

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri Constantine



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre.....

N° de série.....

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie
Option Biochimie de la Nutrition

**Evaluation de l'activité anti-oxydante et
antibactérienne de la fraction n-Butanolique
extraite des feuilles d'*Abies numidica***

Présenté par :

- BOUGHEZAL Chakib
- BOUGUELLI Ahcene Brahim
- SEDRATI Abdelmoumin

Devant le jury :

- Président : Prof. KHELIFI Douadi, ENSB
- Examineur : Dr. MOSBAH Asma, UFMC1
- Encadreur : Dr. BELLIL Inès, UFMC1

Année universitaire 2018/2019

Remerciements

Avant toute chose nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force et les moyens afin de pouvoir réaliser ce travail.

*Nos remerciements les plus dévoués vont aux membres du jury : Pr. **KHELIFI DOUADI** et Dr. **MOSBAH ASMA** pour nous avoir honoré de leur présence et leur participation à ce jury.*

*Au terme de ce travail nous adressons également nos sincères remerciements à : Mme **BELLIL INES** et la doctorante Mlle **Bennouchene Djamila** pour avoir dirigé ce travail et accepté de nous encadrer, pour leur conseils et leur orientations.*

Nous remercions également tous les enseignants du Département des Sciences de La nature et de la vie.

Dédicace

À la mémoire de ma grande mère

Puisse Dieu l'accueillir dans son infinie miséricorde

À celui qui a toujours garni mes chemins avec force et lumière ... mon très cher père

À la plus belle perle du monde ... ma tendre mère

À mon frère, mes sœurs et à ma belle-sœur

Je leur souhaite tout le succès ... tout le bonheur

À mon petit ours KINENE

On vient à peine de se rencontrer, mais tu occupes déjà une grande place dans mon cœur... je t'adore plus que ma propre vie et je te souhaite tout le bonheur du monde

À mon oncle Kamel... Tout simplement merci pour ton aide précieuse

À toute ma famille pour l'amour et le respect qu'ils m'ont toujours accordé

À mon trinôme Amir et Brahim

À mes amis Minana, Anouar, Zaid et Abderrahim

Pour une sincérité si merveilleuse ... Jamais oubliable, en leur souhaitant tout le succès ...

À Rokja, Sabila et Rym

Vous qui m'avez soutenu et encouragé durant ces années d'étude

À toute personne

Qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma vie ...

Aimablement Boughezal Chakib

DEDICASE

Je dédie ce travail

A la mémoire de ma grande mère Sassia

A mon cher père lazhar

A ma chère mère wahida

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon
égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je
puisse atteindre mes objectifs*

*A toute la famille Bouguelli et Kebbabi pour l'amour
et le respect qu'ils m'ont toujours accordé*

*A mes chers ami(e)s : Ayoub, Chiheb, Oussama, Rym,
Oumeïma, Lina et oumnia*

*Pour leurs aides et supports dans les moments
difficiles*

*A mes autres amis : Mouhab, Safou, Hani, Farouk et
Didine, Anis, Imen, Rania, Sara, Nourhene, Maroua*

A mon trinôme Amir et Chakib

*A tous mes collègues d'études de Master 2 Biochimie
de la Nutrition*

Brahim

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A ma chère mère AKILA

A mon cher père HOCINE

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon
égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je
puisse atteindre mes objectifs*

A mon frère SAID, ma sœur wafa et ses enfants :

IYAD, ALINE ET AYA

Pour le soutien moral et leurs conseils précieux

A toute la famille SEDRATI et la famille

BOUHADDAD

A mes chers amis : ANIS, BUSTA

A mon trinôme BRAHIM et Chakib

*A tous mes collègues d'études de Master 2 Biochimie
de la nutrition*

Amir

Figure 1: Zone de distribution des sapins de la Méditerranée	5
Figure 2: Classification du genre <i>Abies</i> selon le type d'aiguilles.....	6
Figure 3: Les aiguilles de Sapin du Numidie.....	10
Figure 4: Statut de conservation de l' <i>Abies numidica</i> selon l'UICN.....	11
Figure 5: Une représentation schématique des tannins hydrolysables et condensés	16
Figure 6: La structure de base des anthocyanes.....	17
Figure 7: Quelques exemples des alcaloïdes.	18
Figure 8: Molécule isoprène	19
Figure 9: schéma récapitulatif des pathologies liées au stress oxydatif et les systèmes de défense	22
Figure 10: L' <i>Abies numidica</i> (district de Djebel el wahch)	25
Figure 11: Aiguilles sèches de l' <i>Abies numidica</i>	26
Figure 12: Le broyat des aiguilles sèches de l' <i>Abies numidica</i>	26
Figure 13: Agitation du macérât	27
Figure 14: Le macérât des aiguilles de l' <i>Abies numidica</i>	27
Figure 15: Le filtrat obtenu après macération des aiguilles de l' <i>Abies numidica</i>	28
Figure 16: Évaporation de l'extrait méthanolique par le rotavapor	28
Figure 17: L'extrait aqueux obtenu par dissolution de l'extrait méthanolique.....	28
Figure 18: Extraction liquide - liquide avec le : dichlorométhane (1), l'acétate d'éthyle (2) et le n-butanol (3).....	29
Figure 19: Protocole d'extraction des métabolites secondaires à partir des feuilles d' <i>Abies numidica</i>	30
Figure 20: Réaction de la réduction du radical DPPH en présence d'un polyphénol (Dudonné <i>et al.</i> , 2009)	34
Figure 21: la réaction de la réduction du radical ABTS ^{·+} en présence d'un polyphénol	35
Figure 22: La réaction de réduction de CUPRAC et le chromophore.	36
Figure 23: la réduction du fer ferrique (Fe ³⁺) en fer ferreux (Fe ²⁺)	37
Figure 24: <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Figure 25: <i>Bacillus subtilis</i>	39
Figure 26: <i>Escherichia coli</i>	39
Figure 27: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Figure 28: <i>Proteus vulgaris</i>	40
Figure 29: <i>Morganella morganii</i>	41
Figure 30: Préparation des milieux de culture	42

Figure 31: Incubation des souches bactériennes repiquées.....	42
Figure 32: Ensemencement et dépôt des disques.....	43
Figure 33: apparition de la mousse	44
Figure 34: (%) Activité de piégeage sur les radicaux DPPH de l'extrait n-butanol.....	46
Figure 35: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS en fonction de la concentration de la fraction n-Butanol	47
Figure 36: Inhibition du CUPRAC par la fraction n-Butanol.....	48
Figure 37: Pouvoir réducteur de l'extrait n-Butanol de l' <i>Abies numidica</i>	49
Figure 38: Effet de l'extrait n-Butanol sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Figure 39: Effet de l'extrait n-butanol sur <i>Morganella morganii</i>	52
Figure 40: Effet de l'extrait n-Butanol sur <i>Proteus vulgaris</i>	53
Figure 41: Effet de l'extrait n-butanol sur <i>Escherichia coli</i>	53
Figure 42: Effet de l'extrait n-Butanol sur <i>Bacillus subtilis</i>	53
Figure 43: Effet de l'extrait n-Butanol sur <i>Staphylococcus aureus</i>	54

Tableau 1: Classification scientifique de <i>l'Abies numidica</i>	9
Tableau 2: Les principaux acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.....	12
Tableau 3: Principaux acides hydroxycinnamiques.....	13
Tableau 4: Structures des squelettes de base des flavonoïdes	14
Tableau 5: La structure des différentes classes des anthocyanes.....	16
Tableau 6: Classification des terpènes.....	18
Tableau 7: matériels utilisés.....	24
Tableau 8: Résultats du screening photochimiques réalisé sur <i>Abies numidica</i>	43
Tableau 9: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par la fraction n-butanol	45
Tableau 10: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS par la fraction n-butanol	46
Tableau 11: L'absorbance de la fraction n-Butanolique dans l'activité CUPRAC	47
Tableau 12: L'activité antioxydante pouvoir réducteur de la fraction n-butanol	48
Tableau 13: Diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'extrait n-Butanolique	50

$1O_2$: Oxygène singulet

$A_{0.5}$: Concentration par rapport à l'absorbance 0.5

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis

$AcNH_4$: acétate d'ammonium

ADN : Acide désoxyribonucléique

AE : Acétate d'éthyle

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine triphosphate

BHA: Hydroxyanisole butylé

BHT: Hydroxytoluène butylé

CCM : Chromatographie sur couche mince

$Cu(I)-Nc$: Cuivre(I) bis (néocuproïne)

$Cu(II)-Nc$: Cuivre(II) bis (néocuproïne)

$CuCl_2$: chlorure de cuivre(II)

CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPPH: 2, 2 diphenyl-1-picryl hydrazyl

EtOH : Ethanol

Fe_2^+ : Fer ferreux

Fe_3^+ : Fer ferrique

$FeCl_3$: Chlorure de fer

GPx : Catalase et la glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HCl : Acide chlorhydrique

HgCl₂ : Chlorure de mercure

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium

KI : Iode de potassium

KOH : Hydroxyde de potassium

NaOH : Hydroxyde de sodium

Nc : Néocuproïne

NO[•] : Monoxyde d'azote

O₂^{•-} : Anion superoxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

OMS : Organisation mondiale de santé

ONOOH : Nitroperoxyde

RL : Radical libre

ROS : Espèces réactives d'oxygène

SO₂ : Dioxyde de soufre

SOD : Superoxydedismutase

TCA : Acide trichloroacétique

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

UV : Ultra-violet

H₂O : Eau

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste de tableaux	
Liste des abréviations	
Sommaire	
Introduction	1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur le genre *Abies*

1	Historique.....	3
2	Présentation du genre <i>Abies</i>	3
3	Répartition du genre <i>Abies</i>	3
	3.1 Dans le monde.....	3
	3.2 Dans la méditerranée.....	4
4	Différentes espèces du genre <i>Abies</i>	5
5	Activités pharmacologiques du genre <i>Abies</i>	6
	5.1 Activité anti fongique.....	6
	5.2 Activité anti-ulcérogène.....	6
	5.3 Activité anti tumorale.....	6
	5.4 Activité antitussive.....	7
	5.5 Activité anti microbienne.....	7
6	<i>Abies numidica</i>	7
	6.1 Introduction.....	7
	6.2 Découverte du Sapin de Numidie.....	7
	6.3 Nomenclature	7
	6.4 Aire de répartition.....	8
	6.4.1 Aire naturelle.....	8
	6.4.2 Aire artificielle et plantation.....	8
	6.5 Caractéristiques de l' <i>Abies numidica</i>	8
	6.5.1 Description botanique.....	8

6.5.2	Cycle de vie.....	9
6.5.3	Classification systématique.....	9
6.5.4	Statut de conservation UICN.....	10
6.6	Usage traditionnel et travaux scientifiques réalisés sur l' <i>Abies numidica</i>	10

Chapitre 2 : Métabolites secondaires

1	Généralité.....	11
2	Les composés phénoliques.....	11
2.1	Les acides phénoliques simples.....	11
2.2	les flavonoïdes.....	13
2.2.1	les propriétés des flavonoïdes.....	14
2.3	Les tannins	14
2.3.1	Tannins hydrolysables.....	15
2.3.2	Tannins condensés	15
2.4	Les anthocyanes	15
3	Les alcaloïdes	17
4	Les terpènes.....	18
4.1	Définition.....	18
4.2	Classification.....	18

Chapitre 3 : Activités biologiques

1	Activité antioxydante.....	19
2	Le stress oxydatif.....	19
3	Les radicaux libres ou espèce réactive de l'oxygène.....	19
4	Sources des radicaux libres.....	19
5	Rôles biologiques des radicaux libres.....	19
6	Le système antioxydant.....	20
6.1	Définition.....	20
6.2	Classification des antioxydants.....	20
6.2.1	Les antioxydants enzymatiques.....	20
6.2.2	Le système antioxydant non enzymatique.....	20
6.2.3	Les antioxydants naturels (Polyphénols).....	20
6.2.4	Mécanisme d'action des antioxydants.....	21
7	Activité antibactérienne.....	21

7.1 Généralités.....	21
7.2 Différentes méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	22
7.2.1 La méthode par diffusion.....	22
7.2.2 Méthode de dilution.....	22
7.3 Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide.....	23

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

1 L'extraction.....	24
1.1 Séchage et broyage.....	24
1.2 Extraction par macération.....	25
1.3 Fractionnement de la phase aqueuse.....	26
2 screening phytochimique.....	27
2.1 Tannins.....	27
2.2 Flavonoides.....	29
2.3 Anthocyanes.....	29
2.4 Coumarines.....	29
2.5 Alcaloïdes.....	29
2.6 Saponosides.....	29
2.7 Composés réducteurs.....	30
2.8 Lignanes, anthrones et les dérivés anthracéniques.....	30
3 Les activités biologiques.....	31
3.1 Evaluation de l'activité antioxydante.....	31
3.1.1 Mécanisme de piégeage des radicaux libres.....	31
a. Test DPPH.....	31
b. Test ABTS ⁺	32
3.1.2 Mécanisme de réduction.....	33
c. Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC).....	33
d. Essai du Pouvoir réducteur (Power Reducing Assay).....	35
3.2 Evaluation de l'activité antibactérienne.....	36
3.2.1 Les souches bactériennes testées.....	36
3.2.2 Méthodes de diffusion sur disque.....	39
A. Milieu de culture.....	40

B. Préparation de l'inoculum.....	40
C. Ensemencement et dépôt des disques.....	40

CHAPITRE 2 : Résultats et Discussions

1 Evaluation du screening phytochimique.....	43
2 Evaluation des activités biologiques.....	44
2.1 Les activités antioxydants.....	44
2.1.1 Mécanisme de piégeage des radicaux libres.....	44
a. test DPPH.....	44
b. Test ABTS ⁺	46
2.1.2 Mécanisme de réduction.....	47
c. Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC).....	47
d. Essai du Pouvoir réducteur (Power Reducing Assay).....	48
2.2 Evaluation de l'activité antibactérienne.....	50
Conclusion et perspectives.....	54

Introduction

L'utilisation des plantes médicinales pour soigner les maladies est aussi vieille que l'humanité. Le lien entre l'homme et la recherche de médicaments dans la nature date d'un passé très lointain. La prise de conscience de l'utilisation des plantes médicinales est le résultat de nombreuses années de lutte contre les maladies pendant lesquelles l'homme a appris à rechercher des médicaments dans les écorces, les graines, les fruits et d'autres parties des plantes. La science contemporaine a reconnu leur action active et a inclus dans la pharmacothérapie moderne une gamme de médicaments d'origine végétale, connue par les anciennes civilisations et utilisée à travers les millénaires (**Petrovska, 2012**).

Au cours des décennies passées, l'intérêt public pour l'utilisation des plantes médicinales dans l'industrie pharmaceutique a considérablement augmenté. Selon l'OMS, 80% de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour se soigner (**Basli et al., 2011**).

La région méditerranéenne possède une diversité biologique exceptionnelle : sa richesse floristique est estimée à 25000 espèces. La moitié de ces espèces sont endémiques du pourtour méditerranéen et sont bien adaptées aux périodes sèches (**Vela et Benhouhou, 2007**). L'Algérie par sa position géographique présente une grande diversité de biotopes occupés par une importante richesse floristique. Les systèmes forestiers occupent en Algérie une superficie de l'ordre de 4 millions d'hectares de forêts « naturelles », le reste étant composé de maquis et de reboisements (**Bneder, 2008**). En disposant d'une flore singulièrement riche et variée, on compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques (**Quezel et Santa, 1963**). Elles sont caractérisées par une remarquable diversité de résineux (*Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Tetraclinis articulata*, *Juniperus turbinata*, *Cedrus atlantica*, *Abies numidica*...) et de feuillus (*Quercus ilex*, *Q. suber*, *Q. canariensis*, *Q. afares*...) (**Dahmani-Megrerouche, 2018**).

