extraits observés sous UV.....	31
<b>Figure 21:</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	33

<b>Figure22:</b> Le teneur en phénoliques des différents extraits.....	34
<b>Figure 23 :</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	35
<b>Figure24:</b> Le teneur en flavonoïdes des différents extraits.....	36
<b>Figure 25:</b> Pourcentage d'inhibition % en fonction de différentes concentrations des extraits.....	38
<b>Figure 26:</b> valeurs IC <sub>50</sub> d'extraits pour l'activité piégeant les radicaux libre par la méthode deDPPH.....	39

## Liste des tableaux

<b>Tableaux1:</b> La structure des principales classes des flavonoïdes.....	05
<b>Tableau 2 :</b> Résultat de différentes quantités, rendements et couleurs d'extrait de <i>J. oxycedrus</i> .....	29
<b>Tableau 3 :</b> Résultats des tests phytochimiques du <i>Juniperus oxycedrus</i> .....	30
<b>Tableau 4:</b> Relation entre la fluorescence et structure des flavonoïdes.....	32
<b>Tableau 5:</b> Préparation de courbe standard à l'aide d'acide gallique.....	33
<b>Tableau 6:</b> Préparation de courbe standard à l'aide de quercétine.....	35

# **Introduction**

### Introduction générale

Depuis de nombreuses années, les plantes médicinales jouent un rôle important dans la médecine et la pharmacologie. Aujourd'hui, on estime qu'environ 80% de la population mondiale repose sur des préparations botaniques comme médicaments pour répondre à leurs besoins de santé (Ogbera et *al.*, 2010).

Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes et antimicrobiennes d'origine végétale (les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols), pour remplacer celles de synthèse en raison des risques toxicologiques potentiels (Athamena et *al.*, 2010). En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (koechlin-ramonatxo et *al.*, 2006).

Différentes espèces de genévrier ont été utilisées dans la médecine traditionnelle depuis des siècles comme des diurétiques, des remèdes pour l'indigestion et comme une ressource de goudron (Medini et *al.*, 2009). *J. Oxycedrus* fait l'objet de recherches récentes dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire. Des études phytochimiques portées sur le *Juniperus* ont démontré la présence d'une grande diversité de métabolites secondaires avec une variété d'effets pharmacologiques.

Dans ce contexte, s'inscrit le présent nous travail de recherche dont le but principal est de quantifier les composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) et l'évaluation de l'activité antioxydante du *Juniperus oxycedrus*.

Notre travail est organisé en trois chapitres principaux, dont le premier est celui de recherches bibliographiques qui résumant les différentes familles des composés phénoliques, ainsi que les principaux travaux réalisés sur l'espèce *Juniperus oxycedrus*.

Dans le chapitre matériels et méthodes nous avons présentées les différentes méthodes d'extraction et les protocoles utilisés dans les dosages et l'évaluation de activités biologique testée dans ce travail.

Les résultats issus de ce travail sont présentés et discutés dans le chapitre résultats et Discussions. En fin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

# **Partie bibliographique**

# **Chapitre I**

## **Les métabolites secondaires**

## **1. Généralité**

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés qui sont très inégalement répartis chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevées. La notion de « métabolite secondaire » résultait initialement de trois groupes d'observations : d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie même de la plante, ensuite une répartition très inégale selon les végétaux, quelquefois entre des espèces ou variétés à l'intérieur d'une même espèce, une certaine « inertie biochimique » car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées. Ils ont de structure chimique souvent complexe, qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines de la pharmacologie ou de l'agroalimentaire (Macheix et al., 2005).

## **2. Classification**

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

Les composés phénoliques

Les alcaloïdes et composés azotés

Les composés terpéniques

### **2.1. Familles des polyphénols**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux, ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix et al., 2005).

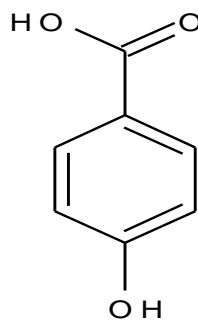
D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (Macheix et al., 2005).

### 2.1.1. Acides phénoliques

Ce sont des composés phénoliques possédant une fonction acide en plus de la fonction phénol. Ils sont représentés par deux sous classes :

- **Acides hydroxybenzoïques:**

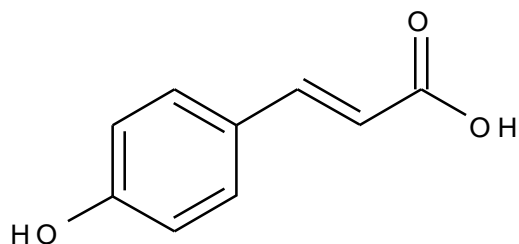
Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, composés d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone. Ces composés sont universellement distribués dans le règne végétal, on trouve l'acide gallique, protocatechuique, vanillique et syringique (Crozier et *al.*, 2006).



**Figure1** : La structure générale acide hydroxybenzoïque.

- **Acides hydroxycinnamiques :**

Ces composés ont une distribution très large, rarement libre, ils sont souvent estérifiés Et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres ou des polyols tels que L'acide quinque (Skerget et *al.*, 2005). Ce sont des composés aromatiques avec trois carbones latéraux dans la chaîne C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> dont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide coumarique et l'acide sinapique sont les plus connus.



**Figure 2:** La structure générale acide hydroxycinnamique.

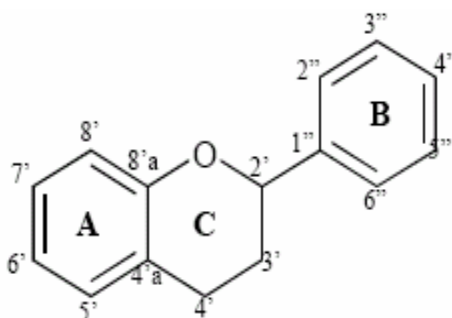
Les acides phénoliques possèdent des propriétés biologiques intéressantes : anti-inflammatoires, antiseptiques, immunostimulants (Hennebelle et *al.*, 2004), antioxydants (Bossokpi, 2002). Le mieux caractérisé pharmacologiquement, est l'acide caféique qui se

montre très efficace contre les virus, les bactéries et les champignons (Cowan, 1999). L'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris in vitro et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (Rangkadilok et al., 2007).

### 2.1.2. Les flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les feuilles, les graines, de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006).

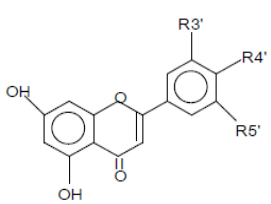
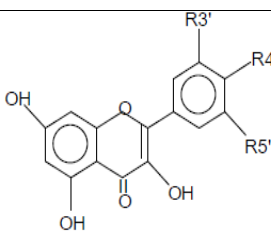
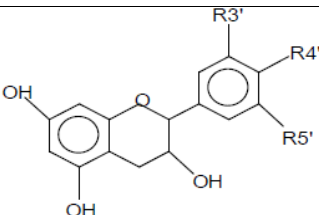
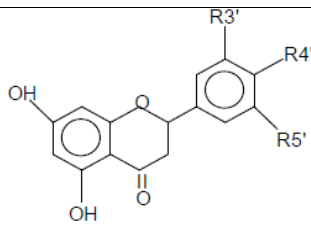
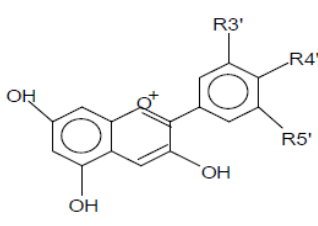
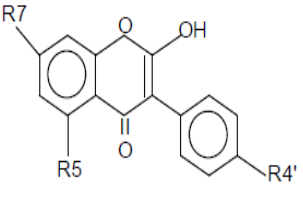
Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata et al., 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> de type phényl-2-benzopyrane (Yao et al., 2004).



**Figure3:** structure générale des flavonoïdes.

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (Yao et al., 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : flavones, flavonols, anthocyanidines, flavanones, flavanols et isoflavones (Tsao et al., 2010).

**Tableaux 1:** la structure des principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al*, 2001; w-erdman *et al*,2007)

Classes	Structure chimique	R'3	R'4	R'5	Exemple
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH <sub>3</sub>	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R7	R5	R'4	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-glu	OH	Daidezine

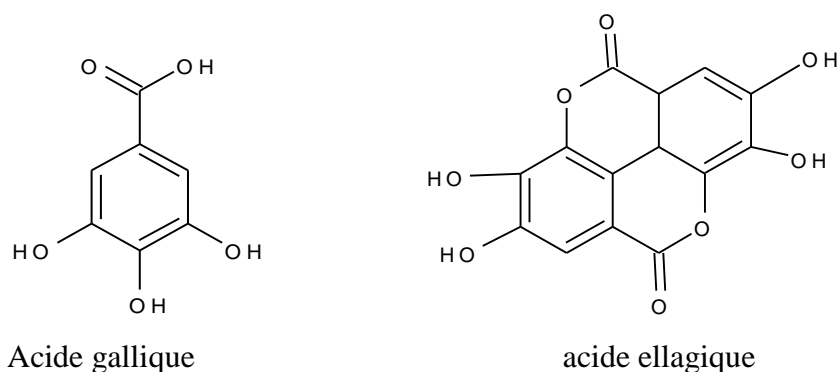
Les flavonoïdes peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes (Hodek *et al.*, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van acker *et al.*, 1996 ; Benavente-garcia *et al.*, 1997). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygenase, la phospholipase et la cyclooxygenase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-hiv) (Anderson *et al.*, 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion.

### 2.1.3. Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire compris entre 500 et 3000 qui présente, à coté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvé dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

#### ➤ *Tanins hydrolysables*

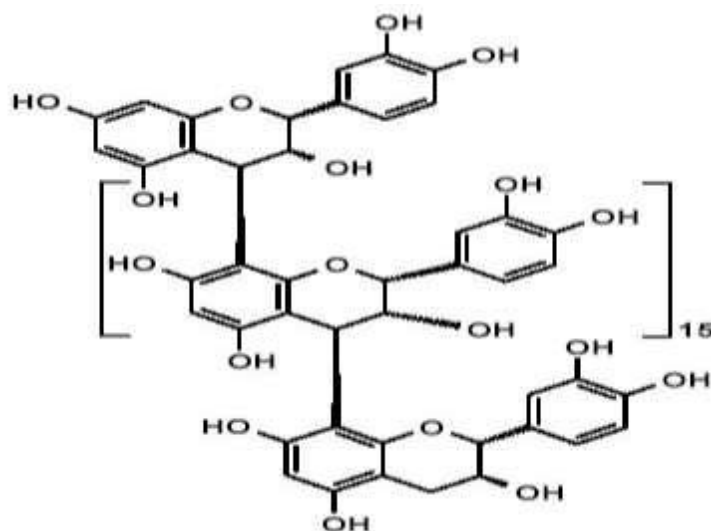
Sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le d-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).



**Figure 4:** structures de l'acide gallique et ellagique (Packer, 2001).

### ➤ Tanins condensés

Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> et C<sub>6</sub> (Bruyne et al., 1999 ; o'connell et fox, 2001). Ils diffèrent fondamentalement des tannins galliques et ellagiques, ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et sont non hydrolysable (Paris et hurabielle, 1981).



**Figure 5:** structure des tanins condensés

Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux de gorge, les problèmes de sécrétions trop importantes, les infections internes ou externes, blessures, coupures et brûlures (Bruneton., 1999). En outre, les tanins ont un très grand pouvoir antibactérien (Mahamat et al., 1995), et antiviral (Nonaka., i. Nishioka et al., 1990) et anti-inflammatoire ( Mota R., Thomas G., Barbosa Filho J.M.al, (1985))

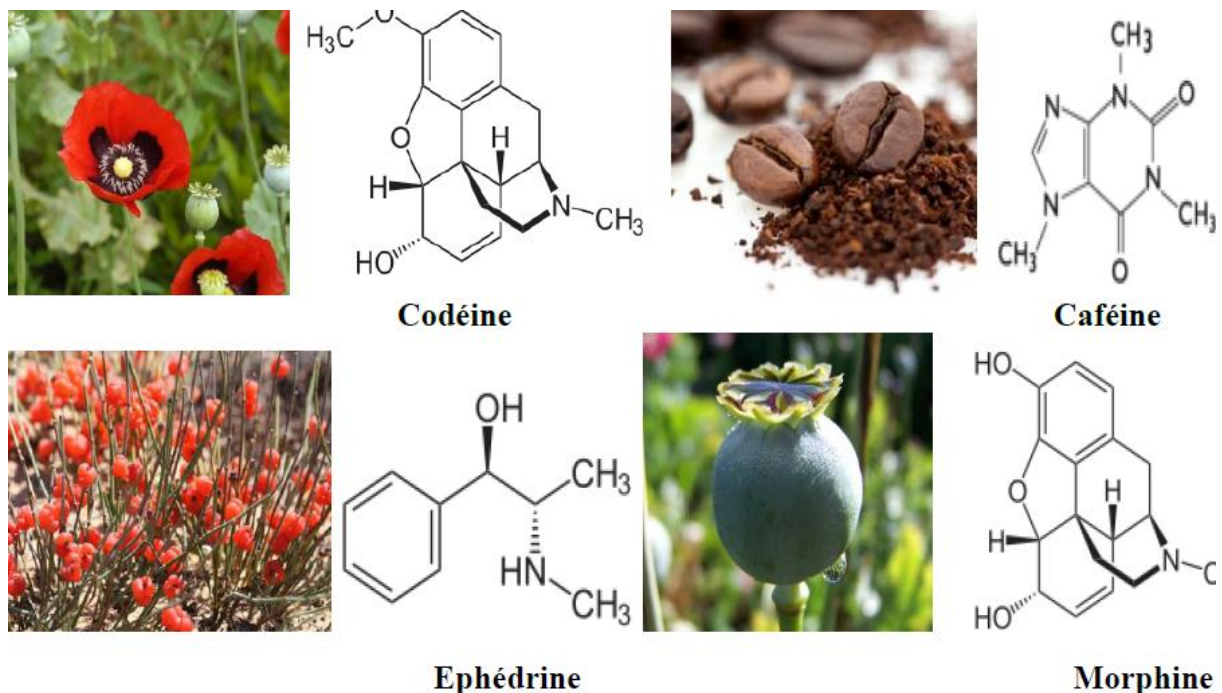
## 2.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées, basiques, leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique (Bruneton, 1999). Cet atome d'azote provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. On distingue généralement :

*Les alcaloïdes vrais*, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle : exemple la strychnine dérivée du tryptophane.

*Les proto-alcaloïdes*, qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine).

*Les pseudo-alcaloïdes*, qui ne dérivent pas d'acides aminés (exemple : la caféine)



**Figure 6:** Quelques exemples des alcaloïdes (Badiaga, 2011).

Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, ils affectent chez l'être humain le système nerveux, les alcaloïdes jouent plusieurs activités pharmacologiques: analgésique (cocaïne), anticholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), dépressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaïne),

(morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (éphédrine), plusieurs alcaloïdes servent de model pour la synthèse d'analogues avec des propriétés meilleures (Bhat, 2005).

### **2.3. Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes (Belaiche P. (1979), . Valnet J. (1984). . Wichtel M. and Anton R. (1999)).

Les huiles essentielles n'existent quasiment que dans les végétaux, elles peuvent être stockées dans tous les organes des plantes aromatiques (les fleurs, les feuilles, fruits, tiges, rhizomes et racines, les graines, le bois et l'écorces) (Teixeira et al., 2013).

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique utilisée, il s'agit de groupe des terpénoïdes d'une part et groupe des composés aromatiques dérivés de phényl propane, ce dernier est beaucoup moins fréquent (Bruneton, 1993).

Les plantes aromatiques utilisent les huiles essentielles pour se protéger des virus, la plus parts pensent que c'est une hormone végétale, mais d'autres considèrent que les huiles sont des messagers entre parasites et microbes (willem, 2009).

Leur application est dans les inhalant, les embrocations et les savons. Elles peuvent également être utilisées pour leur activité antiseptique et antimicrobienne. Les pommades, crèmes, gels à base d'huiles essentielles sont destinés à soulager les entorses, les courbatures, les allergies articulaires ou musculaires et sont administrées par voie externe (Mapola, 2003).

### **2.4. Les terpénoïdes**

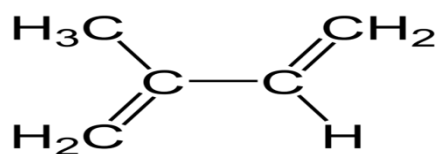
Les terpènes constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organique des végétaux, avec près de 15.000 structures moléculaires connues. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui les composent ainsi

Que dans les divers modes d'assemblage, on distingue ;

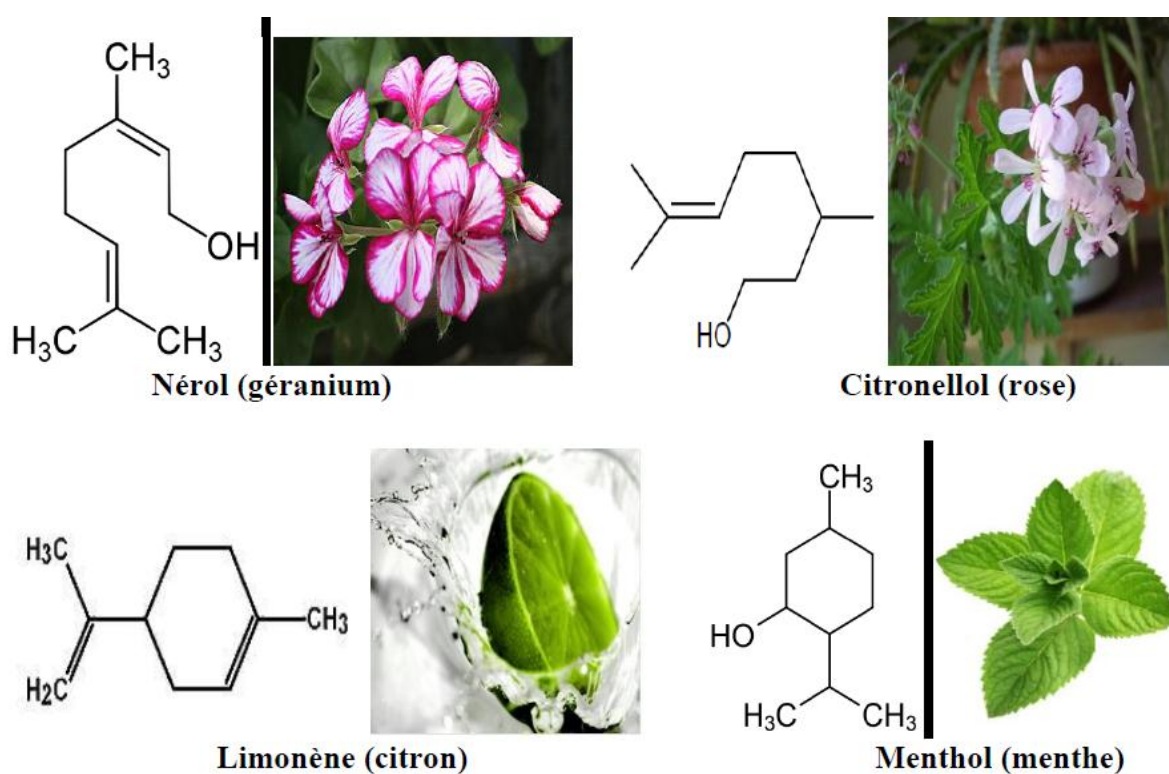
- les monoterpènes à 10 atomes de carbone.
- les sesquiterpènes à 15 atomes de carbone.

- les diterpènes à 20 atomes de carbone.

- les triterpènes à 30 atomes de carbone et les tétraterpènes à 40 atomes de carbone (Belbache, 2008).



**Figure07:** Structure chimique de l'isoprène (Bakkali et al.,2008)



**Figure 8:** Structure de quelques monoterpènes (Ayad, 2008 ; Belbache, 2003).

Les triterpènes sont caractérisés par une diversité structurale remarquable. Cette diversité chimique se traduit par des propriétés biologiques et pharmacologiques variées et des potentialités thérapeutiques dans les domaines les plus divers : cyostatiques, antiviraux, anti-inflammatoire, cytoprotectives, imminomodulatrices, analgésiques et antifongiques (Bruneton, J., 1999).

# **Chapitre II**

## **Plante médicinale étudiée**

## 2. Description botanique de *Juniperus oxycedrus*

Le nom « *oxycedrus* » provient de deux mots grec « oxys » et « cedros » qui signifient respectueusement aigu et cèdre, c'est-à-dire « cèdre à feuille épineuse » (Garnier et al., 1961). C'est un arbrisseau ou arbuste dressé de 1 à 8 mètres, à bourgeons écailleux et à Ranules obtusément triangulaire, feuilles très étalées, verticillées, toutes linéaires en alène à Pointe fine et piquantes articulées, non décurrentes, marquées de deux sillons blanchâtres Séparées par nervure médiane en dessus et à carène obtuse et non sillonnées en dessous fleurs dioïques, fruits rouge et luisants à la maturité, assez gros (Chaouche, 2013). Il pousse dans les forêts des régions côtières méditerranéennes (du Maroc à l'Iran) et préfère les endroits pierreux (Klimko et al., 2007 ; Mansouri et al., 2010).



**Figure 10:** morphologie de *Juniperus oxycedrus* L.

### **3. Classification botanique de *Juniperus oxycedrus* (Klimko et al., 2007)**

Règne: plantes

Ordre: coniférales

Famille : cupressacées

Genre : *Juniperus*

Espèce : *Juniperus oxycedrus*

- En arabe : taga, Aar'Ar

-En français : cadier, cade genévrier oxycèdre, petite cèdre

#### **1. Répartition géographique de l'espèce *Juniperus oxycedrus***

*Juniperus oxycedrus* est une espèce typique de la région méditerranéenne, sa répartition s'étend dans l'Afrique du nord (Maroc, Algérie et la Tunisie). Il se trouve aussi en Espagne, en France, en Italie, en Portugal, en Turquie, dans la péninsule Balkanique, et Aussi dans l'Est du caucase et au Nord de l'Iran. C'est une espèce qui se développe sur des Pentes sèches, mais elle est rare sur les dunes de sable. Elle apprécie les lieux arides, Rocailleux, sur calcaire ou sur sols acides, où il est fréquemment associé au chêne vert et au Chêne kermès (Farjon, 2005) in (Brus et al, 2011).

#### **4. Composition chimique**

Les plantes appartenant au genre *Juniperus* contiennent divers composés tel que les composés phénolique (polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins...) (Innocenti et al., 2007 ; Miceli et al., 2009 ; Taviano et al., 2013) et les terpénoides (huiles essentielles, sesquiterpenoides, diterpénoides, et autres terpènes) (Loizzo et al., 2007 ; Seca et al., 2008 ; Orav et al., 2010 ; Marija et al., 2011).

#### **5. Utilisation traditionnelles**

En médecine traditionnelle, cette plante est utilisée dans le traitement de diverses maladies telles que l'hyperglycémie, l'obésité, la tuberculose, la bronchite et la pneumonie

(Swanston- flatt et *al.*,(1990) ; Sancher et *al.*,(1994)), il est également utilisé sous forme de décoction pour le traitement des troubles gastrique et comme un analgésique buccal (Fernandez et *al.*, 1996). Ce genre était utilisé comme panacée, ses fumigations étaient réputées désinfectantes (notamment utilisées dans les rues pour combattre les épidémies de peste et de choléra) et le « vin de genièvre » avait des vertus diurétiques. Il est utilisé en dermatologie humaine comme antiseptique et parasiticide pour traiter, sous forme de pommade l'eczéma chronique et certaines affections de la peau (dont la gale), aujourd'hui cette huile essentielle est également recommandée pour soigner les animaux domestiques en cas d'affections du cuir chevelu et comme vermifuge (Bouhlal et *al.*, 1988 ; Tavares et *al.*, 2012 ; Becker et *al.*, 1982).