En se basant sur l'utilisation des plantes appartenant au genre *Abies* en médecine traditionnelle et sur leur grande richesse et diversité en métabolites secondaires essentiellement des composés terpéniques, lignanes et composés phénoliques, faisant d'elles une source essentielle de principes actifs, notre recherche a été effectuée sur l'espèce *Abies numidica* de Lannoy.

La présente étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'une plante médicinale locale : le Sapin de Numidie. Notre travail se divise en

deux parties : la première partie est une synthèse bibliographique où nous apportons des généralités sur la plante, les métabolites secondaires et les activités biologiques. La deuxième partie, expérimentale, est consacrée à l'extraction de l'extrait n-butanol à partir des feuilles de l'*Abies numidica* et l'étude de son effet antioxydant et antibactérien. Enfin, une conclusion qui permettra de tirer les perspectives nécessaires pour mieux approfondir dans ce travail.

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Généralités sur le genre Abies

1 Historique

Le genre *Abies* est connu depuis des siècles, le botaniste Miller (1754) a utilisé le mot *Abies* pour désigner un genre : le sapin qui est parmi les arbres composant les forêts du pourtour méditerranéen. Parmi la famille des *Pinaceae*, le genre *Abies* est le plus complexe car il comprend 49 espèces localisées dans différents pays du monde (**Parducci et al., 2001 ; Hachi-illoul, 2016**).

2 Présentation du genre *Abies*

Le sapin est un arbre du genre *Abies* de la famille des *Pinaceae*. Il se retrouve dans des forêts tempérées froides de hautes altitudes. Le genre *Abies* compte 25 espèces en Asie du Nord et de l'Est (y compris l'Himalaya occidental), 16 espèces en Amérique centrale et du Nord et 7 espèces dans la région méditerranéenne de l'Europe et Asie du sud-ouest (**Xiang et al., 2014**).

Le genre *Abies* est localisé dans la méditerranée et constitue un ensemble d'une dizaine d'espèces d'importance très variable ; parmi eux : *Abies pinsapo*, *A.marocana*, *A.numidica*, *A.nebrodensis*, *A.cephalonica*, *A.cilicica*, *A.bornmülleriana*, *A.nordmanniana* et *A.alba* (**Ducray, 1998**).

3 Répartition du genre *Abies*

3.1 Dans le monde

- L'Amérique du nord est couverte par *A. balsamea*, *A. alba* (*A. pectinata*) retrouvés dans les montagnes de l'Europe et *A. siberica* répartis de l'Oural jusqu'à l'extrême orient.
- Les espèces qui ont une limite répartition géographique se divisent en 3 groupes :
 - **Région américaine** : 20 espèces situées à l'ouest de l'Amérique du Nord et la Colombie britannique.
 - **Région asiatique** : 40 espèces s'étendent sur la chaîne himalayenne et dans quelques îles japonaises et montagnes chinoises.
 - **Région méditerranéenne** : divisée en 2 groupes : Premier groupe formé de 6 espèces réparties sur le Nord de la méditerranée, le deuxième groupe formé de 4 espèces qui sont : le Sapin méditerranéen, le Sapin Nord anatoliens, le Sapin blanc et le Sapin du Roi Borri (**Hachi-illoul, 2016**).

3.2 Dans la méditerranée

La richesse floristique de la méditerranée correspond à 9.2% de la flore mondiale conservant plus de 25000 espèces sur 1.5% de la surface terrestre (Tili-Ait Kaki *et al.*, 2013) (Fig.1)

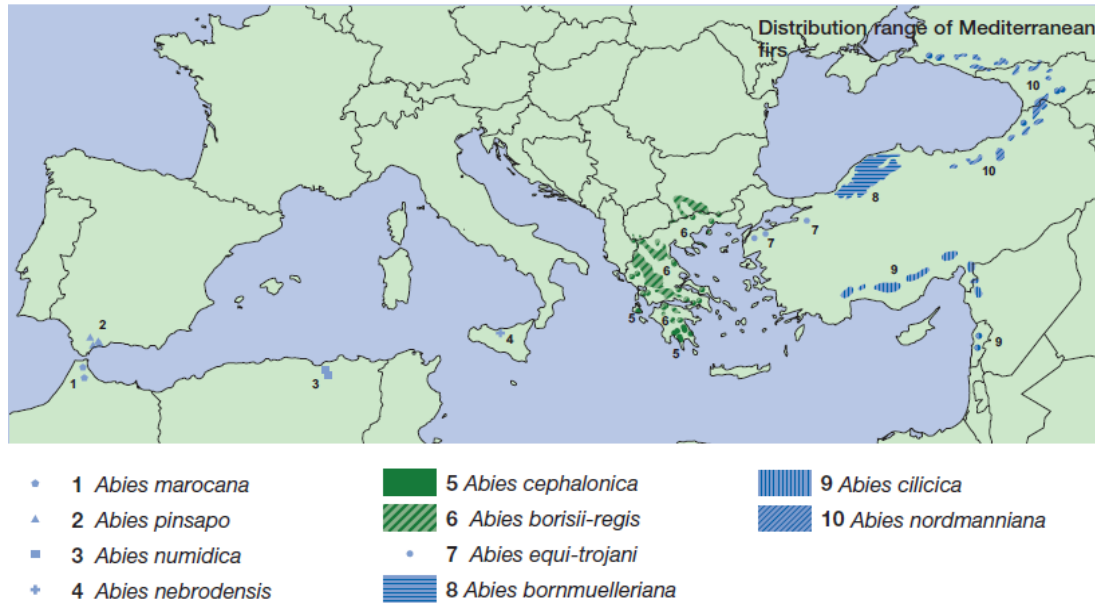


Figure 1: Zone de distribution des sapins de la Méditerranée (Alizoti *et al.*, 2011)

Le sapin peut être classé en 2 groupes selon le type des aiguilles : les sapins à aiguilles aiguës et ceux à aiguilles émarginées ou obtuses (Fig.2).

- Les sapins à aiguilles aiguës : *Abies pinsapo* (Espagne), *Abies marocana* à Tlassemtane (Maroc), *Abies cephalonica* en Grèce.
- Les sapins à aiguilles émarginées ou obtuses : *Abies numidica* sur les sommets des monts Babor et Tababort en Petite Kabylie (Algérie), *Abies nebrodensis* en Sicile, *Abies cilicica* localisé en Turquie, la Syrie et le Liban (Quezel, 1985).

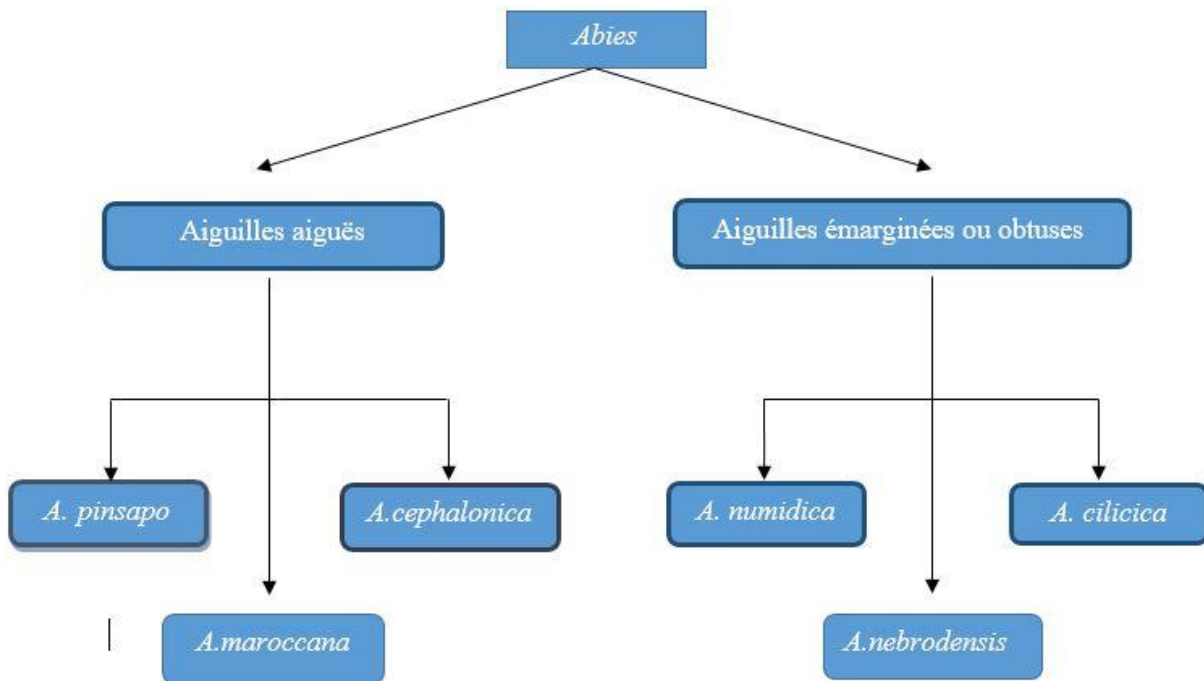


Figure 2: Classification du genre *Abies* selon le type d'aiguilles

4 Différentes espèces du genre *Abies*

Le genre *Abies* est représenté sur le pourtour méditerranéen par plusieurs espèces qui sont indiquées ci-dessous :

- *Abies numidica* : parmi les arbres endémiques en Algérie atteignant parfois 23 m et avec un tronc de 1 m de diamètre, il se retrouve uniquement dans les monts babor et tababort. L'*Abies numidica* est aussi cultivé en Europe.
- *Abies maroccana* : il est planté dans le sol calcaire, il occupe les forêts moyennes et qui sont bien irriguées. On le retrouve à Mont Tissouka, babrouida, mont Mago, mont Kraà.
- *Abies pinsapo* : parmi les sapins à aiguilles aiguës, il se retrouve dans 3 régions au sud de l'Espagne (Sierra de Ronda, de Bermeja et de Grazallema).
- *Abies nordmanniana* : il existe sur les chaînes pontiques orientales entre Giresun et la frontière turco-soviétique et aussi il est très répandu sur le Caucase.
- *Abies equitrojani* : il ne se retrouve que dans les deux localités d'Anatolie Nord-occidentale (Kaz Dag et Kemalpassa).

- *Abies cilicica* : il est apparu sur les sommets de l'Amanus en Turquie, des monts des Alaouïtes en Syrie et dans le nord du Mont Liban (K'Amouah et forêt d'Ehden).
- *Abies nebrodensis* : c'est une espèce très rare elle existe sur les crêtes des monts de la Madonie en Sicile.
- *Abies cephalonica* : est une espèce caractérisée par ses aiguilles aigues, il est beaucoup plus répandu sur les montagnes bordant le nord du golfe de Corinthe et dans le nord du Péloponnèse.
- *Abies bornmuelleriana* : parmi les sapins anatoliens, il est réparti dans la portion occidentale des chaînes pontiques entre l'Uiu Dag de Bursa à l'Ouest et la région de Samsun à l'Est (**Quezel, 1985**).
- *Abies borisiiregis* : Sapin du roi Boris, il relaie vers le Sud le Sapin blanc depuis la Macédonie, Chalcidique et l'Épire jusqu'au contact d'un peuplement de Sapin de Céphalonie (**Barbéro et Quézel, 1976**).

5 Activités pharmacologiques du genre *Abies*

5.1 Activité anti fongique

L'huile volatile et l'extrait du genre *A.sachalinensis* ont été testés sur certains champignons comestibles et ont prouvé une forte inhibition sur la croissance mycélienne (**Yoneyama et al., 1989**).

5.2 Activité anti-ulcérogène

Selon Singh *et al.*, (2000), les extraits de chloroforme, l'éther de pétrole et le benzène d'*A.pindrow* ont montré un effet protecteur dans l'ulcère induit par l'aspirine chez les rats albinos.

5.3 Activité anti tumorale

Un extrait aqueux de parties mélangées de *A. alba* et *Viscumalbuma* été testé sur des cellules malignes L-1210 chez les rats. Les résultats ont montré que l'extrait des plantes ci-dessus possédait des effets antiprolifératifs sur les cellules L-1210 avec une prolongation significative de la vie et une réduction de taux de croissance tumorale des animaux (**Karkabounas et al., 2000**).

5.4 Activité antitussive

L'extrait méthanolique de l'*A. webbiana* a été évalué pour son effet sur un modèle de toux induit par le dioxyde de soufre (SO₂) chez la souris. Lorsqu'il était administré par voie orale, il présentait une activité antitussive significative par rapport au contrôle, de manière dose-dépendante. L'activité antitussive de l'extrait a été comparée à celle du phosphate de codéine, un agent antitussif prototype. L'extrait de feuille d'*A. Webbiana* a montré une inhibition maximale de la fréquence de la toux de 71,69% et 78,67%, respectivement, par rapport au groupe témoin et son effet était comparable à celui du phosphate de codéine (Nayak *et al.*, 2003).

5.5 Activité anti microbienne

L'extrait brut de la résine obtenue des tiges et des racines d'*Abies cilicia* a joué un rôle efficace dans l'empêchement de la croissance des micro-organismes (Kizil *et al.*, 2002).

6 *Abies numidica*

6.1 Introduction

Abies numidica est un arbre appartenant aux conifères, famille des *Pinaceae* et du genre *Abies*. Se trouvant uniquement dans la forêt du mont Babors, cet endémisme lui confère une toute autre valeur, c'est un bien naturel, rare qu'il faut conserver et protéger pour lui éviter de compter parmi les espèces disparues (Tili-Ait Kaki *et al.*, 2013).

6.2 Découverte du Sapin de Numidie

Ce conifère a été découvert en 1861 par un militaire, le capitaine de Guilbert. Peu après, le botaniste Cosson, voyageant dans la même région, fit la description de cet *Abies* sous le nom d'*Abies pinsapo* var. *baborensis*. En 1862, De Lannoy le considéra comme une espèce à part, sous l'appellation d'*Abies numidica* de Lannoy, qui seule doit être conservée (Barbey, 1934).

6.3 Nomenclature

- *Baborensis* (Cosson, 1866)
- *Pinsapo* var. *Baborensis* (Cosson, 1866)
- *Pinsapo* var. *numidica* (De Lannoy ex Carr. 1884)
- *Pinsapo* ssp *numidica* (De Lannoy ex Carr. 1884)

- Sapin de Numidie, Sapin d'Algérie, Sapin de Kabylie, Sapin des Babors, The fir of Numidia, The fir of Algeria.

6.4 Aire de répartition

6.4.1 Aire naturelle

Le Sapin de Numidie a une aire de répartition restreinte dans le massif des Babors, en Kabylie orientale entre 1300 et 2000 m d'altitude dans l'étage montagnard humide et en mélange avec le chêne zeen (*Quercus Mirbecki*) et le cèdre (*Cidrus Libani*). La sapinière pure n'existe pas (Tlili-Ait Kaki *et al.*, 2013 ; Barbey, 1934).

6.4.2 Aire artificielle et plantation

En dehors de son aire naturelle en Algérie, selon Barbey (1934), les premières graines du Sapin de Numidie ont été introduites en France en 1862.

En Algérie, des introductions ont également été effectuées dans les forêts de l'Est notamment dans la forêt de Seraïdi (Annaba) et dans certains arboretums tel que l'arboretum de Djebel Ouahch (Constantine).

6.5 Caractéristiques de l'*Abies numidica*

6.5.1 Description botanique

C'est un arbre persistant pouvant atteindre 25 m de hauteur, à l'écorce grise et lisse dans le jeune âge, puis écailleuse brunâtre. Des rameaux vert olive ou brun légèrement sillonnés avec des aiguilles droites de 15-25 mm de longueur et de 2-3 mm de largeur et épaisses. Ces aiguilles sont disposées en brosse. Bourgeons ovoïdes pointus d'un brun rouge résineux à la base (Tlili-Ait Kaki *et al.*, 2013) (Fig.3).