# **Chapitre III**

## **Activité antioxydante**

## 1. Généralité

Les organismes aérobies puisent leur énergie en oxydant de la matière organique via la chaîne respiratoire. L'oxygène est indispensable comme substrat majeur, mais peut être également une source d'agression pour ces organismes. Des dérivés hautement réactifs de l'oxygène (ERO) de nature radicalaire ou non, peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons UV, des radiations ionisantes et de métaux de transition (Morelle, 2003).

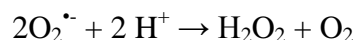
## 2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA)

### 2.1. Qu'est ce qu'un radical libre ?

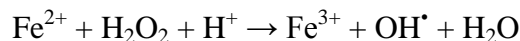
Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un électron célibataire qui le rend instable et se stabilise au détriment de la molécule voisine qui devient à son tour un radical libre et ainsi de suite (Morelle, 2003).

### 2.2. Classification des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), le peroxyde  $ROO^{\bullet}$  et alkyle  $RO^{\bullet}$ ; soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Le radical superoxyde, un radical modérément réactif, est le substrat d'enzymes essentielles, les superoxydes dismutases (SOD), qui le transforment en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).



Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) réagit avec le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) et produit du fer oxydé ferrique ( $Fe^{3+}$ ) et le radical hydroxyle. C'est la réaction de Fenton :



Le radical hydroxyle ainsi formé est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres (Gardès-albert, 2005). Il existe également d'autres oxydants très puissants, qu'ils soient des radicaux libres ou non. Par exemple, l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) est produit par les globules blancs. Le monoxyde d'azote radicalaire ou  $NO^{\bullet}$  est synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine.

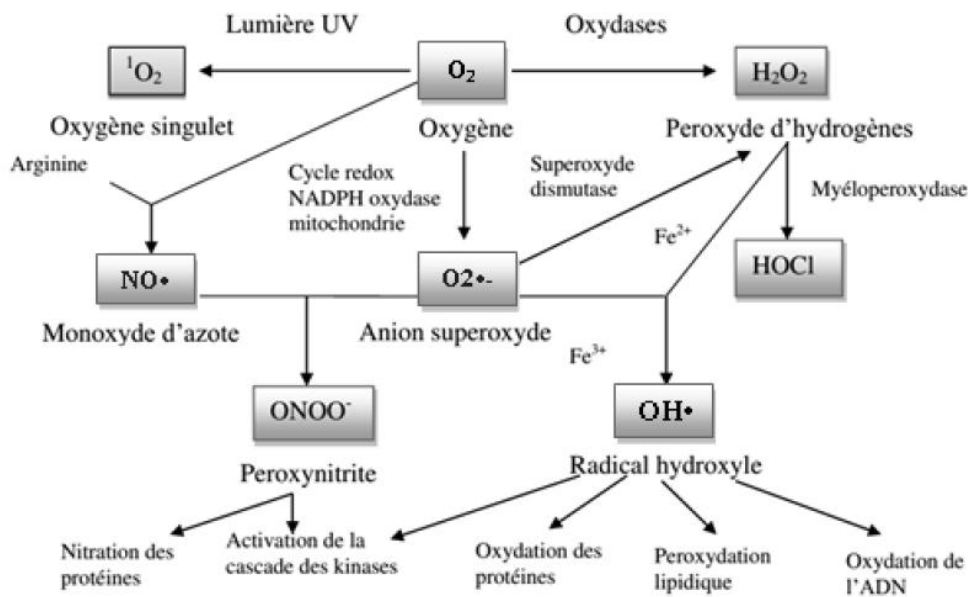


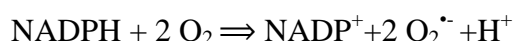
Figure11 : Les processus de formation des ERO et ERA (Favier 2003)

### 3.Sources des radicaux libres

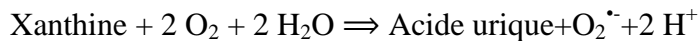
- Sources endogènes

Au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est produit par réaction de l'O<sub>2</sub> avec un radical semi-ubiquinone (Lagourge et Lorsson, 2013). Les complexes, nicotinamide adénine dinucléotide réductase (NADH)-ubiquinone oxydoréductase et l'ubiquinone-cytochrome c réductase, sont alors d'importants complexes membranaires mitochondriaux qui peuvent générer d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang et Gutterman, 2007 ; Grivennikova et Vinogradov, 2013).

Les cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. La NADPH oxydase phagocytaire joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Guzik, 2010 ; Touyz *et al.*, 2010).



La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons en produisant l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (O'Mahony *et al.*, 2013).



- **Sources exogènes**

Dans les circonstances quotidiennes normales, des RLs sont produits en permanence en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense (Yan, 2014). Le tabagisme, poisons environnementaux, alcool et rayonnement ionisant favorisent la génération des RLs (Pickering *et al.*, 2013).

L'irradiation des macromolécules par UVA peut causer la génération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ . L'UVA a été également montré pour induire la formation de  $^1\text{O}_2$ . Les rayonnements ionisants sont bien connus pour induire la production des RLs, l'exposition à des radiations ionisantes conduit à la production de ;  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot-}$  et  $\text{ONOO}^{\cdot-}$  (Franco *et al.*, 2009).

#### **4. Dommages oxydatives des radicaux libres**

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (Rahman, 2002). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (Aurousseau, 2002 ; Valko *et al.*, 2006).

Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies (Aruoma, 1998). Parmi les, nous citons, les maladie d'Alzheimer (Smith *et al.*, 1996 ; smith *et al.*, 2004), de Parkinson (Bolton *et al.*, 2000), de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (Ali *et al.*, 2008), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (Jha *et al.*, 1995), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti *et al.*, 2003) et le cancer (Ali *et al.* 2008).

#### **5. Moyens de défense contre les radicaux libres (les antioxydants)**

##### **5.1. Définition**

D'après Halliwell (1994), un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

## 5.2.Type des antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants :

### ❖ Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

La production physiologique d'EOA est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) Et de protéines (transferrine, ferritine, ...). Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN Endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail et *al.*, 2002).

### ❖ Les antioxydants exogènes ( non enzymatiques )

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

#### Médicaments

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes.

#### Antioxydants naturels

- ***La vitamine C ou acide ascorbique***

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E.

- ***La vitamine E ou tocophérol***

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes.

- ***Le  $\beta$ -carotène***

Outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet.

- **Flavonoïdes**

Les relations structure-activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation.

- **Les tanins**

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

- **Les coumarines**

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les Radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Diallo, 2005).

# **Partie**

# **Expérimentale**

# **Chapitre I**

## **Matériel et méthodes**

## 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude expérimentale est l'espèce végétale *Juniperus oxycedrus* appartenant. L'organe végétal choisi pour la réalisation des expérimentations de cette étude est les feuilles, elles ont été collectées durant le mois de janvier à Djebel Eltolba de Msila. L'identification botanique des espèces a été réalisée au niveau du département d'agronomie de l'Université de Msila par le docteur ZEDAM Abdelghani.



Figure 12 : Arbustes de genévrier *oxycèdre*.

## 2. Méthodes

### 2.1. Méthodes d'extraction

#### 2.1.1. Décoction

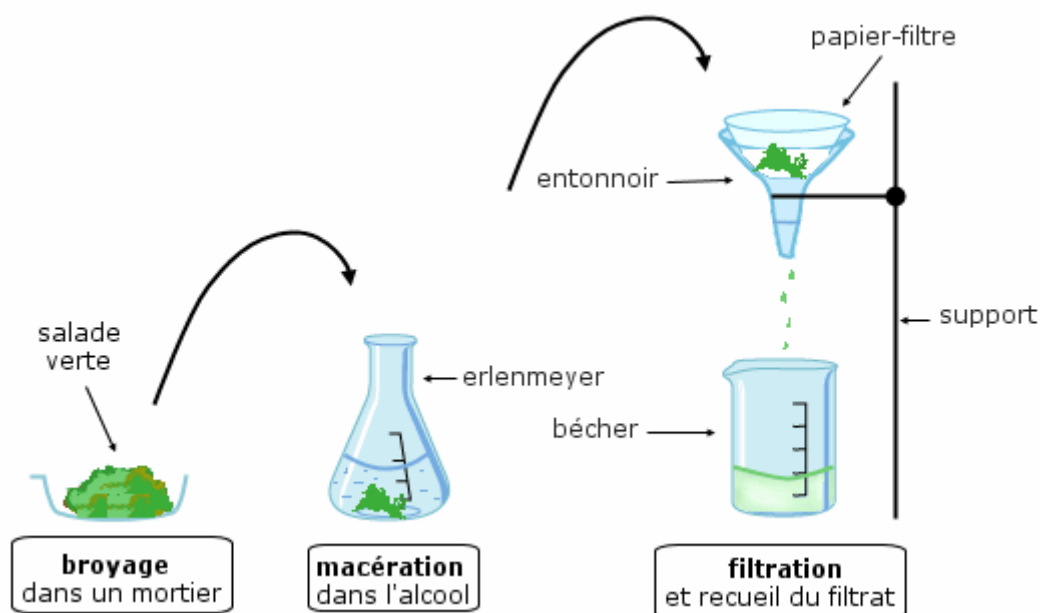
Nous avons effectué une décoction aqueuse à 10 %. 20g de feuilles ont été mis dans 200 ml d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1h. Le décocté refroidi a été filtré et desséché dans l'étuve à 45°C (Diallo et al., 2004).

#### 2.1.2. Infusion

A 20 g de poudre de drogue nous avons ajouté 200 ml d'eau bouillante. Le mélange a été ensuite filtré après 3h de contact. L'infusé refroidi a été filtré et desséché dans l'étuve à 45°C (Diallo et al., 2004).

### 2.1.3. Extraction solide-liquide (macération)

L'extrait hydro-alcoolique est préparé par macération de 200 g de feuilles séchées en utilisant 2 litre d'éthanol (70:30 ; v/v) à température de laboratoire pendant 24 heures. La deuxième macération est faite par 1 litre d'éthanol (70%) durant 24 heures. Partie de mélange obtenu a été filtré et soumis à une évaporation à 45°C dans un rotavapor (BUCHI). L'extrait obtenu est appelé extrait brut (EBr). Le reste d'extrait a été soumis à une extraction liquide-liquide (Markham, 1982).



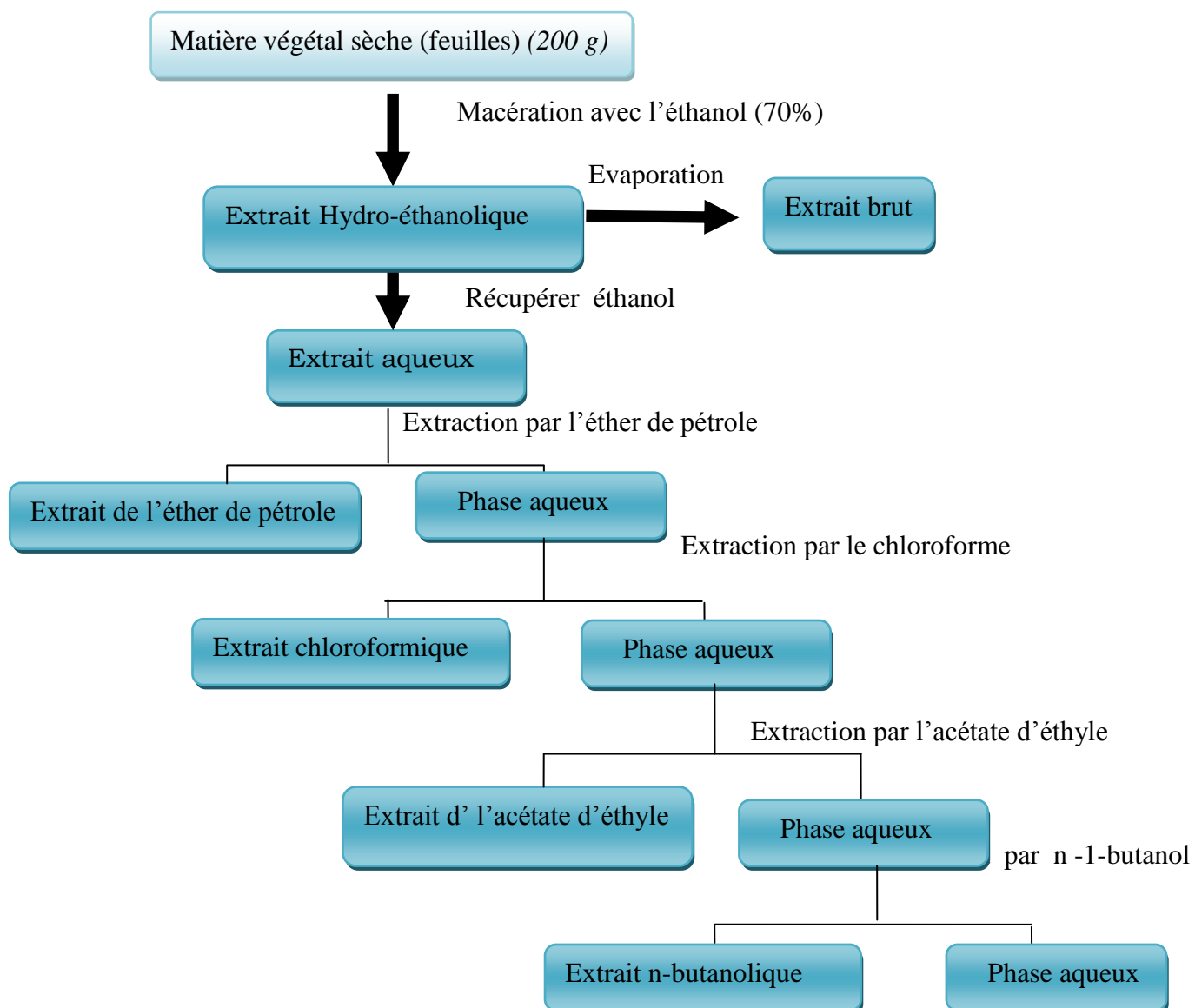
**Figure 13** : protocole de l'extraction solide-liquide (macération)

### 2.1.4. L'extraction Liquide / liquide

L'extraction liquide-liquide est la plus simple des méthodes de séparation. Elle consiste à faire passer des métabolites (solutés) dissous dans une phase liquide, dans une seconde phase liquide non miscible avec la première. En pratique, les solutés sont souvent dans une phase aqueuse. Un solvant organique est utilisé pour les extraire (Lide, 1996). Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et degré de polymérisation ; en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire.

Après évaporation et élimination complète des solvants (éthanol), la phase aqueuse résiduelle constitue l'extrait aqueux. Cet extrait est fractionné en utilisant une série de solvants à polarité croissante (**Figure14**). L'extrait aqueux est initialement mélangé avec

chloroforme (V/V), après décantation la phase organique supérieure est récupérée. Cette étape est refaite trois fois. Le chloroforme est par la suite évaporé sous pression réduite à sec à 45°C par un évaporateur rotatif, et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de chloroforme (FCH). La phase aqueuse inférieure est soumise à un autre fractionnement par l'acétate d'éthyle et butanol pour donner fraction d'acétate d'éthyle (FAC) et butanolique (FBU), en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par chloroforme. Le raffinat qui en résulte représente la fraction aqueuse (FAQ) résiduelle.



**Figure 14:** Les étapes du fractionnement de l'extrait brut des plantes étudiées

## 2.2. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée. Toutefois, il ne renseigne pas sur la nature des molécules chimiques. Bien entendu, les tests de caractérisation phytochimiques présentent des imprécisions car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative. Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration (conjugaison ou insaturation dans une molécule).

### 2.2.1. Détection des tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait d'infusion (10%), 1 à 2 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée (1%). L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins (Trease et Evans, 1987).

### 2.2.2. Détection des saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait décoction, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est abandonné pendant 20 min

Pas de mousse : test faiblement positif.

1. Mousse moins de 1 cm = test positif.
2. Mousse de 1-2 cm = test positif.
3. Mousse plus de 2 cm = test très positif (Trease et Evans, 1987).

### 2.2.3. Détection des flavonoïdes

#### *Les flavonoïdes libres*

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanoliques avec 1ml de HCl concentré et 0.5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 min (Farnsworth, 1974).

#### 2.2.4. *Les anthocyanes*

Leur présence est révélée en traitant 2 ml d'infusé aqueux (10%), avec 2 ml de HCl (2N) ensuite ajoutant quelques gouttes de NH<sub>4</sub>OH. Un test positif est révélé par une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée (Debrayb *et al.*, 1971; Paris *et al.*, 1969).

#### 2.2.5. Détection des alcaloïdes

La réaction de détection des alcaloïdes consiste à préparer un extrait par macération avec l'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué (1/10) de 10 g de la poudre végétale pendant 24 h. Le filtrat est ensuite complété à 50 ml avec de l'eau distillée. Un volume de 1 ml de filtrat est introduit dans un tube à essai puis 5 gouttes de réactif de Dragendorff sont ajoutées. L'apparition d'un précipité confirme la présence d'alcaloïdes.

(Paris et al, 1969).

#### 2.2.6. Stérols et triterpènes

Elle se fait sur une macération de 24h à 5% dans l'éther. L'extrait éthérique (5ml) est ensuite évaporé à sec et repris avec de chloroforme anhydre (mélanger 2,5 ml de la solution chloroformique avec 2,5 ml d'anhydre acétique). Nous avons ensuite déposés au fond du tube contenant l'extrait l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante étant verte ou violette.

### 2.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

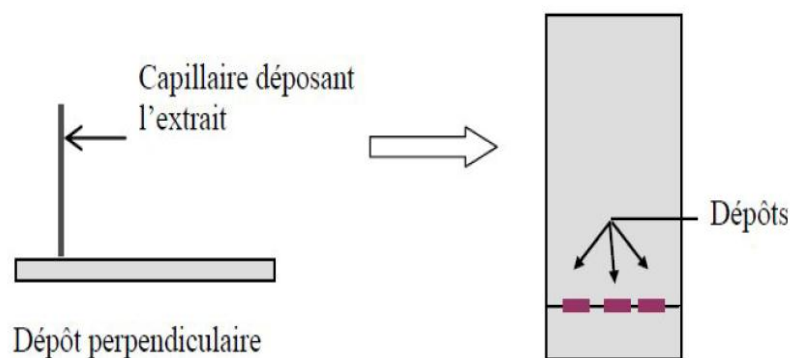
La chromatographie est une méthode analytique très utilisée notamment dans la séparation et la mise en évidence des constituants d'un mélange. Le principe de cette méthode est basé sur la répartition sélective des constituants à séparer entre deux phases, la phase mobile et la phase stationnaire.

La chromatographie sur couche mince repose sur des phénomènes d'adsorption et la répartition des constituants dans ce cas est en fonction :

- de la nature de la phase mobile,
- de la nature de la phase stationnaire,
- des propriétés physico-chimiques des constituants à séparer.

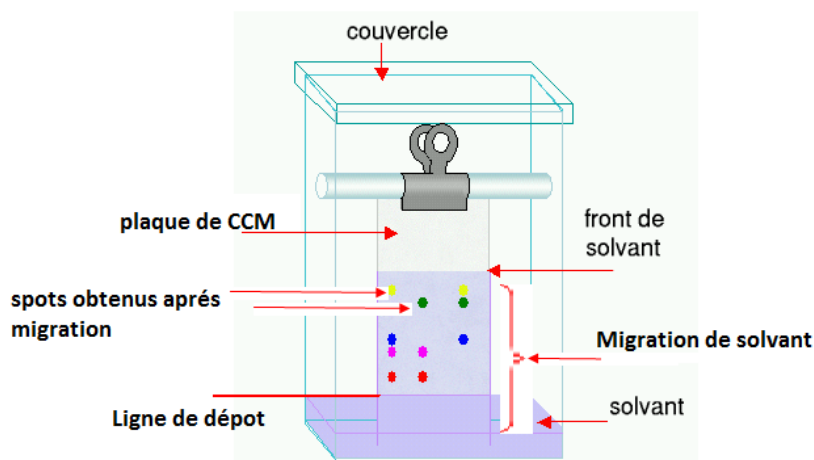
Dans ce travail, la CCM a été utilisée pour la séparation et la mise en évidence des composés phénoliques et flavonoïdes présents dans les 3 fractionnements obtenus afin de vérifier s'il y a une différence d'efficacité entre les différents temps d'extraction.

Pour le CCM des différents extraits, nous avons utilisé des plaques de silice. Le dépôt des extraits sur les plaques a été fait linéairement de façon ponctuelle avec des capillaires (pipettes capillaires) (figure 15 )



**Figure15** : Mode de dépôt pour une CCM

Le choix de la phase mobile (système solvant approprié) s'est fait après essai de plusieurs mélanges de solvants. Nous avons utilisé l'éluant suivant : AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (100/13.5/10). Après saturation des cuve de CCM en vapeur de solvant, les plaques ont été placées de sorte que d'éviter tout contact entre les dépôts des échantillons et le mélange de solvant. Les différents constituants des échantillons et déposés ont alors migré avec des vitesses différentes.



**Figure 16** : Développement du chromatogramme .

### 3. Dosage des polyphénols

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec un spectrophotomètre en utilisant l'essai de Folin-Ciocalteu. Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de folin-ciocalteu. Le mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et molybdène ( $MO_8O_{23}$ ). La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

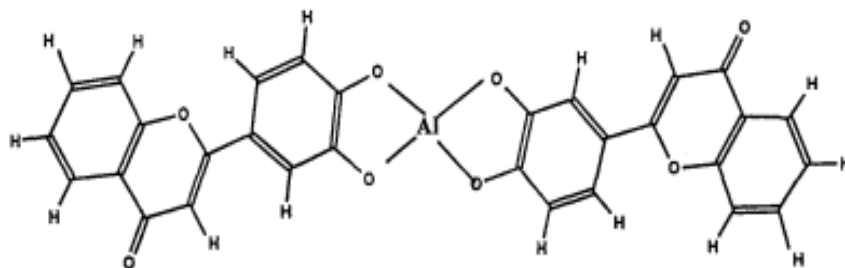
Pour évaluer la teneur en polyphénols des extraits, 100  $\mu$ l de chaque extrait convenablement dilué est ajouté à 500  $\mu$ l du réactif de Folin ciocalteux (dilué 10 fois dans l'eau distillée). Après 4 min 400  $\mu$ l d'une solution de carbonate de sodium (7.5 % dans l'eau distillé) sont ajoutés, après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 765 nm par un spectrophotomètre UV (Boumerfeg *et al.*, 2009; Baghiani *et al.*, 2012).

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (20-140  $\mu$ g/ml). La concentration des polyphénols est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligrammes d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait).

### 4. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium décrite par de Bahorun *et al.* (1996). Le principe de la méthode est la formation d'un complexe jaune qui absorbe à 430 nm.

La formation d'un complexe jaunâtre, lors de l'ajout du chlorure d'aluminium, est due à la fixation des ions  $Al^{3+}$  sur les atomes d'oxygène, présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.



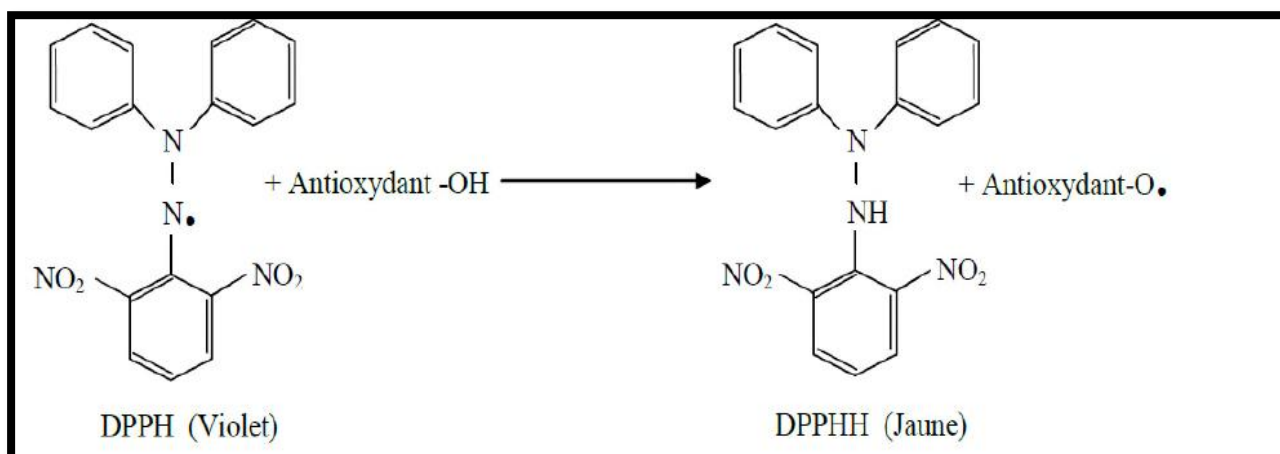
**Figure17** : Image de la fixation des ions  $Al^{3+}$  sur les atomes d'oxygène.