Figure 3: Les aiguilles de Sapin du Numidie

6.5.2 Cycle de vie

Le Sapin de Numidie est une espèce monoïque. La floraison a lieu en avril. Les inflorescences mâles ont leurs boutons floraux de couleur rouge et deviennent jaunes quand elles s'épanouissent. Les inflorescences femelles sont vertes et donnent naissance à des cônes de 15cm de long par 3 à 4 cm de diamètre, cylindriques, de couleur brun gris à maturité. Ils contiennent des graines ailées de 2 à 3 cm de long (graine plus aile) (Tili-Ait Kaki *et al.*, 2013).

6.5.3 Classification systématique

La classification systématique est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 1: Classification scientifique de *l'Abies numidica* (Quezel et Santa, 1963)

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Coniferophyta</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinales</i>
Famille	<i>Pinaceae</i>
Genre	<i>Abies</i>
Espèce	<i>Abies numidica</i>

6.5.4 Statut de conservation UICN

Selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN), *l'Abies numidica* est une espèce rare et menacée d'extinction et classée dans la liste rouge de l'UICN (Yahi *et al.*, 2011) (Fig.4).

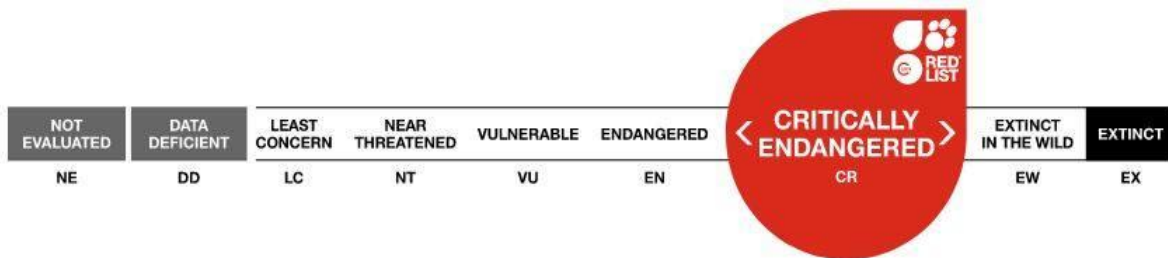


Figure 4: Statut de conservation de *l'Abies numidica* selon l'UICN (Yahi *et al.*, 2011).

6.1 Usage traditionnel et travaux scientifiques réalisés sur *l'Abies numidica*

Dans la médecine traditionnelle, les cônes de *l'Abies numidica* sont utilisés pour guérir certaines maladies pulmonaires et vasculaires, en plus sa gomme présente un effet antiseptique et antiscorbutique. L'huile du Sapin de Numidie, caractérisée par sa richesse en composés terpéniques, de camphène et des 2 Pinènes (α - β -pinène), est utilisée dans le traitement de certaines maladies des voies respiratoires, en plus de son extrait qui a un effet antibactérien (Belhadj Mostefa, 2016 ; Tlili-Ait Kaki *et al.*, 2013)

CHAPITRE 2 : Métabolites Secondaires

1 Généralité

Les plantes synthétisent des composés organiques dits métabolites secondaires (flavonoïdes, tannins, anthocyanes, ...). Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes ; d'où la dénomination de métabolites secondaires, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal et sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres ou bien les espèces réactives d'oxygène (ROS) (Choi *et al.*, 2002).

Les métabolites secondaires sont trouvés dans les différentes parties de la plante (racines, feuilles, graines). En fonction de leurs effets biologiques, ils jouent des rôles très importants et très diversifiés de protection, d'attraction et de régulation chez les plantes (Weston *et al.*, 2013).

Parmi les composés organiques synthétisés par les plantes, on trouve les métabolites secondaires qui ont différentes structures et fonctions notamment dans la protection des plantes contre le stress et les agressions extérieures. Ils ne sont pas aussi importants que les métabolites primaires (carbohydrates, lipides et acides aminés) qui assurent la survie, la croissance et le développement de la plante. Les métabolites secondaires sont répartis en trois principaux groupes : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes (Crozier *et al.*, 2006 ; Naik et Al-Khayri, 2016).

2 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules organiques de différentes structures chimiques et de rôles physiologiques trouvés essentiellement chez les végétaux (Jean-Jacques Macheix *et al.*, 1996).

2.1 Les acides phénoliques simples

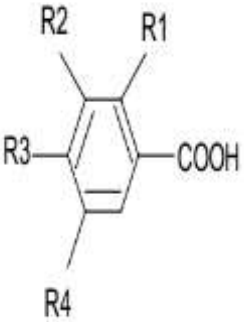
Les acides phénoliques désignent les phénols qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils sont considérés comme des bio-précurseurs des autres métabolites secondaires. Ils jouent un rôle très important dans la protection contre le stress oxydatif qui provoque des pathologies dégénératives comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, Alzheimer...

Ce groupe est divisé en deux classes :

a. Acides hydroxy-benzoïques

Sont des composés aromatiques dérivés de l'acide benzoïque et ont généralement une structure de base C₆-C₁ (Tableau2).

Tableau 1: Les principaux acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

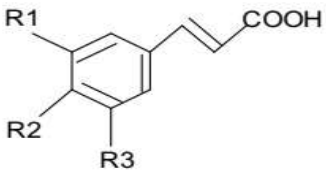
Structure	R1	R2	R3	R4	Acide phénolique
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	H	OH	H	OH	Acide gentisique

b. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement des composés d'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique. L'acide caféique se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de très nombreux fruits et à forte concentration dans le café ; Ils existent souvent liés à des molécules organiques (El Gharras, 2009).

Ils ont une structure de base de type C₆-C₃ (Tableau 3).

Tableau 2: Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

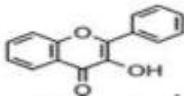
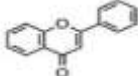
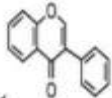
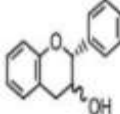
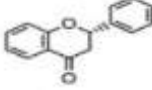
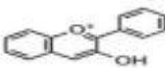
2.2 Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provient du mot latin « Flavus » qui signifie la coloration jaune. Les flavonoïdes sont des polyphénols, leur squelette contient plus de 15 atomes de carbone, organisé par deux noyaux aromatiques liés par un pont de trois atomes de carbones (Crozier *et al.*, 2006).

Ils ont différentes activités biologiques dans la plante où ils sont responsables de la couleur, l'arôme des fleurs. Ils protègent aussi la plante des facteurs abiotiques par exemple la sécheresse (Panche *et al.*, 2016). En outre, ils jouent un rôle très important dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène qui provoquent des maladies irréversibles.

Ce sont des substances antioxydantes de la famille des polyphénols contenus dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels : le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante, ce sont des molécules qui participent dans le système de croissance et de la régulation des gènes. Concernant la santé humaine ils ont un rôle majeur dans l'activité antioxydante et les maladies cardio-vasculaires. Selon leur squelette de base composé de quinze atomes de carbone qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane, les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes (Benhammou, 2011 ; Morand, 2014) (Tableau 4).

Tableau 3: Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Crozier *et al.*, 2006 ; Panche *et al.*, 2016)

Flavonoïdes	Structure	L'aliment
Flavonol		Les fruits et les végétaux
Flavone		Carottes, poivre vert, thym
Isoflavone		Pois-chiche, légumes
Flavan-3-ol		Noix, fruits et végétaux
Flavanone		Orange, citron
Anthocyane		Raisin, pomme de terre

2.2.1 Les propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes jouent un rôle très important, ils présentent des propriétés thérapeutiques bénéfiques grâce à leur structure qui est diversifiée.

Les flavonoïdes sont très connus pour leur activité antioxydante. Leur capacité à piéger les radicaux libres a été démontrée dans plusieurs travaux portant sur la quantification des flavonoïdes (Mamta *et al.*, 2012 ; Agbos *et al.*, 2015) qui ont prouvé qu'ils sont plus puissants que la vitamine C, E et les caroténoïdes (Dai et Mumper, 2010). Ainsi, les flavonoïdes possèdent des propriétés chélatrices des ions métalliques, antibactériennes, anticancéreuses, anti-inflammatoires, antivirales et antiallergiques.

2.3 Les tannins

Les tannins ou tanins, vient du mot français tan, écorce. Faisant partie du groupe des polyphénols, les tanins sont des substances naturelles organiques (Karamali, 2001) ; ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire compris entre 500-30000 Da

(Cowan, 1999). Ils contiennent dans leur structure suffisamment de groupements hydroxyles et d'autres groupes carboxyles (Kumar, 2017). Ils sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, les feuilles, les racines et les graines (Karamali, 2001).

Ce sont des molécules phénoliques hydrosolubles de différentes masses moléculaires qui sont divisées selon leur structure en : tannins hydrolysables et tannins condensés (Dumas et Charriere-Ladreix, 1979) (Fig.5).

2.3.1 Tannins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters composés 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.

2.3.2 Tannins condensés

Ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Benhammou, 2011).

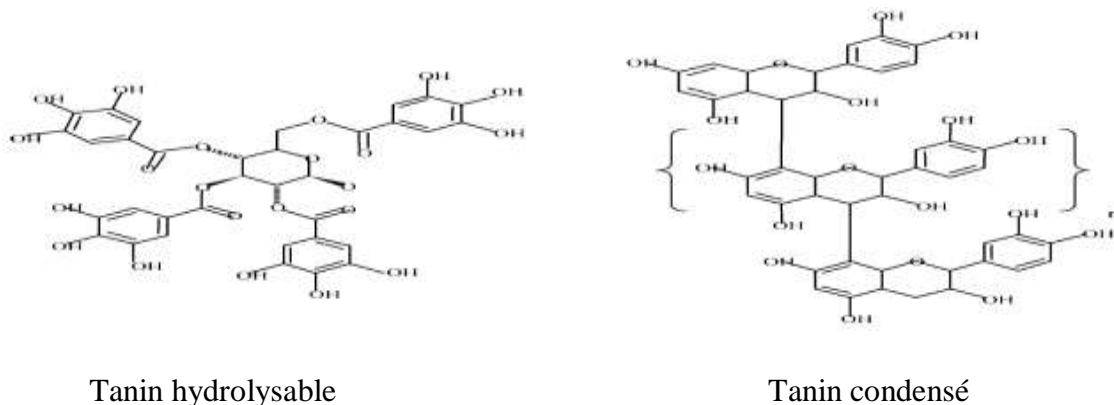


Figure 1: Une représentation schématique des tannins hydrolysables et condensés (Krause *et al.*, 2005).

2.4 Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments issus du métabolisme des flavonoïdes. Ils sont responsables de la couleur des feuilles et fruits auxquels ils donnent leur teinte bleu, violet et pourpre (Bruneton, 1993). Ils sont localisés dans les vacuoles de cellules de l'épiderme. La dénomination des anthocyanes provient du (grec anthos = fleur et kianos = bleu). (Amrani

Joutei et Gloris, 1994), Les anthocyanes sont des antioxydants qui jouent un rôle important dans le nettoyage de l'organisme des radicaux libres (**Jackman et Smith, 1996**).

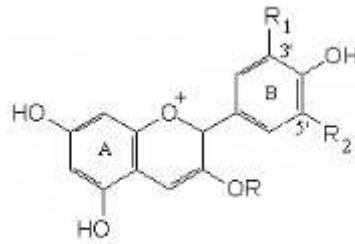


Figure 2: La structure de base des anthocyanes

Leurs structures se différencient par le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthyles sur le noyau B (Tableau 5).

Tableau 4: La structure des différentes classes des anthocyanes (**Sava et al., 2006**)

Anthocyanidine	Structure
Cyanidine	
Delphinidine	
Pélagonidine	
Malvidine	
Péonidine	
Pétunidine	

3 Les alcaloïdes

Un alcaloïde est une substance organique à base azotée, basique. Plus souvent hétérocyclique très majoritairement d'origine végétale. Leur dénomination provient (de l'arabe « al kaly » la soude, et du grec « eidos » aspect) et fait référence à leur caractère « alcalin » ou « basique » (**Donatien, 2009**).

Les alcaloïdes sont répartis en 3 types qui sont :

- **Alcaloïdes vrais** : ils sont toxiques et présentent une activité biologique. Ils dérivent d'acides aminés et contiennent un atome d'azote dans un système hétérocyclique (**Badiaga, 2011**).
- **Pseudo-alcaloïdes** : ont les mêmes caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne dérivent pas des acides aminés (**Badiaga, 2011**). Ils dérivent de la voie de l'acétate et d'isoprénoïdes (**Rakotonanahary, 2012**).
- **Proto-alcaloïdes** : Ils sont élaborés in vivo à partir des acides aminés, sont des amines simples. L'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique et ils sont souvent appelés « amines biologiques ». Ils sont solubles dans l'eau (**Badiaga, 2011**).

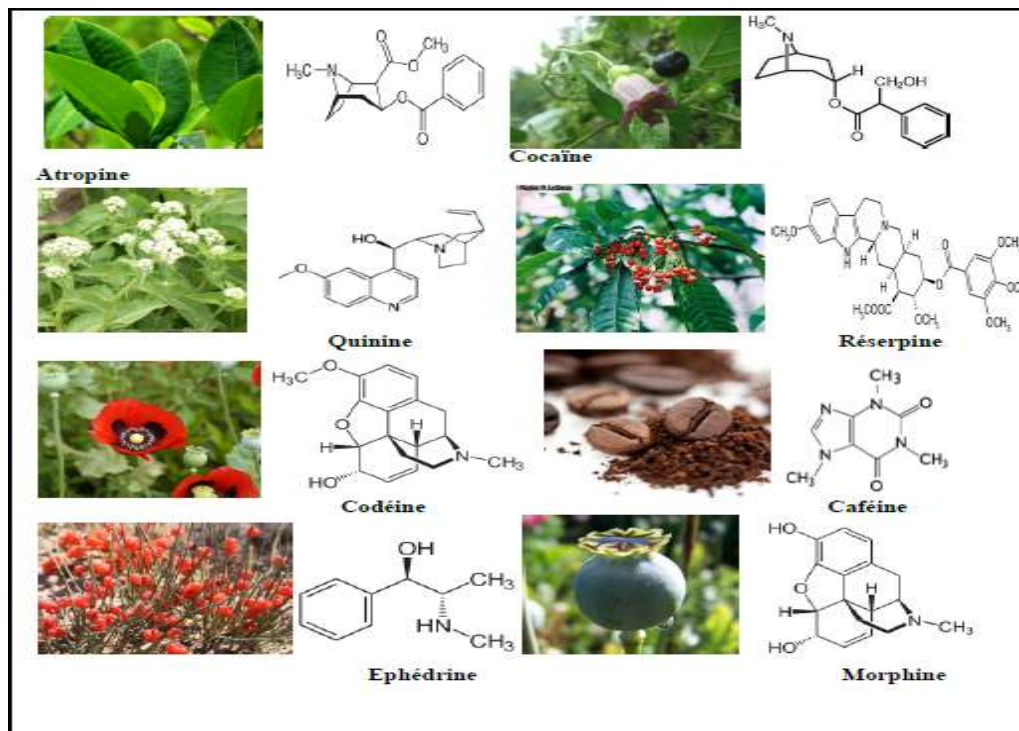


Figure 3: Quelques exemples des alcaloïdes (**Badiaga, 2011**).

4 Les terpènes

4.1 Définition

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (Fig.8). Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) (**Maurizid et Werner, 1988**).

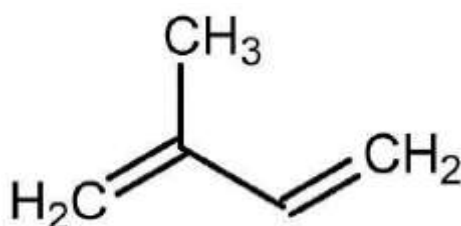


Figure 4: Molécule isoprène

4.2 Classification

Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Et ils sont formés du couplage de plusieurs unités isopréniques (Tableau 6).

Tableau 5: Classification des terpènes.

Monoterpènes	$C_{10}H_{16}$
Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$
Diterpènes	$C_{20}H_{32}$
Triterpènes	$C_{30}H_{48}$
Tétraterpènes	$C_{40}H_{64}$
Polyterpènes	$(C_5H_8)_n$

CHAPITRE 3 : Activités Biologiques

1 Activité antioxydante

L'intérêt thérapeutique croissant des antioxydants, spécialement ceux qui empêchent certains effets néfastes des radicaux libres sur le corps humain notamment, le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires et des problèmes du système immunitaire, a encouragé des recherches scientifiques à développer des méthodes pour extraire ces molécules à partir des plantes médicinales et d'autres substances naturelles (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Abdalla et Roozen, 1999**).

2 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif ou le stress oxydant, est défini comme étant un déséquilibre de la balance entre les agents oxydants et les systèmes antioxydants. Il se manifeste lorsque les radicaux libres (RL), molécules instables oxydantes, sont produites en excès et qu'elles ne peuvent être neutralisées par l'organisme. Ces RL vont réagir avec des biomolécules comme : L'ADN, protéines, lipides afin de se stabiliser causant ainsi des pathologies dégénératives tels que cancer, vieillissement cellulaire, maladies cardiovasculaires, Alzheimer,... (**Yoshikawa et Naito, 2002 ; Halliwell, 2007**) (Fig.9).

3 Les radicaux libres ou espèce réactive de l'oxygène

Radical libre ou espèce réactive de l'oxygène (ROS), C'est une molécule chimique qui possède un électron libre (**Preiser, 2012**) dans l'orbitale la plus externe ; elle est très active et peut réagir avec l'ADN, les protéines, les lipides ...provoquant des dommages délétères (**Manisha et al., 2017**), structuraux et fonctionnels (**Bensakhria, 2018**).

4 Sources des radicaux libres

Les ROS peuvent provenir d'une source endogène (mitochondrie, peroxyosome) (**Favier et al., 1994**) ou bien d'une source exogène (agents environnementaux, alimentation, médicaments) (**Sumaya-Martinez, 2004**) (Fig.9).

5 Rôles biologiques des radicaux libres

- Jouent le rôle d'un second messenger.
- Participent dans la signalisation cellulaire.
- Modulation de la transcription.

- Forment le NO•, c'est une molécule qui joue un rôle très important dans la dilatation vasculaire.
- Jouent un rôle dans la synthèse de l'ADN, les hormones stéroïdes et les acides gras.
- La synthèse de l'ATP.
- Détoxification des xénobiotiques par le cytochrome P450 (Phaniendra, 2015).

6 Le système antioxydant

6.1 Définition

Le métabolisme a mis en place de nombreuses stratégies anti-oxydantes visant à lutter contre les agressions radicalaires. Parmi celles-ci, on peut citer l'utilisation d'antioxydants moléculaires et enzymatiques. Les antioxydants sont des agents qui réagissent spontanément avec les oxydants de manière à les inactiver, les éliminer ou diminuer leur concentration, faisant ainsi office de bouclier cellulaire partiel ou total (Civit *et al.*, 2008). Ils peuvent être soit exogènes (provenant essentiellement des apports alimentaires) soit endogènes (produits directement par l'organisme) (Fig.9).

6.2 Classification des antioxydants

6.2.1 Les antioxydants enzymatiques

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx).

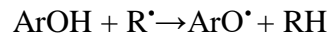
6.2.2 Le système antioxydant non enzymatique

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydants nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C (Avissar *et al.*, 1989).

6.2.3 Les antioxydants naturels (Polyphénols)

Les phénols sont des molécules qui contiennent un ou plusieurs noyaux aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (OH). Ils peuvent être extraits à partir de plantes naturelles ou synthétiques. Une grande partie de ces molécules est présente dans l'alimentation. Les plus connus sont les acides phénoliques (benzoïque ou cinnamique), les flavonoïdes, et les tannins. Les polyphénols sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes.

L'antioxydant phénolique agit avec le radical libre par transfert d'un atome d'hydrogène via la rupture homolytique de la liaison O-H.



Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste, et le radical ArO^{\bullet} (forme oxydée de l'antioxydant). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est moins réactif (Fig.9).

6.2.4 Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants agissent :

- En inhibant la formation des radicaux libres, on parle d'antioxydant de rupture de chaîne désigné aussi sous forme « Antioxydant vrai ».
- En fixant directement l'oxygène préférentiellement dans la phase de propagation.
- En chélatant les métaux catalyseurs d'oxydation, on parle alors « d'Antioxydant secondaire ».

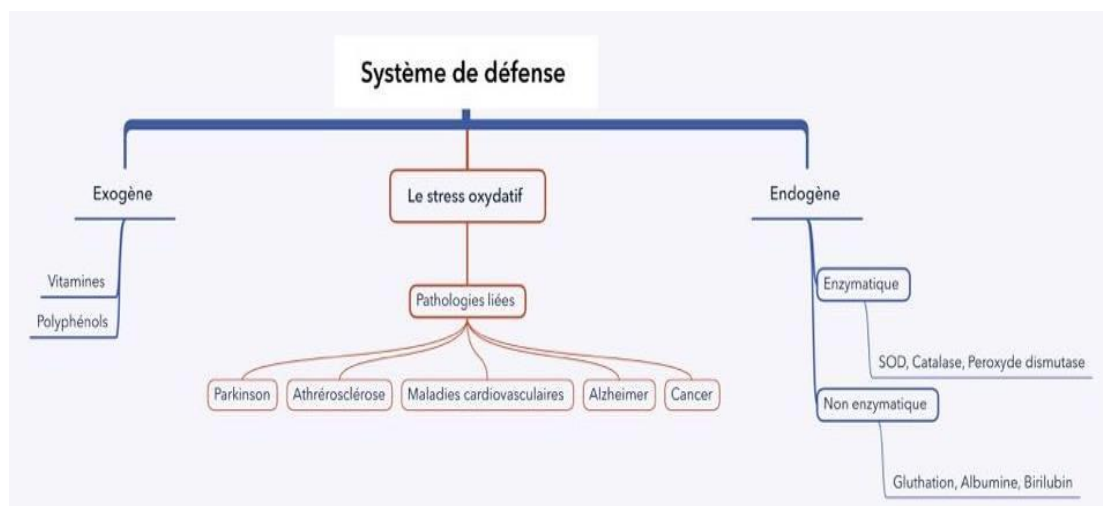


Figure 1: schéma récapitulatif des pathologies liées au stress oxydatif et les systèmes de défense

7 Activité antibactérienne

7.1 Généralités

A cause de leurs fréquences et de leur gravité dans les pays en cours de développement, les maladies infectieuses présentent une grande importance dans le domaine de la santé publique, plusieurs bactéries étant impliquées dans ces infections. Pour cette raison, les

recherches scientifiques se sont focalisées, dans ces dernières années, sur l'identification de certaines molécules ayant une activité antibactérienne extraite essentiellement des plantes médicinales (Traoré *et al.*, 2012).

7.2 Différentes méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

7.2.1 La méthode par diffusion

Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'évaluation du pouvoir antibactérien d'extraits de plantes, d'huiles essentielles ou de produits purs, parmi elles :

a. La méthode de diffusion à partir de disques imprégnés (Méthode de Kirby – Bauer)

Il s'agit de la méthode de diffusion sur disque la mieux décrite pour laquelle des normes d'interprétation ont été élaborées et qui s'appuie sur des données cliniques et de laboratoire. Elle peut comporter des modifications mineures donnant lieu à plusieurs variantes, mais la plus utilisée en routine reste la méthode de Kirby-Bauer modifiée.

Cette méthode consiste à imprégner des disques de papier en une quantité définie d'agent antimicrobien, puis à les placer sur un milieu de gélose uniformément ensemencé avec l'organisme d'essai. Un gradient de concentration des antibiotiques se forme par diffusion à partir du disque et la croissance de l'organisme d'essai est inhibée à une distance du disque qui est liée entre autres facteurs à la sensibilité de l'organisme.

b. La méthode de diffusion à partir des puits

Le principe de cette méthode est similaire à celui de la méthode des disques ; il consiste à réaliser des puits dans la gélose de 2.5mm de profondeur, qui sont par la suite remplis d'extraits ou d'antibiotique à tester (Carbonnelle, 1988 ; Colins et Lync, 1976 ; Vandepitte *et al.*, 1994). La lecture des zones d'inhibition se fait de la même manière que dans la méthode des disques.

7.2.2 Méthodes de dilution

Les techniques de dilution sont utilisées en milieu solide ou liquide. Le principe de ces méthodes consiste à mettre en contact un inoculum bactérien standardisé avec des concentrations croissantes de la substance antimicrobienne testée selon une progression bien définie afin de déterminer la CMI de cette dernière (Burnichon et Texier, 2003).

7.3 Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique de l'extrait est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture.

- S'il y a croissance bactérienne, l'extrait a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- S'il y a une absence de la croissance bactérienne, l'extrait présente un effet bactéricide vis-à-vis cette souche.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : Matériels et Méthodes

1 L'extraction

1.1 Séchage et Broyage

Les feuilles ont été séchées à l'air libre pendant 1 mois puis broyées par un broyeur mécanique jusqu'à l'obtention d'un broyat (Fig.11, Fig.12).



Figure 1: Aiguilles sèches de l'*Abies numidica*



Figure 2: Le broyat des aiguilles sèches de l'*Abies numidica*

1.2 Extraction par macération

L'extrait brut a été obtenu par macération de 100 g de broyat des aiguilles dans 800 ml méthanol à 80% (V/V) à une température ambiante et sous agitation (Fig.13). Après 24 heures, une filtration a été réalisée et l'extrait a été concentré à 40°C par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor type Buchi RII (Fig.14 ; Fig.15 ; Fig.16). Plusieurs macérations ont été achevées dans les mêmes conditions afin d'obtenir le maximum de métabolites secondaires.



Figure 3: Agitation du macérât



Figure 4: Le macérât des aiguilles de l'*Abies numidica*



Figure 5: Le filtrat obtenu après macération des aiguilles de l'*Abies numidica*



Figure 6: Évaporation de l'extrait méthanolique par le rotavapor

1.3 Fractionnement de la phase aqueuse

L'extrait méthanolique est dissout dans 300 ml d'eau distillée et laisser décanter pendant 24 heures pour donner un extrait aqueux (Fig.17).



Figure 7: L'extrait aqueux obtenu par dissolution de l'extrait méthanolique

La solution aqueuse ainsi obtenue, est soumise à une extraction liquide- liquide avec les solvants organiques suivants : dichlorométhane, l'acétate d'éthyle puis le n- butanol, ces solvants ont des polarités croissantes (Fig. 18).

La fraction organique n-butanol obtenue a été soumise aux différents tests afin d'évaluer son activité antioxydante et antibactérienne (Fig.19).

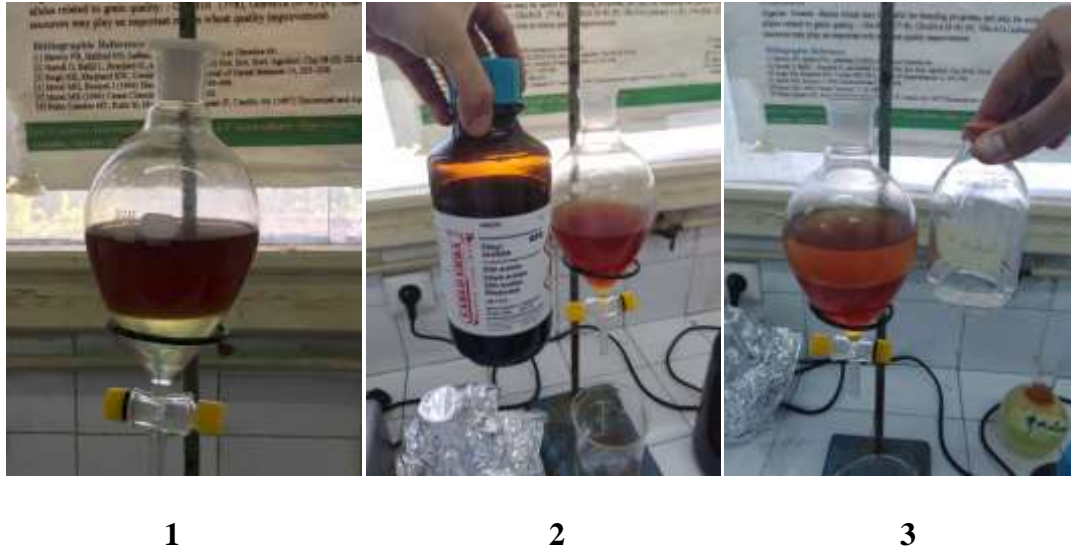


Figure 8: Extraction liquide - liquide avec le : dichlorométhane (1), l'acétate d'éthyle (2) et le n-butanol (3)

2 Screening phytochimique

Des tests en tube à essai sont réalisés sur la fraction n-Butanolique extraite des aiguilles de Sapin de Numidie afin de déterminer de manière préliminaire les différentes classes phytochimiques contenues dans la plante. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et de précipitation.

2.1 Tannins

Pour révéler la présence des tannins dans l'extrait n-Butanolique, 1.5 g d'extrait n-Butanolique est dissout dans 10 ml méthanol (80%), le mélange a été agité pendant 15 min, quelques gouttes de FeCl_3 (1%) sont ajoutées au mélange. L'apparition d'une couleur bleu-noire ou bleu verte indique la présence des tannins (**Trease et Evans, 1987**).

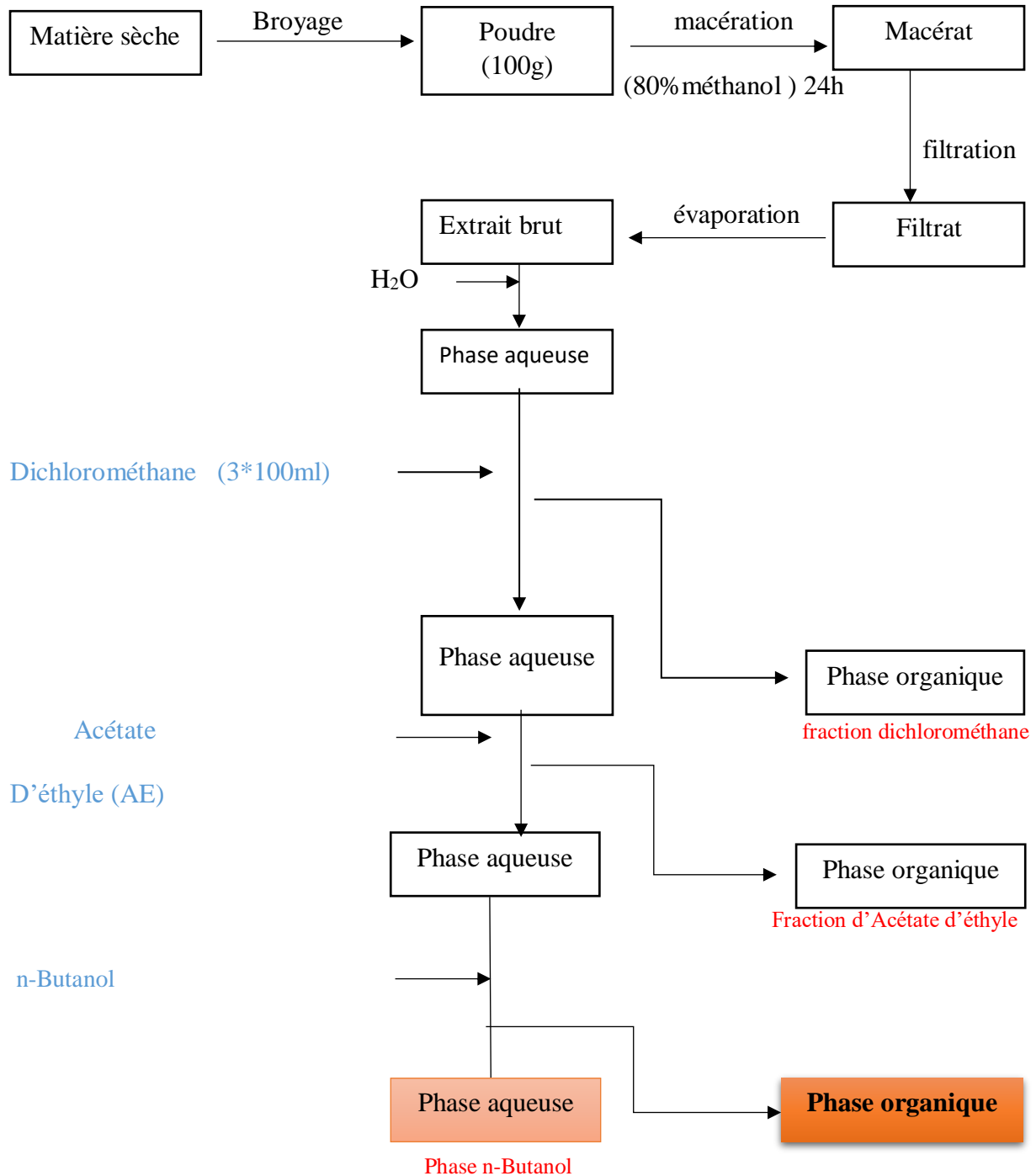


Figure 9: Protocole d'extraction des métabolites secondaires à partir des feuilles d'*Abies numidica*

2.2 Flavonoïdes

5 ml de l'extrait n-Butanolique ont été mélangés avec 1ml de l'HCl concentré, puis, 0.5 g de tournure de Magnésium est ajouté. L'apparition de la couleur rouge ou rose indique la présence des flavonoïdes.