La quantité des flavonoïdes dans un extrait devrait être déterminée selon le flavonoïde prédominant, cependant la quercétine est largement utilisée comme standard pour la détermination de la teneur des flavonoïdes dans un échantillon (Bahorun *et al.*, 1996).

Cette méthode consiste à ajouter 1 ml d'une solution d' $AlCl_3$  (2% dans de méthanol absolu) à 1 ml de chaque extrait convenablement dilué. Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 430 nm est mesurée. Une droite d'étalonnage réalisée par standards (quercétine) à différentes concentrations (1-40  $\mu g/ml$ ) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires a servi pour la quantification des flavonoïdes. La teneur est exprimée en microgrammes équivalents de quercétine par milligrammes d'extrait ( $\mu g$  EQ ou ER/ mg d'extrait), (Boumerfeg *et al.*, 2009; Baghiani *et al.*, 2012).

### 5. Etude de l'activité antioxydante par Test de DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH $^\circ$ ) est un radical organique stable de couleur violette, qui absorbe à 517 nm. Sa stabilité est due au fait qu'il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. En présence d'agents antioxydants qui sont des donneurs d'hydrogène (AH), le composé est réduit en une forme non radicalaire DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) et vire au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance (Brand-Williams *et al.*, 1995; Maataoui *et al.*, 2006). La réaction peut être représentée par l'équation suivante :



**Figure 18 :** Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant (Molyneux, 2004)

Selon le protocole décrit par Sanchez-Moreno (1998) et Agrawal (2011). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de ce produit dans 100 ml de méthanol. 50  $\mu$ l de chaque solution des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1,1250 ml de solution DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par un antioxydant standard : acide gallique et quercétine dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats de l'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\mathbf{I\% \text{ d'inhibition} = [(Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ test}) / Abs \text{ contrôle}] \times 100}$$

**I % :** Pourcentage de l'activité anti-radicalaire  
**Abs Contrôle :** Absorbance de la solution du DPPH au temps 0

**Abs test :** Absorbance de l'extrait.

## *Chapitre II*

### *Résultats et discussion*

### 1.Caractérisation des extraits obtenus

La préparation des extraits à partir des feuilles de la plante étudiée a été effectuée en deux étapes. La première est une extraction par un mélange hydro alcoolique éthanol/eau (7/3 V/V) pour obtenir initialement l'extrait brut (EBr). La deuxième étape a été réalisée par des solvants de polarité croissante afin d'épuiser la matière végétale progressivement. L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction (Markham, 1982). En fonction du solvant utilisé, cinq extraits ont été obtenus, à savoir: ECh : Extrait chloroformique ; EAc : Extrait d'acétate d'éthyle ; EBu : Extrait butanolique ; EAq : Extrait aqueux; EEP : Extrait d'éther de pétrole.

Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir d'une matière végétale, il est exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche.

$$R_{\text{extrait}} \% = (M_{\text{extrait}} / M_{\text{plante}}) \cdot 100$$

$R_{\text{extrait}}$ : Le rendement d'extrait.

$M_{\text{extrait}}$ : La masse d'extrait en gramme.

$M_{\text{plante}}$ : La masse de la plante de départ en gramme.

Pour les fractions de l'extrait brut, le rendement est exprimé en pourcentage par rapport à l'extrait brut.

$$R_{\text{extrait}} \% = (M_{\text{extrait}} / M_{\text{extrait brut}}) \cdot 100$$

$M_{\text{extrait brut}}$  : La masse d'extrait brut en gramme.

Les résultats sont obtenus dans le tableau suivant.

**Tableau 2** : Résultat de différentes quantités et rendements couleurs d'extrait de *J. oxycedrus*

Extraits	EBr	ECh	EAc	EBu	EAq	EEP
Masse d'extrait (g)	28	0.36	3.32	10.32	9.20	4.8
Rendement%	14	1.28	11.85	36.85	32.85	17.14

Les résultats obtenus montrent que l'extrait brut possède un rendement très élevé (14%). Le choix de solvant d'extraction a été orienté par de nombreuses études réalisées sur la recherche de conditions optimales d'extraction des polyphénols, et les études précédentes montrent que le mélange hydroalcoolique à différents ratios est le solvant le plus utilisé pour une haute récupération de composés phénolique (Bouزيد et al., 2011).

Pour les fractions de l'extrait brut, le meilleur rendement est obtenu avec l'extrait butanolique (36.85%) et l'extrait aqueuse (32.85%), suivi par l'extrait éther de pétrole (17.14%) et l'extrait d'acétate d'éthyle (11.85%), et enfin l'extrait chloroformique (1.28%).

Ces résultats nous indiquent que les extraits des feuilles de de la plante étudiés sont majoritairement constitués des lipides, tanins, protéines et des sucres.

Par ailleurs, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée et avec les compositions de la plante qui varient selon la période, le lieu de la récolte et la durée de séchage.

## 2. Résultats phytochimique

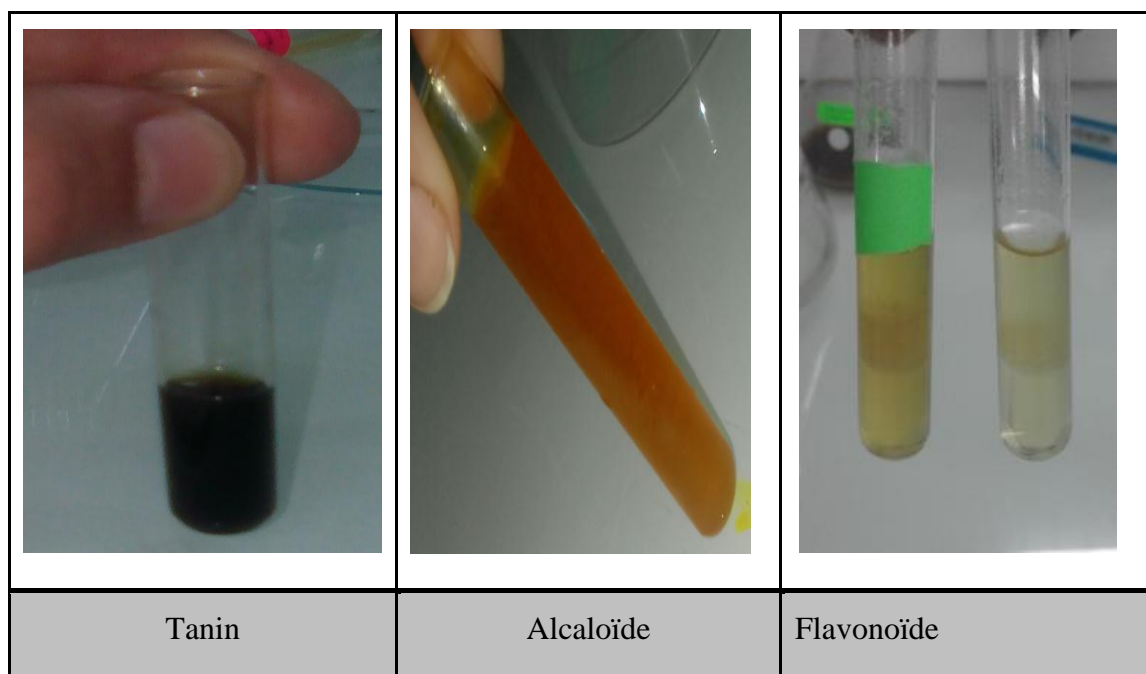
On a utilisé des tests physico-chimiques simples a fin de vérifier la présence ou l'absence de différentes familles des métabolites secondaire dans le *Juniperus oxycedrus*. Les tests photochimiques réalisés ont permis de détecter différentes familles de composés par la réaction qualitative de caractérisation ces derniers se présentent ainsi :

- 1) (+) : présence en faible quantité. Est enregistré si le réactif présente une légère opacité.
- 2) (++) : présence en quantité moyenne. Est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation.
- 3) (+++) : présence en forte quantité. Est enregistré si le réactif produit une floculation ou une légère turbidité.
- 4) (-) : absence des composés. Est enregistré en cas d'absence de turbidité, de floculation et de précipitation

Les résultats réalisés des tests phytochimiques sont mentionnés dans le tableau 2 et la figure 19.

**Tableau 3** : Résultats des tests phytochimiques du *Juniperus oxycedrus*.

Métabolites secondaire	Tanins	Saponosides	Flavonoïdes		Alcaloïdes	Terpènes
			libre	Anthocyane		
Présence/absence	+++	-	+	-	+	++



**Figure 19** : les images des quelques résultantes de la réaction de caractérisation des principaux métabolites secondaires.

Le screening phytochimique de la plante révèle que les feuilles de *J. oxycedrus* sont une source importante de métabolites secondaires. Ces classes regroupent essentiellement les tanins, les flavonoïdes et les terpénoïdes avec l'absence des anthocyanes et des saponosides.

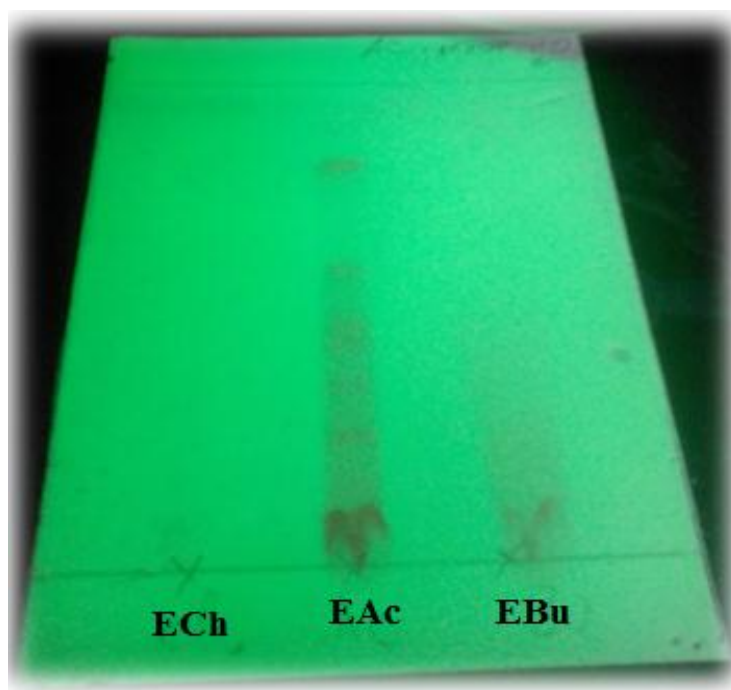
A l'égard des résultats obtenus, Les tanins sont présents avec une intensité importante dans la plante.

De façon général, les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux de ( Miceli et al., 2009, Taviano et al., 2013) et Marija et al., 2011 sur la même espèce (*J. oxycedrus*).

La richesse de la plante par ces métabolites explique leur intérêt thérapeutique et large utilisation dans médecine traditionnelle.

### 3.Chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différents extraits on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) et les résultats sont représentés dans la figure 20



**Figure 20** : CCM des différents extraits observés sous UV.

L'examen sous lumière ultra-violette fournit des informations très importantes sur la structure des molécules. Il apporte des indications particulières concernant les substitutions. Le tableau suivant résume les relations existant entre la structure d'un composé flavonique et sa fluorescence sous UV.