2.3 Anthocyanes

1g de l'extrait est dissout dans 10 ml d'eau distillée, le mélange a été bien agité pendant 1heure. 2 ml de l'extrait ont été mis dans un tube à essai avec 5ml de H₂SO₄ et 5 ml d'ammoniaque. L'apparition d'une coloration bleu-violacée confirme la présence des anthocyanes (**Debray et al., 1971 ; Paris et Moyses, 1969**).

2.4 Coumarines

La détection de la présence de ces molécules consiste à : mettre 1 g de l'extrait des feuilles dans un tube qui contient quelques gouttes d'H₂O ; puis recouvrir le tube avec un papier imbibé par NaOH dilué (10%). Ce mélange est mis à ébullition. Après la détection par la lampe UV, L'apparition d'une fluorescence jaune indique la présence des coumarines. (**Rizk, 1982**).

2.5 Alcaloïdes

2ml de l'extrait ont été mélangés avec 10ml H₂SO₄ dilué (1/2) pendant 24 heures, on prend 2 tubes :

- **1^{er} tube** : 1ml du mélange + 5gouttes de réactif de Mayer

NB : préparation du réactif de Mayer :

- ❖ 1,358g de chlorure de mercure (HgCl₂) dans 60 ml d'eau ionisée.
- ❖ 5g Iode de potassium (KI) dans 10 ml d'H₂O.

Les deux solutions sont mélangées et le volume est complété à 100ml avec de l'eau distillée.

- **2^{ème} tube** : 1ml du mélange + 5gouttes de réactif de Wagner

L'apparition d'une turbidité/ précipité après 15min indique la présence des alcaloïdes (**Paris et Moyses, 1969**).

2.6 Saponosides

Les saponosides sont caractérisés par la formation de la mousse. Pour les détecter, 2g de l'extrait n-Butanolique des feuilles sont dissous dans 100ml d'eau distillée, le mélange est mis

à ébullition pendant 30 min et laissé refroidir (Dohou *et al.*, 2003). 10 tubes sont préparés et le mélange a été réparti ainsi :

Extrait (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L'eau distillée (ml)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

Tous les tubes sont agités avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes, l'apparition de la mousse persistante indique la présence des saponosides.

- pas de mousse (-)
- hauteur de mousse moins de 2cm (+)
- hauteur de mousse entre 2 cm et 2.5 cm (++)

2.7 Composés réducteurs

La détection des composés réducteurs consiste à mélanger 1ml d'extrait n-Butanolique avec 1 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling. La formation d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (Trease et Evans, 1987).

2.8 Lignanes, anthrones et les dérivés anthracéniques

Les lignanes ont été mis en évidence dans l'extrait n-Butanolique par une chromatographie sur couche mince (CCM), selon les étapes suivantes :

- **La préparation de l'extrait** : l'extrait est dissous dans le méthanol.
- **La préparation de la phase mobile** : la phase mobile est constituée de trois solvants qui ont des polarités différentes : chloroforme/ méthanol/eau distillée (6,2ml ; 3,2ml ; 0,6ml).
- **La migration sur la plaque de chromatographie** : après les dépôts de l'extrait à l'aide d'un capillaire en verre, la plaque a été mise horizontalement dans une cuve de la chromatographie contenant la phase mobile. Laisser la migration jusqu'à le trait de front.
- **La révélation**
 - **Pour les lignanes** : Après la migration, la plaque a été immergée dans une solution de révélation (10ml H₂SO₄ est mis dans 100 d'éthanol, puis

chauffage à 110°C pendant 30min. l'apparition d'une couleur violette rougeâtre indique la présence des lignanes.

- **Anthrones et dérivés anthracéniques** : la plaque a été mise dans une solution de révélation de KOH à 5%, après chauffage, la plaque a été observée sous UV, l'apparition d'une fluorescence jaune indique la présence des anthrones, et une coloration rouge prouve la présence des dérivés anthracéniques.

3 Les activités biologiques

3.1 Évaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs tests afin d'évaluer l'activité antioxydante, chacun d'entre eux ayant leur cible spécifique au sein de la matrice et tous présentant des avantages et des inconvénients. Aucune méthode ne peut donner des résultats clairs, et la meilleure solution consiste à utiliser différentes méthodes au lieu d'une seule approche. Certaines de ces procédures utilisent des antioxydants synthétiques ou des radicaux libres, certaines sont spécifiques à la peroxydation lipidique et ont tendance à avoir besoin de cellules animales ou végétales, certaines ont une portée plus large, certaines exigent un minimum d'une préparation et des connaissances minimales (Carocho et Ferreira, 2013).

Quatre tests ont été utilisés pour évaluer la capacité antioxydante *in vitro* de l'extrait n-Butanolique de l'*Abies numidica* étudiée dans ce travail : pouvoir piègeur du radical DPPH⁺, test de piégeage du radical cationique ABTS⁺, test CUPRAC et le pouvoir réducteur.

3.1.1 Mécanisme de piégeage des radicaux libres

a. Test DPPH

▪ Principe

Le DPPH (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) est un radical instable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorbance spectral maximal à 517 nm. En présence d'antioxydants, l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit au changement de la couleur de DPPH du violet foncé (forme radicalaire DPPH) au jaune (forme réduite DPPH-H) (Fig.20). Ce changement de couleur est dû à la capacité de l'échantillon de piéger ce radical (Ramadan, 2010).

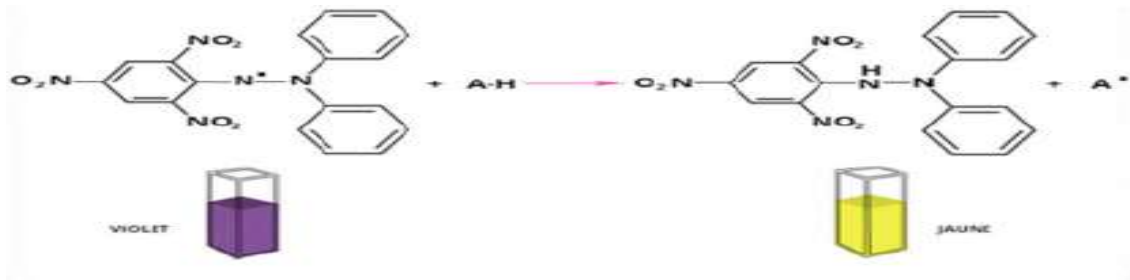


Figure 10: Réaction de la réduction du radical DPPH[•] en présence d'un polyphénol (Dudonné *et al.*, 2009)

- **Mode opératoire**

L'effet scavenger de l'extrait n-Butanolique d'*Abies numidica* vis-à-vis du radical DPPH[•] est évalué selon la méthode décrite par (Blois, 1958), Un volume de 160 μ l de la solution de DPPH est mélangé avec 40 μ l de l'extrait à différentes concentrations. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm dans un lecteur microplaque.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

A0 : absorbance du contrôle sans extrait.

A1 : Absorbance d'après l'addition de l'extrait.

Le paramètre EC₅₀ (valeur de « concentration efficace ») ou la valeur IC₅₀, c'est la concentration de l'extrait qui provoque une inhibition de 50% de l'activité du DPPH (changement de la couleur).

b. Test ABTS. +

- **Principe :**

Le radical ABTS^{•+} (couleur bleu-vert) va être formé par une réaction avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), après l'addition d'un antioxydant qui va réduire ce radical, en provoquant une décoloration du mélange (Lien *et al.*, 1999) (Fig.21). L'absorbance a été mesurée à 734nm à l'aide d'un lecteur microplaque (Re *et al.*, 1999).

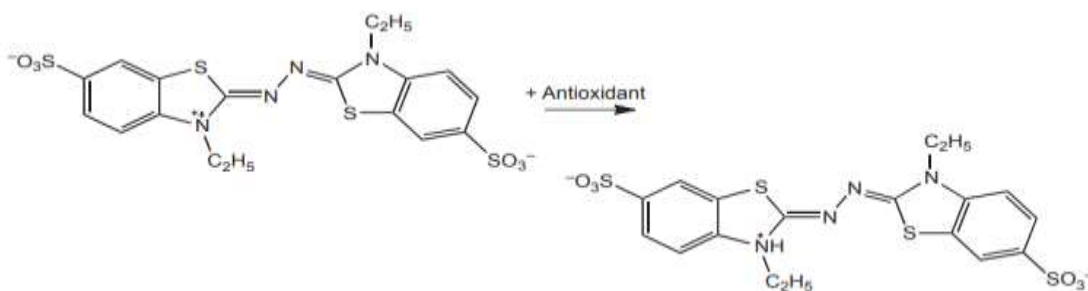


Figure 11: la réaction de la réduction du radical $ABTS^{\cdot+}$ en présence d'un polyphénol (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019)

- **Mode opératoire**

Le protocole de détermination de la capacité antioxydante par le piégeage du radical libre ABTS est adopté par (Re *et al.*, 1999).

La solution d'ABTS (7 mmol ABTS et 2,45 mmol persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$)) est incubée à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures. Cette solution est ensuite diluée avec l'éthanol ou H_2O pour obtenir une absorbance finale de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. L'extrait à différentes concentrations (40 μ l) est mélangé avec (160 μ l) de la solution diluée d'ABTS. Le mélange est soumis à une agitation, puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à une température ambiante. La lecture est réalisée à l'aide d'un lecteur microplaque à 734 nm.

L'activité anti-oxydante de décoloration du cation $ABTS^+$ a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{Effet scavenger } ABTS^+(\%) = (A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / (A \text{ contrôle}) * 100$$

A contrôle : absorbance du contrôle.

A échantillon : absorbance de l'échantillon.

3.1.2 Mécanisme de réduction

c. Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

L'évaluation de l'activité antioxydante CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), réalisée selon le protocole d'Apak *et al.*, (2004), est un test spectrophotométrique basé sur le transfert des électrons.

Le réactif oxydant chromogène utilisé pour le test CUPRAC est le cation du cuivre(II) bis (néocuproïne) ($Cu(II)-Nc$) servant d'agent de transfert d'électrons de la sphère extérieure et le chromophore CUPRAC ; Le cation cuivre(I) bis (néocuproïne) ($Cu(I)-Nc$) se forme par

réduction du cuivre(II) bis (néocuproïne) (Cu(II)-Nc) par des antioxydants, (Fig.22). Ce réactif est utilisé à pH 7 et l'absorbance du chélate de Cu(II) formé à la suite de la réaction d'oxydo-réduction avec les polyphénols, est mesurée à 450 nm. La couleur jaune-orange est due au chélate Cu(I)-Nc formé. Les réactions de CUPRAC sont essentiellement terminées en moins d'une heure (Apak *et al.*, 2004).

Le réactif CUPRAC, chlorure de cuivre(II) néocuproïne (Cu(II)-Nc), réagit avec les antioxydants réducteurs d'électrons n de la manière suivante :

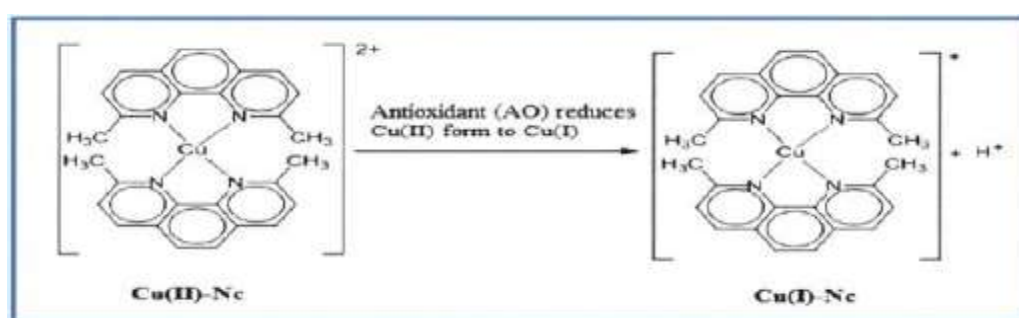
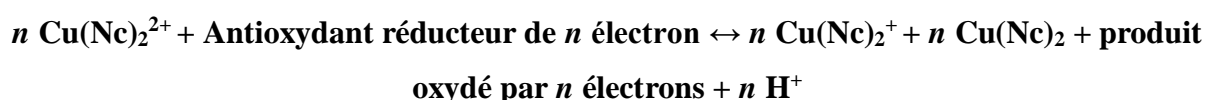


Figure 12: La réaction de réduction de CUPRAC et le chromophore : le cation chélate de cuivre I Bis (néocuproïne) (les protons libérés dans la réaction sont neutralisés par le tampon NH₄Ac) (Apak *et al.*, 2004).

- **Préparation des solutions**

Une solution de chlorure de cuivre(II) à une concentration de 170,50 g/mol a été préparée à partir de CuCl₂·2H₂O pesant 0,042625g, à dissoudre dans 25 ml d'H₂O. Un tampon d'acétate d'ammonium (AcNH₄) à pH 7,0 a été préparé en dissolvant 19,27 g d'AcNH₄ (M= 77 g/mol) dans 25 ml de l'eau. Une solution de néocuproïne (Nc) à une concentration de 208.27 g/mol a été préparée en dissolvant 0,039 g de Nc dans 25 ml de l'éthanol (EtOH) à 96%.

- **Mode opératoire**

40 µl de l'extrait n-Butanolique ont été ajoutés + 60 µl de tampon d'acétate d'ammonium (AcNH₄) + 50 µl de la solution de chlorure de cuivre(II) (CuCl₂) +50 µl de solution de néocuproïne (Nc), pour obtenir un volume final de 200 µl. Après 1 heure, l'absorbance à 450 nm a été mesurée par rapport à un blanc réactif. La courbe d'étalonnage standard de l'antioxydant a été construite en traçant l'absorbance en fonction de la concentration molaire.

d. Essai du Pouvoir réducteur (Power Reducing Assay)

- **Principe**

Ce test est basé sur la capacité de l'extrait à réduire le fer ferrique (Fe_3^+) en fer ferreux (Fe_2^+). C'est une évaluation du pouvoir donneur d'électron. Dans cet essai, la couleur jaune de la solution d'essai change en différentes nuances de vert et de bleu, en fonction du pouvoir réducteur de chaque composé. La présence de réducteurs (c'est-à-dire d'antioxydants) provoque la réduction du complexe Fe_3^+ / ferricyanure de potassium en une forme ferreuse. Par conséquent, la mesure de la formation du bleu de Prusse de Perl à 700 nm peut surveiller la concentration Fe_2^+ (**Ferreira et al., 2007**) (Fig.23).

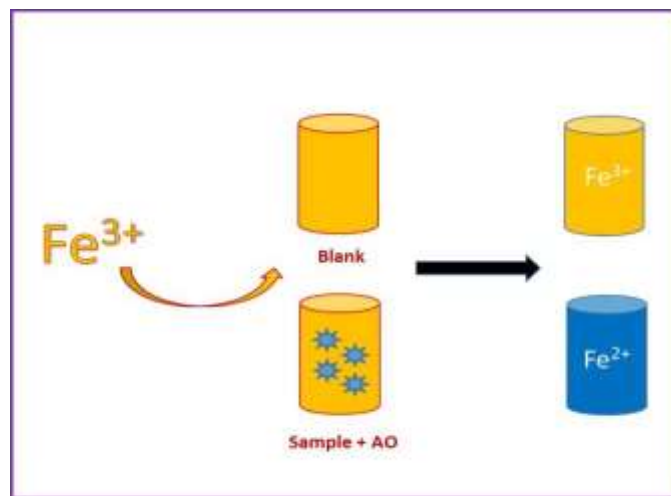


Figure 13: la réduction du fer ferrique (Fe_3^+) en fer ferreux (Fe_2^+)

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur de l'extrait n-butanol a été réalisé en adaptant le procédé d'Oyaizu, (1986). Cette activité consiste à mélanger 10 μl de l'extrait à différentes concentrations avec 40 μl de tampon phosphate de sodium et 50 μl d'une solution à 1% de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Le contenu a été bien agité puis incubé à 50°C pendant 20 min. Après incubation, 50 μl d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% ont été ajoutés. L'absorbance a été lue à 700 nm. Une absorbance plus élevée indique un pouvoir réducteur plus élevé. L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants synthétiques (Acide ascorbique, acide tannique et l' α -Tocophérol).

3.2 Évaluation de l'activité antibactérienne

3.2.1 Les souches bactériennes testées

Les souches bactériennes testées dans l'évaluation de l'activité antibactérienne sont obtenues à partir de l'hôpital universitaire de Constantine (CHU) et sont les suivantes :

A. Bactéries Gram (+)

- *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram+, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (**Patrick et Haines, 1988**). *S. aureus* est la cause de méningite, ostéomyélite et de diarrhée (**Steven et al. 2004**) (Fig.24).

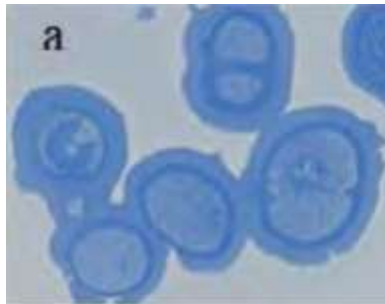


Figure 14: *Staphylococcus aureus* (**Proksch et Kirkiacharian, 1992**)

- *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie Gram+, mobile, sporulée qui a servi de modèle pour l'étude moléculaire (**Bridier et al., 2011**), considérée comme inoffensive pour l'Homme. Les *Bacilli* sont en outre connus pour produire en grandes quantités des enzymes, protéases et amylases, utilisées dans l'industrie des détergents et dans l'industrie agro-alimentaire (**Danchin et al., 1998**) (Fig.25).

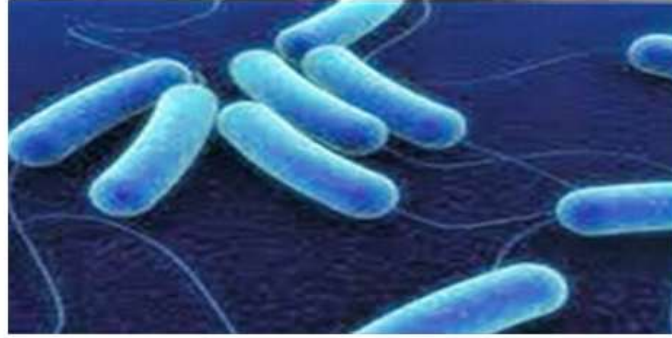


Figure 15: *Bacillus subtilis* (Shahzad *et al.*, 2015)

B. Bactéries Gram (-)

- *Escherichia coli* :

Escherichia coli est un bacille à gram- (Patrick *et al.*, 1988), de forme non sporulée, mobile, (Steven *et al.*, 2004). Les bactéries *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont capables de déclencher des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale et peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (Patrick *et al.*, 1988) (Fig.26).

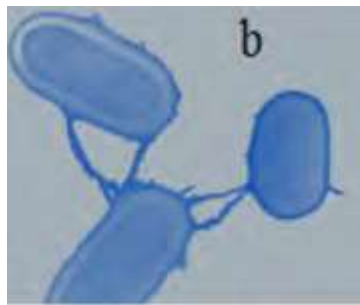


Figure 16: *Escherichia coli* (Proksch et Kirkiacharian, 1992)

- *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram-, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 μm de long et 0.5 à 0.8 μm de large. Elles sont mobiles. *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3^{ème} rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le premier rang pour les infections pulmonaires basses et le troisième rang pour les infections urinaires (Richard et Kiredjian, 1995) (Fig.27).

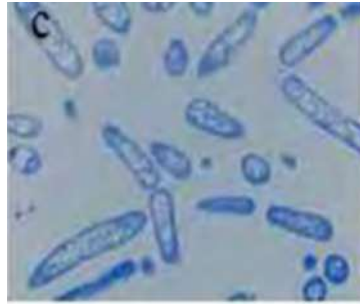


Figure 17: *Pseudomonas aeruginosa* (Proksch et Kirkiacharian, 1992)

- *Proteus vulgaris*

Proteus existe à la fois dans l'intestin grêle humain et animal, dans l'estomac et en plus dans l'environnement naturel. Il peut aussi former des biofilms sur les surfaces de divers objets, y compris les appareils d'insertion chez l'homme. Il peut induire des infections protéiques, en particulier des voies urinaires, qui sont fréquentes chez les patients immunodéprimés (Lee *et al.*, 2017) (Fig.28).

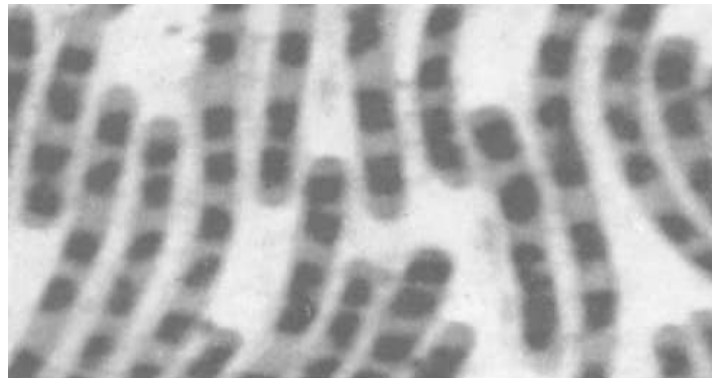


Figure 18: *Proteus vulgaris* (Robinow, 1944)

- *Morganella morganii*

Est un bâtonnet gram- que l'on trouve couramment dans l'environnement et dans le tractus intestinal des humains, des mammifères et des reptiles. Il peut être responsable des infections polymicrobiennes et peut rarement causer des décès chez les patients affaiblis (Falagas *et al.*, 2006) (Fig.29).

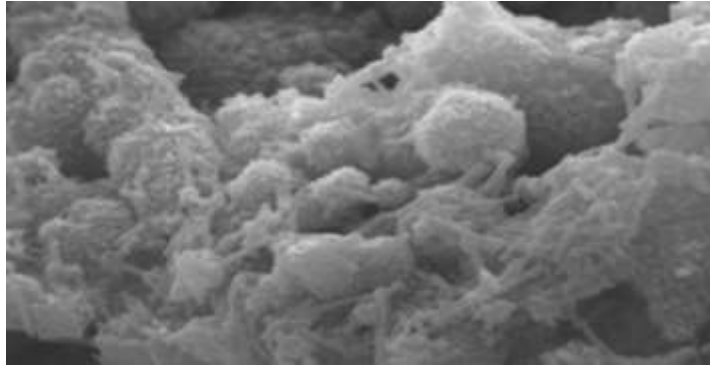


Figure 19: *Morganella morganii* (Broomfield *et al.*, 2009)

3.2.2 Méthode de diffusion sur disque

L'activité antibactérienne de l'extrait n-Butanolique est réalisée *in vitro* par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé selon le protocole décrit par (Biondi *et al.*, 1993).

- **Principe de la méthode**

Le principe de cette méthode se résume en un disque de papier imprégné de l'extrait ou de l'antibiotique à différentes concentrations, déposé directement sur la gélose, uniformément ensemencée avec le germe à tester. La croissance du germe est inhibée à une distance du disque par rapport à sa sensibilité à l'extrait ou à l'antibiotique diffusé. La limite de la zone d'inhibition est détectée à l'œil nu et s'accorde à l'endroit où la croissance bactérienne commence (Bauer *et al.*, 1966).

L'interprétation de la zone d'inhibition se fait soit par rapport au diagramme de références superposable aux zones d'inhibition, soit à l'aide d'une règle en fonction des diamètres donnés dans un tableau, ainsi les germes sont classés en « sensibles », « intermédiaires » ou « résistants » (Ericsson et Sherris, 1971).

- **Mode opératoire**

- A. Milieu de culture**

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu gélose nutritive qui est fondu à 45°C, coulé en boîte de pétri puis laissé refroidir pendant 10 à 15 min (Fig.30).

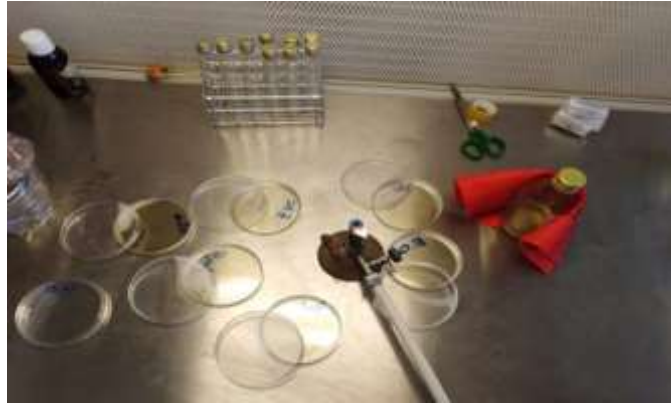


Figure 20: Préparation des milieux de culture

- B. Préparation de l'inoculum**

Les différentes souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur gélose nutritive, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures (Fig.31).



Figure 21: Incubation des souches bactériennes repiquées

A partir de ces cultures jeunes, des colonies pures sont isolées pour préparer l'inoculum bactérien. Chaque colonie est mise en suspension dans 5ml d'eau physiologique stérile. La turbidité de la suspension est comparée à 0.5 Mc Farland.

- C. Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement de l'inoculum est réalisé en effectuant des stries serrées sur la gélose. Cette opération est répétée 3 fois en tournant la boîte de 60°.

Des disques stériles de papier filtre de 6 mm de diamètre, sont imprégnés de 10 μ l d'extrait et les disques de témoin négatif sont imprégnés de DMSO. Les disques sont déposés délicatement sur le milieu géloséensemencé préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées. Les boîtes sont mises au frigo pendant 1 heure pour la diffusion de l'extrait, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques sont mesurés en mm (Fig.32).

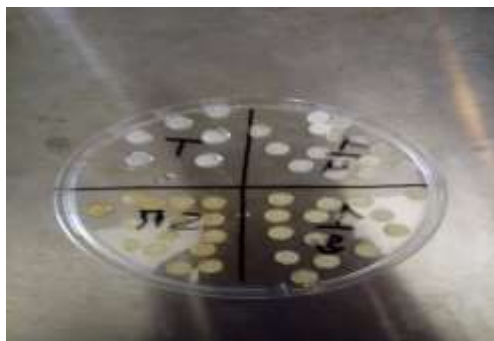


Figure 22: Ensemencement et dépôt des disques

CHAPITRE 2 : Résultats et Discussion

1 Évaluation du Screening Phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique de l'extrait n-butanolique de la plante *abies numidica* a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques représentés dans le tableau ci- dessous:

Tableau 1: Résultats du screening photochimiques réalisé sur *Abies numidica*

Métabolites secondaires	Extrait n-Butanolique
Tannins	-
Flavonoïdes	+++
Saponosides	+++
Coumarines	-
Anthocyanes	+
Composés réducteurs	+
Lignanes	+
Anthrones	+
Dérives anthracéniques	-

(-) : Absent, (+) : Présent, (+++) : Riche

Les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, révèlent que l'*Abies numidica* est très riche en flavonoïdes et en saponosides par la formation de mousse dans le tube à essai dépassant les 2 cm de hauteur (Fig.33).



Figure 1: apparition de la mousse

En ce qui concerne, les anthocyanes et les composés réducteurs, ils sont moyennement présents dans l'extrait n-Butanolique. Par contre, les tannins et aussi les coumarines sont absents. Ceci peut être expliqué par une différence au niveau de plusieurs paramètres qu'ils soient géographiques, physicochimiques ou biologiques tels que : la différence du site de récolte y compris l'environnement de la plante, la lumière, les précipitations, la topographie, la saison, le type de sols, la période de récolte, le patrimoine génétique, la procédure d'extraction utilisée, la partie de la plante étudiée (El-houd, 2018).

L'analyse chromatographique a été faite dans le but de confirmer la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires dans l'extrait. Le tableau ci-dessus indique la présence des anthrones et des lignanes par l'examen sous la lampe ultraviolette, à l'exception, des dérivés anthracéniques dont la recherche s'est montrée négative.

2 Évaluation des activités biologiques

2.1 Les activités antioxydantes

2.1.1 Mécanisme de piégeage des radicaux libres

a. Test DPPH

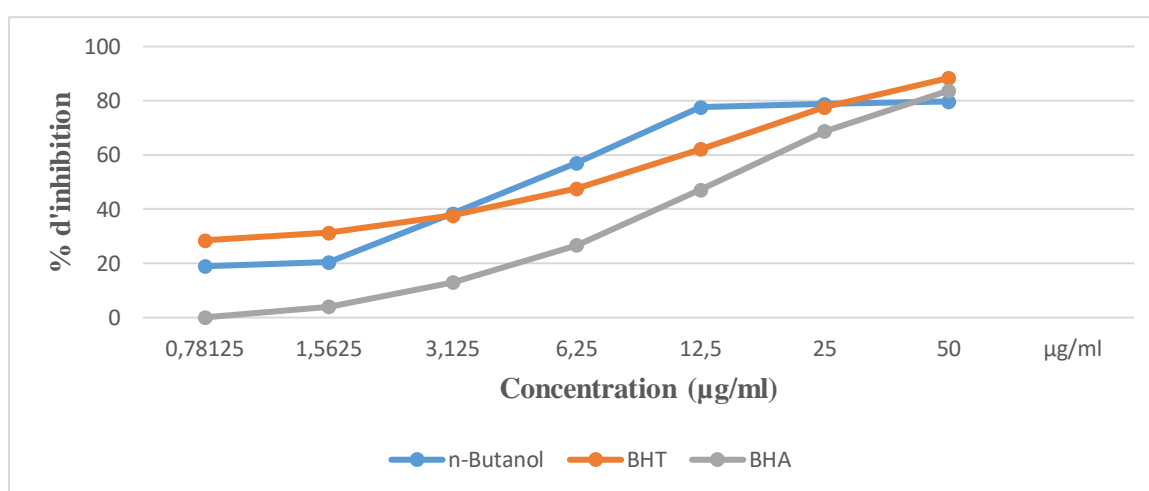
Une solution de DPPH fraîchement préparée présente une couleur pourpre foncé avec une absorption maximale à 517 nm. Cette couleur pourpre disparaît généralement lorsqu'un antioxydant est présent dans le milieu. Ainsi, les molécules antioxydantes peuvent neutraliser les radicaux libres DPPH, en fournissant des atomes d'hydrogène ou par don d'électrons, et les convertir en un produit de couleur jaune (Ferreira *et al.*, 2007).