**Tableau 4:** Relation entre la fluorescence et structure des flavonoïdes (Lahouel, 2005 ).

Spots colorés	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonole 5, 6, 7 tri-OH libre, flavonole 5, 7, 8 tri-OH libre
Brun	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4'-OH flavones 3-OR et 5-OH, 4'-OH, isoflavones, dihydroflavonols, flavonones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5 -OH libres avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune orangé	Flavonole 3 -OH libre avec ou sans 5 'OH substitué
Jaune vert brillant	5 -OH libre ou 5 -OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3 -OH libre
Jaune pale	Dihydroflavonols

L'extrait d'acétate d'éthyle du *J. oxycedrus* est montré après l'observation à l'UV (254 et 366 nm) une richesse en constituants chimiques. Dans cet extrait, de nombreux flavonoïdes ont été détectés. La présence de coloration noir indique des flavonoïdes de type : Flavonole 5, 6, 7 tri-OH libre ou flavonole 5, 7, 8 tri-OH libre.

## 4. Dosage des composés phénoliques

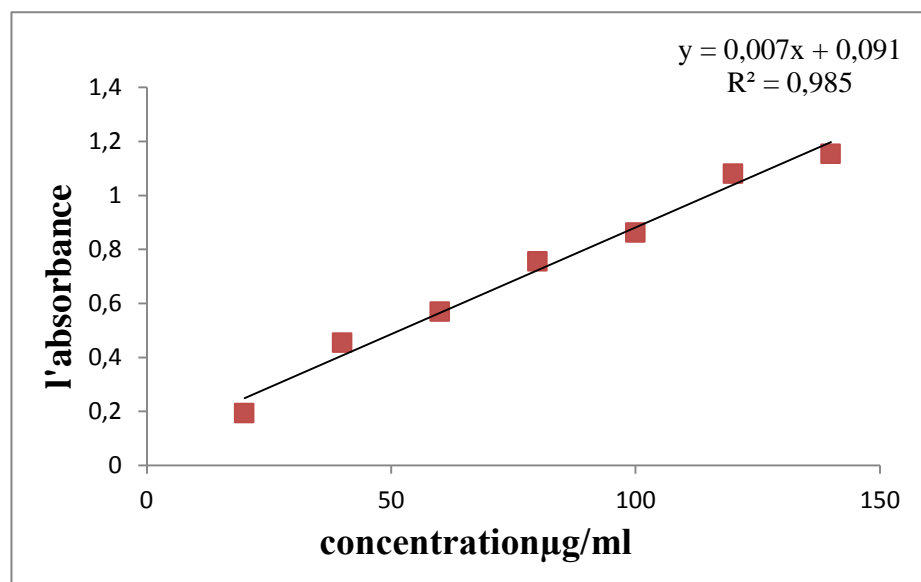
### 4.1. Dosage des polyphénols totaux

Dans le but de déterminer la teneur en polyphénols totaux de notre échantillon un dosage a été effectué au niveau des extraits chloroformique (ECh), d'acétate d'éthyle (EAc), Butanolique (EBu) et l'extrait brut (EBr ) des polyphénols. On a utilisé la méthode de Folin-ciocalteu pour doser les polyphénols pour plusieurs raison D'abord c'est une méthode qui satisfait les critères de faisabilité et de reproductibilité, et cette technique est une méthode standardisée. C'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche.

Avant de passer à la détermination de la teneur en composés phénoliques nous avons établi une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique comme composé de référence.

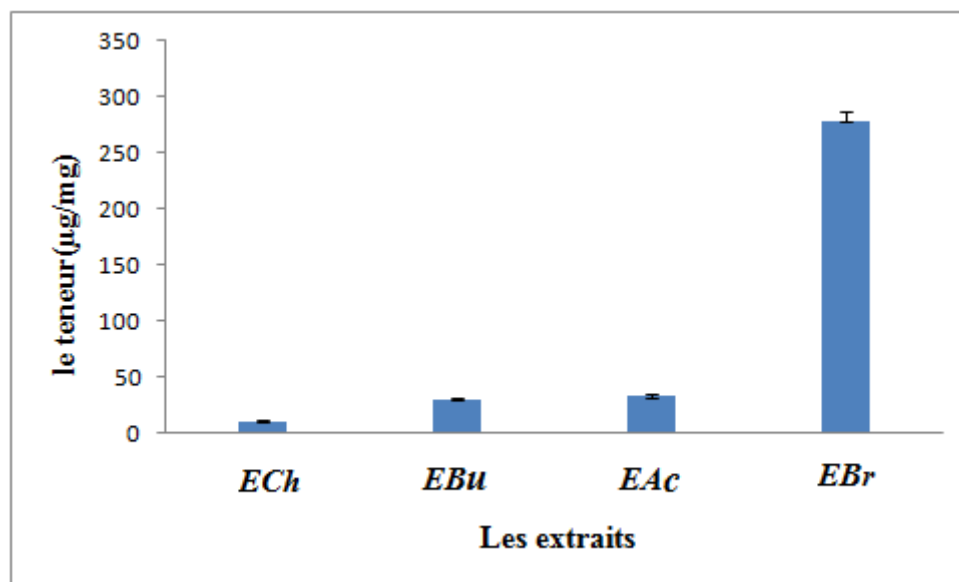
**Tableau 5:** préparation de courbe standard à l'aide d'acide gallique

C (µg/ml)	20	40	60	80	100	120	140
absorbance	0.193	0.453	0.569	0.755	0.862	1.08	1.153



**Figure 21:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Après extrapolation des résultats sur la courbe d'étalonnage, la teneur en composés phénoliques totaux de nos échantillons est représentée dans la figure 21.



**Figure22:** Le teneur en phénoliques des différents extraits.

L'extrait brut de *J. oxycedrus* représente une teneur très élevée en polyphénols ( $279.29 \pm 8.43 \mu\text{g EAG/g}$ ). Ce résultat confirme la grande richesse des feuilles en substances polyphénoliques.

La comparaison entre les fractions de l'extrait brut montre que la teneur en polyphénols totaux d'extrait butanolique est plus proche que l'extrait d'acétate d'éthyle avec une teneur de  $30.57 \pm 1.2 \mu\text{g EAG/g}$  et  $33.2 \pm 2.34 \mu\text{g EAG/g}$  respectivement, L'extrait apolaire (ECh) représente la fraction la plus pauvre en polyphénols avec une proportion de  $11.6 \pm 1.2 \mu\text{g EAG/g}$ .

Les résultats obtenus lors du dosage des polyphénols montrent que les polyphénols qui se trouvent dans la plante sont majoritairement polaires.

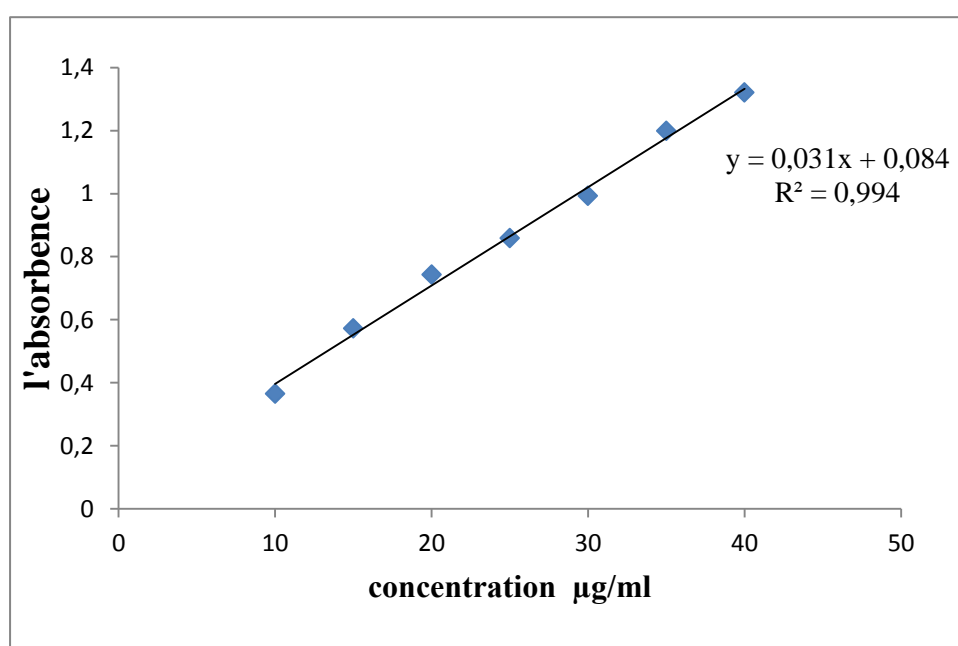
#### 4.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique. La quercétine prise comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes pour les différents extraits qui est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme de matière végétale sèche.

Avant de passer à la détermination de la teneur des flavonoïdes nous avons établi une courbe d'étalonnage en utilisant la quercétine comme composé de référence.

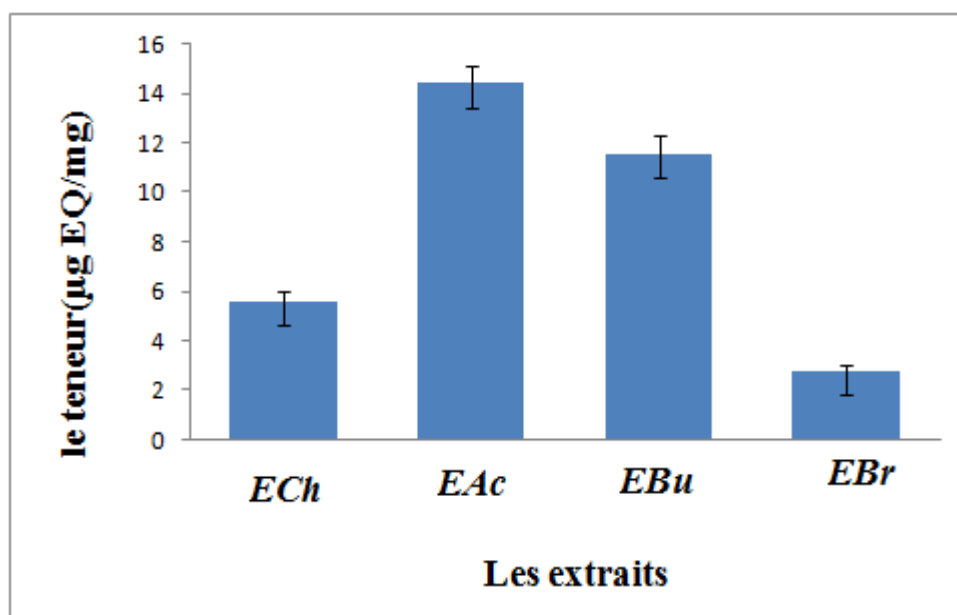
**Tableau 6 :** préparation de courbe standard à l'aide de quercétine.

C (µg/ml)	10	15	20	25	30	35	40
absorbance	0.365	0.573	0.743	0.859	0.993	1.199	1.321



**Figure 23 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Après extrapolation des résultats sur la courbe d'étalonnage, la teneur en flavonoïdes est représentée dans la figure suivante.



**Figure24:** Le teneur en flavonoïdes des différents extraits.

L'analyse des résultats du dosage des flavonoïdes montre que la fraction d'acétate d'éthyle est la plus riches en flavonoïdes ( $14,46 \pm 0,65 \mu\text{g EQ/mg}$ ), par la suite vient l'extrait butanolique ( $11,58 \pm 0,74 \mu\text{g EQ/mg}$ ), tandis que l'extrait chloroformique a montré une valeur inferieure ( $5,62 \pm 0,35 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait).

La teneur en flavonoïde varie en fonction de la degré de glycosylation des flavonoïde et la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits. Plusieurs études précédentes montrent que l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono O- glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides et C-glycosides. Il est apparait que la plupart des flavonoïdes de *J. oxycedrus* sont des flavonoïdes glycosylés car ont le pouvoir d'être mieux solubilisé dans les solvants polaires que les solvants apolaires.