La concentration d'inhibition de l'extrait n-butanolique ($IC_{50}=5,28 \mu\text{g/ml}$) est voisine de celle du standard BHT ($IC_{50}=6,55 \mu\text{g/ml}$), ce qui reflète une activité anti-oxydante importante de l'extrait (Tableau 9).

Les valeurs de la concentration d'inhibition (IC_{50}) dans le test DPPH' de l'extrait n-butanolique de l'*Abies numidica* ainsi que les standards utilisés (BHT et BHA) sont donnés sur le tableau ci-dessous.

Tableau 2: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par la fraction n-butanol

Extrait	IC ₅₀ µg/ml
n-Butanol	5,28±0,26
BHT	6,55±0,59
BHA	15,74 ±0,47

**Figure 2:** (%) Activité de piégeage sur les radicaux DPPH de l'extrait n-Butanol

On remarque que l'activité antiradicalaire de l'extrait n-Butanolique évolue avec l'augmentation des concentrations et que le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à atteindre un plateau. Le pourcentage d'inhibition maximal du radical DPPH par l'extrait n-butanol, BHT et BHA est de : 77.55 %, 88.33 % et 83.69 %, respectivement. Ces résultats montrent l'efficacité de l'extrait n-Butanolique comparativement aux standards à réduire le radical DPPH. Le pourcentage d'inhibition 50%, déduit à partir des courbes des pourcentages d'inhibition des standards et de l'extrait n-butanolique est un paramètre important pour l'évaluation de l'activité antioxydante ; plus cette valeur est faible, plus l'activité antioxydante est puissante (Fig. 34).

b. Activité scavenging du radical ABTS^{•+}

Dans ce test l'extrait a montré une bonne activité ($IC_{50}=3.48 \mu\text{g/ml}$) de piéger le radical ABTS^{•+} comparé aux deux standards BHT et BHA utilisés de valeurs d' IC_{50} qui sont $1.55 \mu\text{g/ml}$ et $7.54 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Les valeurs des IC_{50} de notre extrait comparé aux standards utilisés (BHT et BHA) sont représentées dans le (tableau 10).

Tableau 3: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS par la fraction n-Butanol

Extrait	$IC_{50} \mu\text{g/ml}$
n-butanol	3.48 ± 0.02
BHT	1.55 ± 0.26
BHA	7.54 ± 0.67

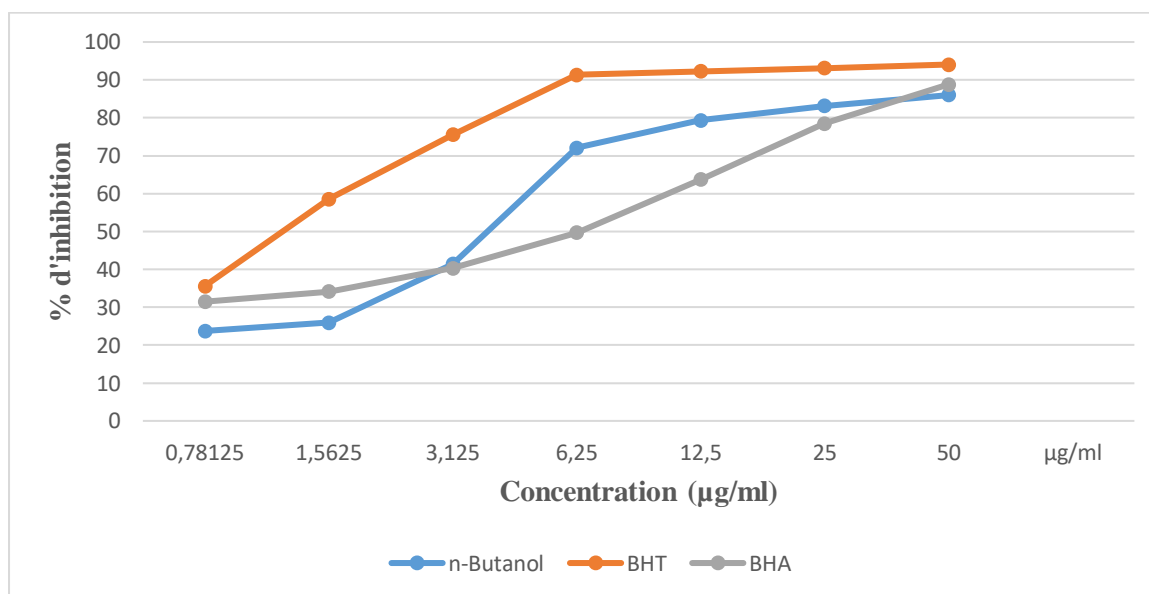


Figure 3: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS en fonction de la concentration de la fraction n-Butanol

Ce test montre que le radical cation ABTS^{•+} a été inhibé de façon significative à toutes les concentrations testées (figure 35), et de manière dose dépendante par l'extrait n-Butanol. À des concentrations maximales ($50 \mu\text{g/ml}$), cet extrait a inhibé de 85.98% le radical ABTS^{•+}. Contre 88.81% pour le standard BHA et de 94.06% pour celui de BHT. Ces résultats montrent l'efficacité de notre échantillon comparativement aux standards à réduire le radical ABTS^{•+}.

2.1.2 Mécanisme de réduction

c. La réduction cuprique (CUPRAC)

Dans la méthode CUPRAC, les résultats sont représentés par $A_{0.5}$ correspondant à la concentration par rapport à l'absorbance 0.5.

Dans cet essai, l'extrait n-Butanolique a révélé une capacité anti-oxydante forte ($A_{0.50}$: $5,79\mu\text{g/ml}$). Néanmoins, les résultats restent inférieurs à ceux des standards (BHT : $1,34\mu\text{g/ml}$, BHA : $3,44\mu\text{g/ml}$) comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau 4: L'absorbance de la fraction n-Butanolique dans l'activité CUPRAC

Extrait	$A_{0.5} \mu\text{g/ml}$
n-Butanol	$5,79\pm 0,33$
BHT	$1,34\pm 0,11$
BHA	$3,44\pm 0,04$

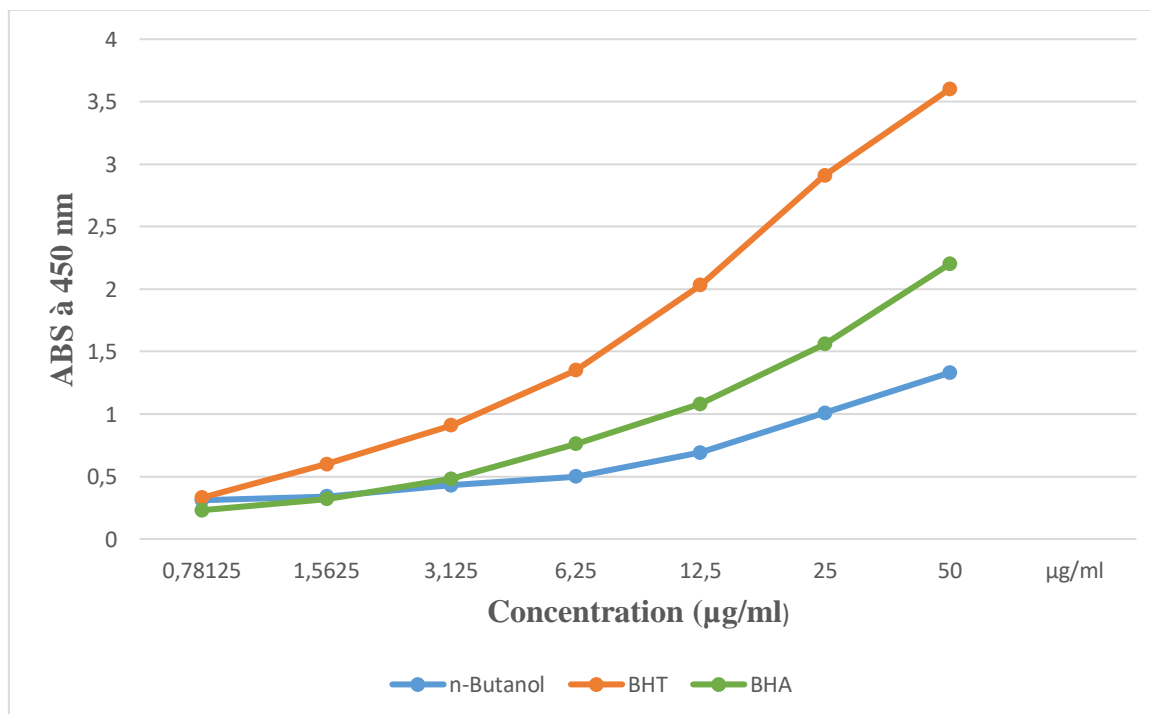


Figure 4: Inhibition du CUPRAC par la fraction n-Butanol

L'extrait n-Butanol a montré une meilleure capacité antioxydante par réduction du cuivre que celles des standards BHA et α -tocophérol (figure 36).

d. Pouvoir réducteur

Dans cet essai, l'extrait n-Butanol et le standard α -Tocophérol se sont avérés très proches l'un de l'autre ($A_{0.5}$: 32.30 μ g/ml, $A_{0.5}$: 34.93 μ g/ml, respectivement). Cependant, les résultats obtenus restent inférieurs aux valeurs du standard acide ascorbique (Tableau 12).

Tableau 5: L'activité antioxydante pouvoir réducteur de la fraction n-Butanol

Extrait	$A_{0.50}$ μ g/ml
n-Butanol	32.30 \pm 1.84
Ascorbic acid	6.77 \pm 1.15

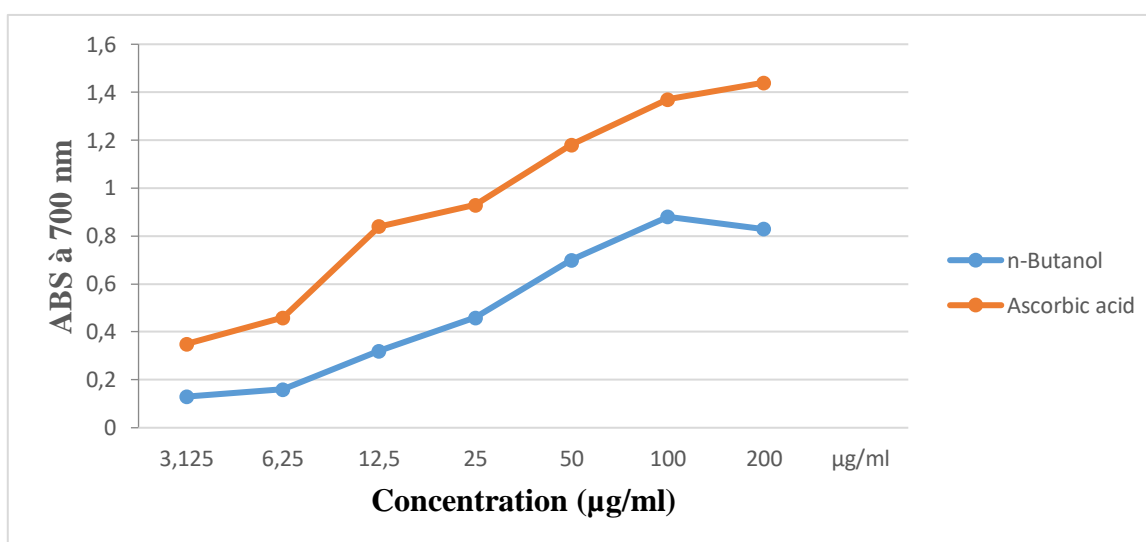


Figure 5: Pouvoir réducteur de l'extrait n-Butanol de l'*Abies numidica*

Le pouvoir réducteur de l'extrait n-Butanol a augmenté d'une manière dose dépendante (figure 37). En effet, aux concentrations de 3.125 - 6.25 -12,5 -25 – 50 – 100 -200 μ g/ ml l'extrait a donné des pouvoirs réducteurs respectifs 0.13, 0.16, 0.32, 0.46, 0.7, 0.88 et 0.83, comparativement au standard utilisé (l'acide ascorbique) ce qui indique que l'extrait a un fort pouvoir réducteur.

Les conclusions tirées des quatre tests utilisés pour évaluer la capacité antioxydante de l'extrait n-Butanol de l'*Abies numidica* étudiée dans notre travail sont les suivantes :

- Avec le test de DPPH, une excellente activité antioxydante de l'extrait n-Butanol avec une valeur $IC_{50} = 5,28 \mu\text{g/ml}$. Il est à noter que cette valeur est proche de celle du standard BHT dont la valeur d' IC_{50} est $6,55 \mu\text{g/ml}$.
- Le test $ABTS^{\cdot+}$, l'extrait a montré une bonne activité antiradicalaire avec un $IC_{50} = 3.48 \mu\text{g/ml}$ supérieur à celui des standards BHT et BHA.
- Dans la méthode du CUPRAC, l'extrait présente un pouvoir antioxydant important ($A_{0.50}: 5,79 \mu\text{g/ml}$) mais qui reste bien faible comparé aux standards.
- Dans l'essai pouvoir réducteur, le pouvoir réducteur de l'extrait n-Butanol était excellent ($A_{0.50}: 32.30 \mu\text{g/ml}$). Cela pourrait être dû à sa capacité à donner de l'hydrogène. En conséquence, l'extrait n-Butanol de l'*Abies numidica* pourrait contenir des quantités plus importantes de réducteurs, qui pourraient réagir avec les radicaux libres pour se stabiliser et bloquer les réactions radicalaires en chaîne.

Globalement, l'extrait n-Butanol de l'*Abies numidica* s'avère être une source importante d'antioxydants ; Ce qui a été affirmé par les tests qui en ont révélé de meilleures propriétés antioxydantes (valeurs d' IC_{50} élevées). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que l'activité antioxydante de l'extrait dépend essentiellement de la nature des composés qu'il contient (richesse en polyphénols), de la différence de polarité et de leur vulnérabilité au traitement qu'ils subissent lors du procédé d'extraction.

Un tel résultat très prometteur nous mène à conclure que cet extrait pourrait contenir le principe actif responsable de cette très haute activité anti-oxydante.

2.2 Évaluation de l'activité antibactérienne

Tableau 6: Diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'extrait n-Butanolique

	Souches bactériennes	n-Butanol
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	22 mm
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	24,5 mm
Gram-	<i>Morganella Morganii</i> ATCC 25830	20 mm
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19,66 mm
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	24 mm
	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 29905	20,33 mm

Selon le tableau ci-dessus et les figures ci-dessous, les souches bactériennes testées sont apparues de sensibles à très sensibles vis-à-vis de l'extrait n-Butanolique. Cela montre clairement que cet extrait exerce une activité antibactérienne sur les six souches étudiées, avec un diamètre maximal d'inhibition vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 24.5 mm et 24 mm respectivement et *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* et *Escherichia coli* se sont montrées très sensibles à l'extrait n-butanol, avec un diamètre d'inhibition de 22 mm, 20.33 mm, 20 mm et 19.66 mm respectivement. Cela peut être expliqué par le fait que l'activité antibactérienne de l'extrait de la plante *Abies numidica* est due aux différents agents chimiques présents dans cet extrait y compris les flavonoïdes, les tannins et les triterpènes principalement les saponosides ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyles libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas *et al.*, 1992 ; Marjori, 1999). D'autres chercheurs ont montré que l'activité antibactérienne est dûe à la nature des bactéries de Gram- ou Gram+ qui est liée à la différenciation dans la structure membranaire de ces bactéries et aussi au mode d'extraction et la concentration du principe actif (Benyagoub *et al.*, 2016).

L'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié traduit l'action bactériostatique. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une

bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (Sagdiç, 2003).