## 5. Pouvoir antioxydant évalué par le test DPPH

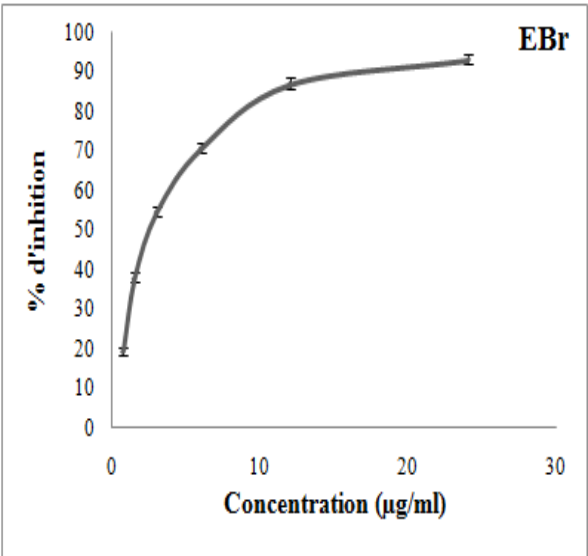
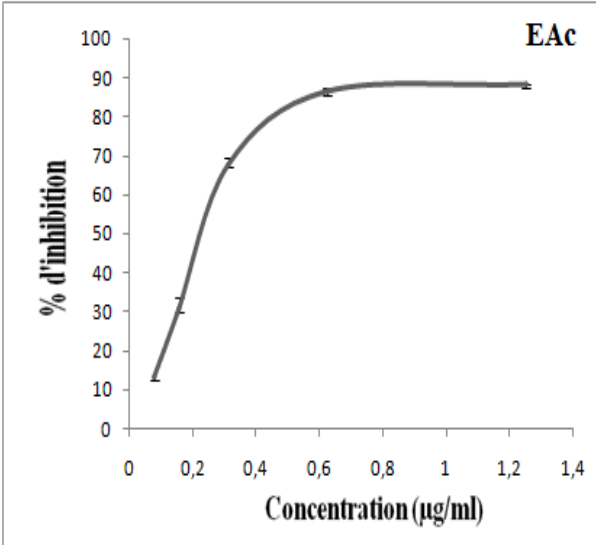
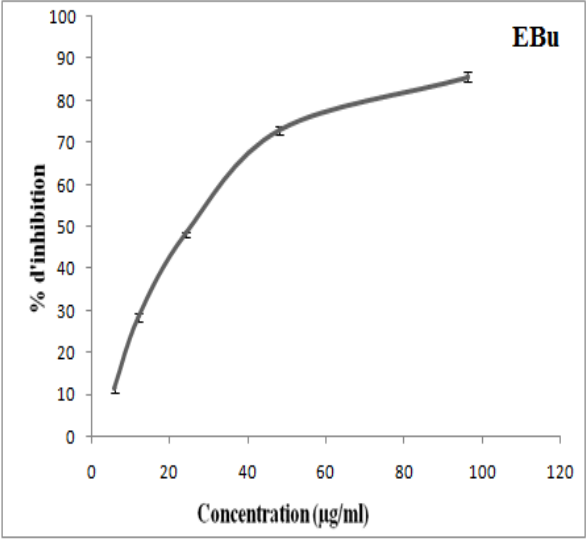
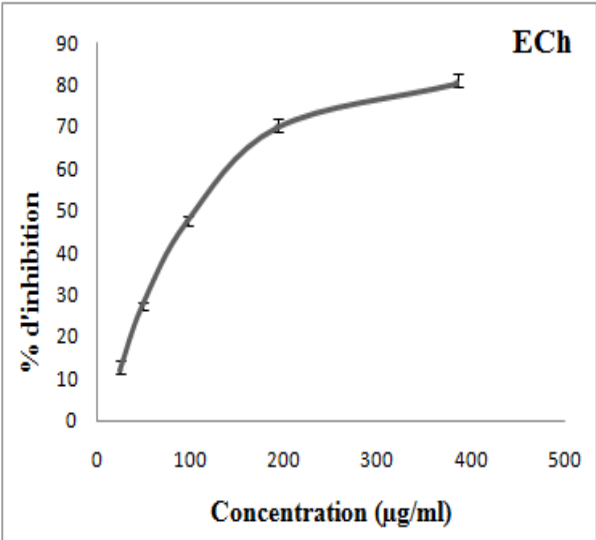
L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres tant décriée dans diverses pathologies. Dans le but de pallier le système de défense endogène, les recherches s'orientent dans la découverte de molécules antioxydantes. Ainsi pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons employé la méthode au DPPH

(Ebrahimzadeh et *al.*, 2010). L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par le test DPPH, par le suivi de la réduction de ce radical libre par différentes doses des extraits accompagnée d'un passage de couleur violette vers le jaune mesurable par spectrophotométrie UV /visible à 517 nm.

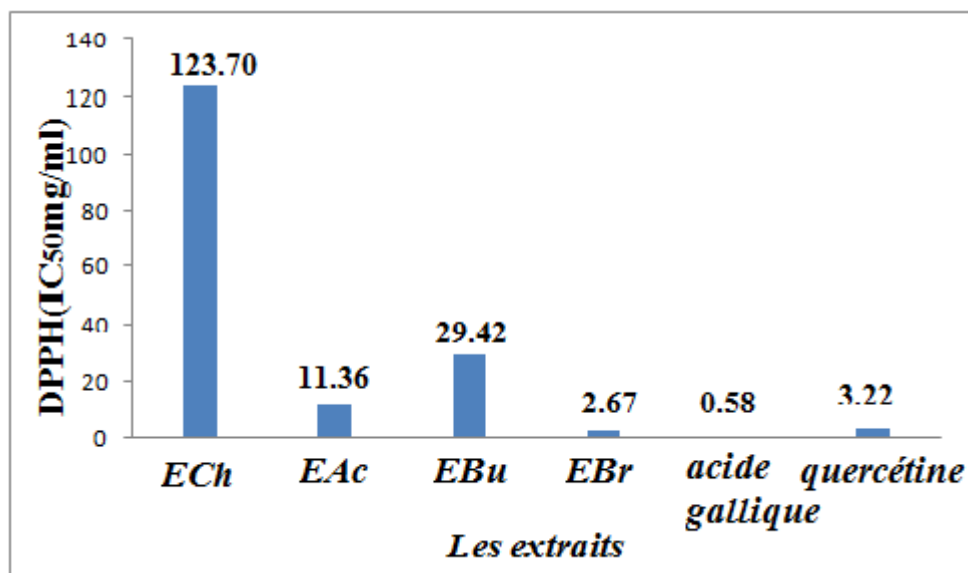
Les résultats obtenus pour les différents extraits sont présentés dans la figure **25**

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH· en sa forme non radicalaire.

A partir des courbes des pourcentages d'inhibition obtenus, nous avons déterminé les valeurs d'IC<sub>50</sub>. L'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50 %) appelée aussi EC<sub>50</sub> (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testées (Molyneux, 2004). Les valeurs IC<sub>50</sub> d'extraits pour l'activité piégeant les radicaux libre par la méthode de DPPH sont présentés dans la figure **26**.



**Figure 25:** Pourcentage d'inhibition % en fonction de concentrations de différentes des extraits.



**Figure 26:** valeurs IC<sub>50</sub> d'extraits pour l'activité piégeant les radicaux libre par la méthode de DPPH.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le paramètre IC<sub>50</sub> est inversement proportionnelle à l'action anti radicalaire (anti DPPH), un IC<sub>50</sub> faible correspond à une activité antioxydante élevée et vice-versa.

Nos résultats montrent que l'extrait brut (EBr) présente une activité antiradicalaire très élevée ( $2.67 \pm 0,087$  mg/ml). En comparant avec l'acide gallique et quercétine, on constate que cet extrait est 1,2 fois plus active par rapport au quercétine et 4fois moins que à l'acide gallique.

L'extraits d'acétate d'éthyle, butanolique représentent aussi une activité considérable, leur IC<sub>50</sub> successives est de  $29.42 \pm 0.40$  mg/ml et  $11.36 \pm 0.09$  mg/ml respectivement, par contre l'extrait chloroformique présente d'IC<sub>50</sub> plus élevé ( $123.17 \pm 0,68$  mg/ml) ce qui montre que leur activité antiradicalaire est le plus faible. En comparaison avec les antioxydants standards, les fractions de l'extrait brut s'avèrent moins actifs.

Malgré que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique sont riches en flavonoïdes qui sont les antioxydants les plus puissant, leurs activité antioxydante est faible

par rapport à l'extrait brut, cela est due surement à la complexité d'extrait brut en substances polyphénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante.

# **Conclusion**

### Conclusion

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. A cet effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques ou antioxydants. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Juniperus oxycedrus*.

Sur le plan phytochimique, nous avons effectué un Screening préliminaire des différentes familles de métabolites secondaires contenues dans les deux espèces. Les résultats montrent une composition riche et variée en métabolites secondaires. La présence des flavonoïdes dans nos extraits est confirmée par CCM.

Les résultats du dosage des polyphénols et pour les flavonoides montrent que pour les différents extraits, l'extrait brut et d'acétate d'éthyle accuse les teneurs les plus élevées en ces composés.

L'activité antioxydante des molécules isolées est évaluée par le test anti radicalaire qui consiste à estimer la capacité de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus ont montre que les flavonoïdes extrait sont doués d'une activité antioxydante très importante.

L'ensemble des résultats obtenus constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel de la plante étudiée.

# Références

---

## Références

**Agrawal S., Kulkarni G.T. and Sharma V.N. 2011.** A comparative study of the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminalia paniculata* and *Madhuca longifolia*. *Free Radical Antioxidant*, 1: 62–68.

**Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008).** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*, 41: 1–15

**Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. (1996).** Advances in development of Pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res*, 28 : 65-180

**Aurousseau, B. (2002).** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim*, 15 (1): 67-82

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

**Athamena S., chalghemi., Kassah-Laouar A., Laroui S. Et Khebri S. (2010).** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*. 11 (1): 69-81.

**Ayad, R. (2008).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *zygophyllum cornutum*, Mémoire magister En Chimie Organique, université Mentouri Constantine. P 35-39, 40, 47.

**Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.

**Baghiani A., Ameni D., Boumerfeg S., Adjadj M., Djarmouni M., Cheref N., Khennouf S. And Arrar L., 2012.** Studies of antioxidants and xanthine oxidase inhibitory potentials of root and aerial parts of medicinal plant *Capparis spinosa L.* *American Journal of the Medical*

- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. And Idaomar M.(2008).** Biological effects Of essential oils. A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 446-475.
- Becker M., Picard J.-F., Tim bal J. (1982).** Larousse des arbres et arbustes. Librairie Larousse, 151-152 et 194-195.
- Belaiche P. (1979).** **Traité de phytothérapie et d'aromathérapie.** Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris. **Valnet J. (1984).** **Aromathérapie.** Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris. 544p. **Wichtel M. And Anton R. (1999).** Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc. Sciences. 2:25-32
- Belbache H.,** 1994- phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora*. mémoire de magister en Chimie organique, université mentouri constantine: 15-16..
- Belbache, H. (2003).** Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora Desf*, mémoire de magister en chimie organique, université Mentouri Constantine. P 16-20.
- Bhat, C.R., S. Srinivasan, and K.W. Axhausen (2005).** An Analysis of Multiple Interepisode Durations Using a Unifying Multivariate Hazard Model. *Transportation Research Part B*, 39(9), 797-823
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000).** Role of Quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, 13: 135
- Bouadam-Farhi B. (2013).** Caractérisation morphologique et biochimique de l'espèce *Juniperus sabina* L. Au niveau du Parc National de Djurdjura, Algérie. Mémoire de Magister en Sciences biologique. Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université A/Mira de Bejaia. 75p
- Bouhlal K, Meynadier JM, Peyron JL, Peyron L, Marion JP, Bonetti G, Meynadier J. (1988).** Le cade en dermatology. *Parfums, Cosmétiques et Aromes*, **83**:73-82.

- Boumerfeg S., Baghiani A., Massaoudi D., Khennouf S. And Arrar L ., 2009.** Antioxidant properties and xanthine *oxidase* inhibitory effects of *Tamuscommunis L.* Root extracts. *Phytotherapy Research.* 23:283-288
- Boizot N.et Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en Composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA Amélioration,Génétiques et physiologie Forestières. *Laboratoire d'Analyses biochimiques.* 18: 79-
- Bossokpi P.L., 2002-** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, (Bamako): 133.
- Brand-william W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995).** Use of a free radical Method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie,* 28: 25-30
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie :** Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition,Lavoisier Techniques & Documentation, Paris. **Cowan, M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re,* 12 (4): 564- 582.
- Bruneton J. (1993).-** pharmacognosie phytochimie plantes médicinales –Tec & Doc, Lavoisier, Paris, p 915.
- Brus R., Ballian D., Zhelev P., Pandz M., Bobinac M., Acevski J., Raftoyannis Y. And Jarni K. (2011).** Absence of geographical structure of morphological variation in *Juniperus oxycedrus L. Subsp. Oxycedrus.* *European Journal of Forest Research.* **130** (4): 657-670.
- Bruyne T., Pieters L., Deelstra H. Et Vlietink A. (1999).**Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology.* **27**:445-459. **O'Connell J.E., Fox P.F. (2001).** Signification and applications of phénolic compounds in the production and quality of milk dairy products: a review. *International Dairy Journal.* **11**(3): 103-120.
- Chaouch T .M . (2013).** Contribution a l'étude des activités anti oxydantes et anti microbiennes des extraits de quelques plantes médicinal. TLEMCEN

- Cowan M.M.**, 1999- Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin.Microbiol Re*, 12 (4): 564-582.
- Crozier A., Clifford M.N. and Ashihara H. (2006).** Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet. *Ed Blackwell Publishing Ltd.* 371p
- Diallo D., Sanog R, Yasambou H, Traoré A, Coulibaly K and Maïga A., 2004.** Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Comptesrendus Chimie*. 7:1073-1080.
- Diallo A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat. Mali
- Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R. 1971.** Travaux et documents de Précis de matière médicale, pharmacognosie spéciale dicotylédones (tome III). Pp 32-52
- Edenharder, R., Grünhage, D. (2003).** Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.
- Farnsworth, N.R., Berderka, J.P., Moses, M. (1974).** Screening of Medicinal plant Flavonoids. *Méd. Nut*, 32 : 17-27
- Favier A. 2003.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 17: 501– 512.
- Fernández A., Ortuilo I., Martos A., Fernández C. (1996).** Saber y utilización de plantas en la provincia de Jaén. Campaña de 1993. Boletín del Instituto de Estudios Giennenses, 161, 199-318. Flavonoids in Health and Disease, 10 : 253-276.
- Franco Ro., Sánchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M. and Panayiotidis M.I. (2009)** Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Mutation Research*, 674; 3-22.

**Gardès-Albert M. And Jore D. 2005.** Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, Ed. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier. 1–23.

**Garnier G., Bézanger-Beauquesne L., Debraux G. (1961).** Ressources médicinales de la flore française. Tome 1. Vigot Frères Éditeurs, Paris, 124-133.

**Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S., Fonseca Maria,J.V. (2003).** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS Pharm Sci*, 5 (2) : 1-5.

**Guzik T.G. (2010)** Functional studies of NADPH oxidases in human vasculature. *In: studies on cardiovascular disorders, oxidative stress in applied basic research and clinical practice. Springer Science Business Media*, pp; 149-167.

**Grivennikova V.G. and Vinogradov A.D. (2013)** Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 78(13); 1490-1511

**Halliwel, B. (1994).** Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, 344 (8924): 721-724

**Haslam, E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.

**Havsteen, B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Ph*

**Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F., 2004-** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.

**Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002).** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21.

**Innocenti M, Michelozzi M, Giaccherini C, Ieri F, Vincieri FF, Mulinacci N.**

(2007). Flavonoids and Biflavonoids in Tuscan Berries of *Juniperus communis* L.:Detection and Quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(16): 6596-6602.

**Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., Yusuf, S. (1995).** The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann.Intern Med*, 123: 860.

**Klimko M., Boratynska K., Montserrat JM., Didukh Y., Romo A., Gomez D.,**

**Kluza-Wieloch M., Marcysiak K. and Boratynski A. (2007).** Morphological variation of *Juniperus oxycedrus* subsp. *Oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean region. *Flora—Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. **202**: 133–147.

**Koehler-Ramonatxo C. (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant Supplementation, or another way of nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **20**: 165-177.

**Lagourge M and Larsson N.G (2013).** The role of mitochondrial DNA mutation and free radicals in disease and ageing . *Journal of internal medicine* 273;529-543.

**LAHOUEL M.;** Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat Université de Constantine (2005).

**Lide .D.R,ed (1996)** CRC Handbook of Chemistry and Pyysics .76<sup>th</sup> ed;Boca Ratou FL,CRC Press,p.3-80.

**Loizzo M. R., Tundis R., Conforti F., Saab A. M., Statti G. A.,Menichini F. (2007).** Comparative chemical composition,antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp.*oxycedrus* L. Berry and wood oils from Lebanon. *Food Chemistry*,**105**: 572-578.

**Macheix J.J., Fleuriet A et Jay Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique presse Polytechniques et universitaire romandes.

**Mahamat et all.1995.** Contribution à l'étude des combretaceae du Sénégal. Comparaison de l'activité anti-bactérienne de trois espèces. Thèse de Doct. d'Etat en Pharmacie, 1990, n°44

**Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., EL Ghadraoui L., Aafi A., and Farah A.(2010),** valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et *Juniperus Oxycedrus* du Maroc, *Phytothérapie*, **8** : 166-170

**Mao, K., Hao, G., Liu, J., Adams, R.P. and Milne, R.I. (2010).** Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple Intercontinental dispersals. *New phytologist*. 188: 254-272.

**Mapola G. (2003).** Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles de *E.citriodora* acclimaté à Point-Noire(Congo-Brazzaville). Mémoire de diplôme d'étude approfondie en chimie et technologie Alimentaire. Université Marien Ngouabi. 5-9p.

**Marija ML, Ivana NB, Dejan ZO, Goran TA, Kristina JB, Marina M, Neda MM.(2011).** *Juniperus sibirica* Burgsdorf. As a novel source of antioxidant and antiinflammatory Agents. *Food Chemistry*, **124**(3): 850-856.

**Markham KR (1982).** Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press. London. P. 133.

**Medini H., Marzouki H., Chemli R., M. L. Khouja, B. Marongiu B., Piras A.,Porcedda**

**S. And Tuveri E. (2009).** Comparison of the antimicrobial activity and the Essential oil composition of *juniperus oxycedrus* subsp. *Macrocarpa* and *j. Oxycedrus*

Subsp. *Rufescens* obtained by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide

Extraction methods. *Chemistry of Natural Compounds*. **45** (5): 739-741.

**Miceli N, Trovato A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Marino A, Bellinghieri V, La**

**Barbera TM, Guvenc A-E, Taviano MF. (2009).** Comparative Analysis of Flavonoid Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Berries of *Juniperus Communis* L. Var. *Communis* and *Juniperus communis* L. Var. *Saxatilis* Pall. From Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(15): 6570 – 6577.

**Molyneux P (2004).** The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) For estimating antioxidant activity songklanakarin. *Journal of Science Technology*. 26(2):211-219

**Morelle J. Et Israel L. 2003.** L'oxydation des aliment et la santé. Edition Impression Librairie F-X. De Guilbert. 257

**Mota R., Thomas G., Barbosa Filho J.M.al, (1985).** Anti-inflammatory actions of tannins isoled from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 13, 289-300.

**Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M. (1978).** Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218..

**G.-I. Nonaka and I. Nishioka, Chem. Pharm. Bull., 1990, 38, 1218.**

**Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishna D. R., 2001-** Bioflavonoids Classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journalof pharmacology*, 33 : 2-16.

**Ogbera A.O., Dada O., Adeyeye F. And Jewo P.I. (2010).** Complementary and Alternative medicine use in diabetes mellitus. *West African Journal Of Medicine*. **29**:158–162

**O'Mahony J.A., Fox P.F. and Kelly A.L. (2013)** Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. 4th Edition, Springer Science Business Media New York, pp; 337-385.

- Orav A, Koel M, Kailas T, Müürisepp M. (2010).** Comparative analysis of the Composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries And needles of Estonian juniper (*Juniperus communis* L.). *Procedia Chemistry*, **2**(1): 161-167
- Packer L. (2001).** Flavonoids and other polyphénols. Ed Academic Press, California, p483.
- Paris M., Hurabielle M.; (1981).** Abrégé de matière médicale «Pharmacognosie». Tome 1, Generalities, Morphologies. Ed. Masson, Paris. Pp : 256-266.
- Paris, R ; et Moyses, H.** Précis de matière médicale. Paris : Masson. (1969).
- Pickering A.M., Vojtovich L., Tower J. And Davies J.A. (2013)** Oxidative stress adaptation with acute, chronic and repeated stress. *Free radical biology and medicine*. **55**; 109-118.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002)** Mécanismes Physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant Defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. **16**: 233-239.
- Quézel P. Et Médial F. (2003).** Ecologie et biogéographie de la forêt du bassin méditerranéen. *Edition scientifiques et médicales Elsevier SAS*. Paris, 571p.
- Urquiaga, I. & F. Leighton. 2000.** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res*. **33**: 55–64
- Rahman, I. (2002).** Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **1**(3) : 291-315
- Rangkadilok N., Sitthimonchai S., Worasuttayangkurn L., Mahidol C., Ruchirawat M., Satayavivad J., 2007-** Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chem. Toxicol*, **45**: 328-336.
- Sanchez de Medina F., Gamez M. J., Jimenez I., Jimenez J., Osuna J. I., Zarzuelo A. (1994).** Hypoglycemic activity of juniper berries. *Planta Medica*, **60** :197-200

- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci Food. Agric*, 76: 270–276.
- Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Scherer, R., Godoy, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem*, 112: 654–658
- Seca AM, Silva AM, Bazzocchi IL, Jimenez IA. (2008).** Diterpene constituents of Leaves from, *Juniperus brevifolia*. *Phytochemistry*, 69(2): 498-505
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner-Hras, A., Simonic, M., Knez, Z.(2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials And their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89: 191–198.
- Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M. (2004).** Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med.Chem*, 11: 1135– 1146.
- Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., et al. (1996).** Oxidative damage in Alzheimer’s [letter]. *Nature*, 382: 120.
- Swanston-Flatt S. K., Day C., Bailey C. J., Flatt P. R. (1990).** Traditional plant treatments for diabets. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*, 33 :462-464
- Tavares L, Gordon J, Fortalezasa S, Stewart D, Ricardo BF, Cláudia N. (2012).**The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperuse* species found in Portugal. *Food Chemistry*, 135 (2): 562-570
- Taviano, M.F., Marino, A., Trovato, A. And Bellinghieri, V. (2013) .** *Juniperus Oxycedrus* L. Subsp. *Oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. Subsp. *Macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 58: 22–29.

- Teixeira B., Marques A., Ramos C. (2013).** Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, **43**: 587–595.
- Touyz R.M., Chignalia A. And Sedeek M. (2010)** Reactive oxygen species, oxidative stress and hypertension. *In: Studies on cardiovascular disorders, oxidative stress in applied basic research and clinical practice, Springer Science Business Media*, pp; 281-315.
- Trease GE and Evans WC (2002).** Pharmacognosy. 15 th Ed, Springer. Berlin.
- Tsao,et all. (2010).** Exploring the impact of personality traits on online shopping behavior, *African Journal of Business Management*, 4(9), pp. 1800-1812.
- Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006).** The contribution of flavonoid C-ring on dpphfree radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160: 1–40
- Van Acker, S., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., van der Vijgh, W.J.F. (1996).** Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol*, 56 :935– 943.
- Willem J.P. (2009).** 60 maux soignés par les huiles essentielles : l'aromathérapie au quotidien pour toute la famille, Les mini pockets de santé. Pp : 7-17
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen,S.S. (2004).** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59:113-122.
- Yan L.J. (2014)** Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerances. *Redox Biology*, 2; 165-169.

**Zhang D.X. and Gutterman D.D. (2007)** Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292; 2023-2031.