- **Bactéries Gram (-)**



Figure 6: Effet de l'extrait n-Butanol sur *Pseudomonas aeruginosa*

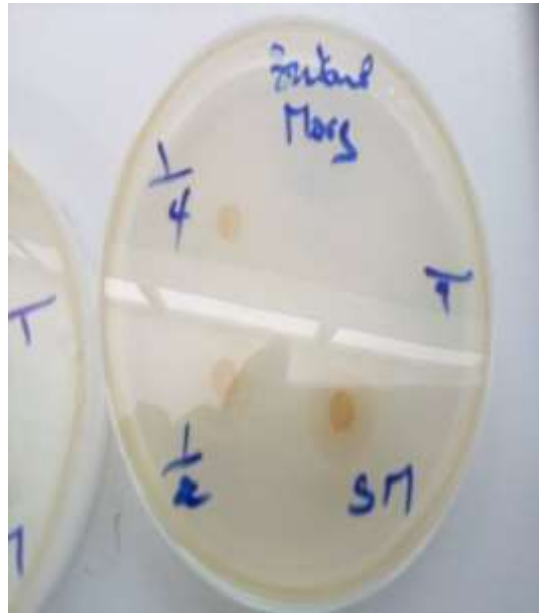


Figure 7: Effet de l'extrait n-Butanol sur *Morganella morganii*



Figure 8: Effet de l'extrait n-Butanol sur *Proteus vulgaris*



Figure 9: Effet de l'extrait n-Butanol sur *Escherichia coli*

- **Bactéries Gram (+)**



Figure 10: Effet de l'extrait n-Butanol sur *Bacillus subtilis*

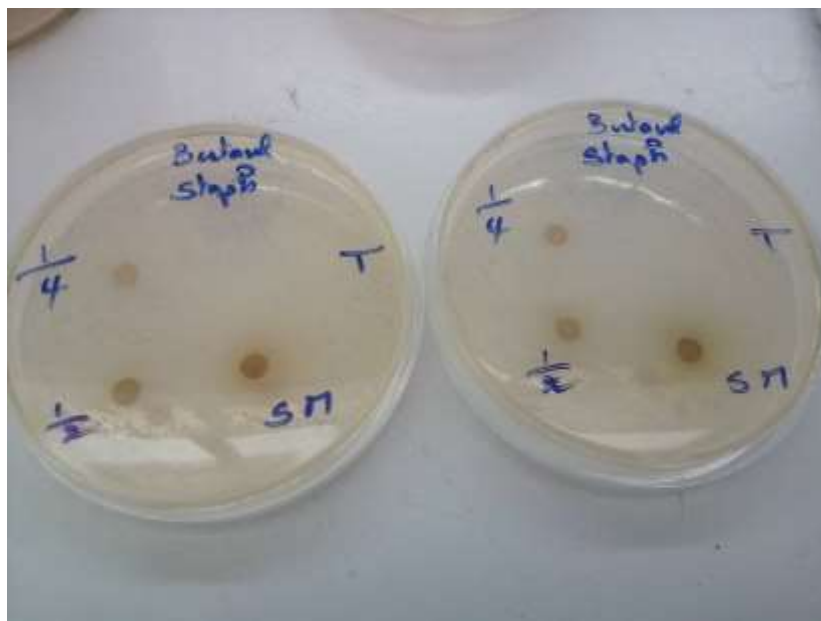


Figure 11: Effet de l'extrait n-Butanol sur *Staphylococcus aureus*

Conclusion et perspective

Ce travail se veut une contribution à une meilleure connaissance de l'espèce *Abies numidica* appartenant à la famille des *Pinaceae*. Il a pour objectif principal la valorisation de cette espèce végétale, choisie parmi les espèces les moins étudiées tout en prenant en considération son caractère endémique.

D'abord, un screening phytochimique, en tant qu'analyse qualitative, a mis en évidence la richesse de cette espèce en métabolites secondaires qui sont les flavonoïdes, les saponosides, les anthocyanes, les composés réducteurs, les lignanes et les anthrones.

Ensuite, l'activité antioxydante de l'extrait n-butanol de l'espèce *Abies numidica*, a été évaluée par quatre méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, l'activité scavenging de l'ABTS^{•+}, la réduction cuprique (CUPRAC) et le test du pouvoir réducteur. Ces tests ont révélé que l'extrait n-Butanolique possède des propriétés antioxydantes importantes (valeurs d'IC₅₀ élevés), qui pourraient s'expliquer essentiellement par la nature des composés qu'il contient (en particulier les polyphénols et les flavonoïdes).

D'autre part, l'activité antibactérienne de l'extrait n-butanol est évaluée par la méthode des disques contre six souches de Gram – et Gram + qui sont les suivantes : *Morganella morganii* (ATCC 25830), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 29905), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Les résultats ont indiqué que l'extrait n-butanol a un effet bactériostatique sur toutes les souches testées ; cette action est traduite par l'apparition des zones d'inhibition autour du disque imprégné.

Notre travail a essayé de valoriser le Sapin de Numidie ; il ouvre les perspectives à d'autres recherches afin d'identifier les molécules actives responsables de cet effet thérapeutique. Ceci, constitue une raison supplémentaire pour préserver cette espèce par la mise en œuvre d'une politique de conservation qui prendra en compte les préoccupations socioéconomiques des populations locales et par conséquent mobiliser la population pour d'autres utilisations de cette espèce endémique, à savoir un usage médicinal traditionnel qui favorisera peut être sa culture et sa préservation. *Abies numidica* est une espèce menacée et doit donc être protégée pour la sauvegarde de la diversité biologique très particulière de la petite Kabylie des Babors.

- Abdalla, A. E., & Roozen, J. P. (1999).** Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry*, 64(3), 323–329.
- Agbo, M. O., Uzor, P. F., Akazie Nneji, U. N., Eze Odurukwe, C. U., Ogbatue, U. B., et Mbaoji, E. C. (2015).** Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid Content of Selected Nigerian Medicinal Plants. Dhaka University *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 35.
- Alizoti, P.G, B. Fady, M.A. Prada, and · G G Vendramin. (2011).** “Technical Guidelines for Genetic Conservation and Use : Mediterranean Firs.” *EUFORGEN Technical Guidelines for Genetic Conserva- Tion and Use of Mediterranean Firs (Abies Spp.)*, 6p.
- Amrani Joutei, K., et Yves Glories. (1994).** “Étude En Conditions Modèles de l’extractibilité Des Composés Phénoliques Des Pellicules et Des Pépins de Raisins Rouges.” *OENO One* 28 (4): 303.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., & Karademir, S. E. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981.
- Avissar, N., Whitin, J.C., Allen, P.Z. (1989).** Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem*, 2:15850-15855.
- 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.
- Barbero, M et Quezel, P. (1976).** Les groupements forestiers de Grèce centroméridionale. *Ecologia mediterranea*, 2, 1 -86, Marseille.
- Barbey, A. (1934).** Une relique de la Sapinière méditerranéenne, Le Mont Babor, monographie de l'*Abies numidica* Lann. Étude de sylviculture, de dendrologie et d'entomologie forestière. Préface de Ph. Guinier.
- Basli, A, M Chibane, K Madani, and N Oukil. (2012).** “Activité Antibactérienne Des Polyphénols Extraits d’Une Plante Médicinale de La Flore d ’Algérie : *Origanum Glandulosum* Desf

- Bauer, A., (1966).** W. and others Antibiotic susceptibility testing by standardised single disc method. *Am. J. Clin. Pathol*, 45, 493.
- Belhadj Mostefa, M., Abedini, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Gangloff, Sophie, C., Kabouche, A. & Kabouche, Z. (2016).** Abietane diterpenes from the cones of *Abies numidica* de Lannoy ex Carrière (Pinaceae) and in vitro evaluation of their antimicrobial properties.
- Benhammou, N. (2011).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 9p.
- Bensakhria, A. (2018).** Stress oxydatif .Chapitre IX. *TOXICOLOGIE GÉNÉRALE*.
- Biondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Ruberto, G., & Piattelli, M. (1993).** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and fragrance journal*, 8(6), 331-337.
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.
- Bneder, (2008).** Bureau national des études de développement rural, Inventaire forestier national. *In* : FAO, Évaluation des ressources forestières mondiales 2015, Rapport national Algérie, 80 p.
- Bridier, A., Le Coq, D., Dubois-Brissonnet, F., Thomas, V., Aymerich, S., & Briandet, R. (2011).** The Spatial Architecture of *Bacillus subtilis* Biofilms Deciphered Using a Surface-Associated Model and In Situ Imaging. *PLoS ONE*, 6(1), e16177.
- Broomfield, R. J., Morgan, S. D., Khan, A., & Stickler, D. J. (2009).** Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control *Journal of Medical Microbiology*, 58(10), 1367–1375.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et documentation, p.266- 275- 2 ème édition. Lavoisier. Paris.
- Burnichon, N., Texier A. (2003).** L'antibiogramme : La détermination de la sensibilité aux antibiotiques. *DES bactériologie*.
- Carbannelle, B. (1988).** Bactériologie médicale, techniques usuelles. Paris, 330.

- Carocho, M., et Ferreira, I. C. (2013).** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Kim, S. K. (2002).** Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163(6), 1161–1168.
- Civit, L., Nassef, H. M., Fragoso, A., & O’Sullivan, C. K. (2008).** Amperometric Determination of Ascorbic Acid in Real Samples Using a Disposable Screen-Printed Electrode Modified with Electrografted-o-Aminophenol Film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10452–10455.
- Collins., Lync. (1976).** Microbiological methods.4th édition, 234-247.
- Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Crozier, A., Clifford, M.N., & Ashihara, H. (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. *Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK.* 384p.
- Dahmani-Megrerouche, M. (2015).** Ecologia mediterranea: Revue internationale d'écologie méditerranéenne = *International Journal of Mediterranean Ecology*, pages. 111-117, Vol. 44, N°. 2.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010).** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.
- Danchin, A., Glaser, P., Kunst, F., Moszer, I., & Rapoport, G. (1998).** Bacillus subtilis dévoile ses gènes. *Biofutur*, 1998(174), 14–17.
- Debray, M., Jacquemin, H., Razafindrambo, R. (1971).** Travaux et documents de L’Orstom. (Paris, N°8).

- Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroïdes*. Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux, *142*(1/4), 61-78.
- Donatien, K. (2009).** Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales Maliennes – Extraction Identification d'alcaloïdes –Caractérisation, Quantification de polyphénols : Etude de leur Activité Antioxydant. Thèse de doctorat : Chimie organique. Université Paul Verlaine de METZ–UPV-M. France. Page : 24,65.
- Ducray, M. (1998).** Aspects écophysiologiques de la réponse et de l'adaptation des sapins méditerranéens aux extrêmes climatiques : gelées printanières et sécheresse estivale. *FORET MEDITERRANÉENNE t. XIX, n° 2, mai 1998*.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mériillon, J.-M. (2009).** Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric FoodChem*, *57*(5), 1768-1774.
- Dumas, Christian et Charriere-Ladreix, Yvette. (1979).** Etude cytochimique des polyphénols : généralités concernant les lignines et les sécrétions de tannins et d'aglycones flavoniques, Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques, *126*:2, 123-142.
- El Gharras, H. (2009).** Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, *44*(12), 2512–2518.
- EL-Haoud Hamid, Boufellous Moncef, Berrani Assia, Tazougart Hind et Bengueddour Rachid. (2018).** Screening phytochimique d'une plante medicinale: *Mentha Spicata L*. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*.
- Elhassan Benyagoub, Amina Boulanouar, Meriem Soud ahmed, Nouria Nebbou & Ahmed Bouloufa. (2016).** Essai d'évaluation de l'activité antibactérienne de la gomme arabique d'*Acacia tortilis* (Forssk) contre quelques souches bactériennes pathogènes, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, *Vol. 85*,2016, p. 237 – 252.
- Ericsson, HM., Sherris, JC. (1971).** Antibiotic sensitivity testing. *Acta Pathol.Microbial, Scand., suppl.*, 217.

- Faisal Shahzad, Sohail Ahmad, Habib Ahmad, Qazi Abdur Rashid, Nadia Parveen, Fatima Javed, Rida Khan, Muhammad Zeeshan Ashraf and Faiza Naseer. (2015).** Production of Proteases by Genetically Improved *Bacillus subtilis* for Enhanced Skin Penetration of Antibacterial Topical Formulation. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*.
- Falagas, M. E., Kavvadia, P. K., Mantadakis, E., Kofteridis, D. P., Bliziotis, I. A., Saloustros, E. Samonis, G. (2006).** *Morganella morganii* Infections in a General Tertiary Hospital. *Infection*, 34(6), 315–321.
- Favier, A.E., Nève J., Faure P.1994.** Trace elements and free radicals in oxidative diseases: Edition AOCS Champaign. Illinois. Pp: 128-132.
- Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., & Barros, L. (2007).** Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100(4), 1511–1516.
- Hachi-illoul, M. (2016).** Variabilité morpho-anatomique, diversité génétique, potentiel de régénération et efficacité de la production grainière du sapin de Numidie (*Abies numidica* De Lannoy) en plantation (cas de Serraidi (Annaba)). Thèse de doctorat. Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou. 4p.
- Halliwell, B. (2007).** Biochemistry of oxidative stress. 1147-1150.
- Hernández-Rodríguez, P., Baquero, L. P., & Larrota, H. R. (2019).** Flavonoids. Bioactive Compounds, 265–288.
- Jackman and Smith. (1996).** Anthocyanins and betalains, in Natural food colorants. 2nd ed., eds., G.A.F. Hhendry and *J.D. Houghton*, Glasgow, UK: blackie Academic and Professional, pp. 244-309.
- Jean-Jacques Macheix. (1996).** Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XX^{ème} siècle?, *Acta Botanica Gallica*, 143:6, P473-479.
- Karamali, Khanbabaee and Teunis van Ree. (2001).** Tannins: Classification and Définition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641–649.
- Karkabounas, S., Assimakopoulos, D., Malamas, M., Skaltsounis, AL., Leonce, S., Zelovitis, J., Stefanou, D., Evangelou, A. (2000).** Antiproliferative and anticarcinogenic effects of an aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album se abies*, on a L-1210

malignant cell line and tumor-bearing Wistar rats. *Anticancer Res.*, 20, 4391-4395.

Kizil, M., Kizil, G., Yavuz, M. et Çetin Aytakin. (2002). Applied Biochemistry and Microbiology, 38(2), 144–146.

Krause, D. O., Smith, W. J. M., Brooker, J. D., & McSweeney, C. S. (2005). Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 121(1-2), 59–75.

Kumar, D. and Kumar, S. (2017). Isolation and Characterization of Bioactive Phenolic Compounds from *Abies Pindrow* Aerial Parts. *Pharmaceutical Chemistry Journal*.

L'Orstom. (Paris, N°8).

Lee, K.-H., Park, S. J., Choi, S. J., & Park, J. Y. (2017). Proteus vulgaris and Proteus mirabilis Decrease Candida albicans Biofilm Formation by Suppressing Morphological Transition to Its Hyphal Form. *Yonsei Medical Journal*, 58(6), 1135.

Lien, E. J., Ren, S., BUI, H. H., Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship Nature, 4617 (181): 1119-1200.

Mamta, Saxena., Dr Jyoti, Saxena., Dr Alka, Pradhan. (2012). “flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health.” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 29 (5): 420–29.

Manisha, H. W., Rajak, R., & Jat, D. (2017). Oxidative stress and antioxidants: an overview. *International Journal of Advanced Research and Review*, 2(9), 110-9.

Marjorie, M. C. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 12 (4): 564-582.

Maurizid, B., et Werner, H. (1988). Phytochemistry, vol.27, N°.6, 1871-1872,

methanol extract of *Abies webbiana* leaves on sleeping time induced by standard sedatives in mice and anti-inflammatory activity of extracts in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 397-402.

Morand, C. (2014). Intérêt des aliments riches en flavonoïdes pour le maintien de la santé cardio-métabolique, *Médecine Des Maladies Métaboliques*, Vol.8 - N°5, P 477–482.

Naik, PM. et Al-Khayri, JM. (2016). Impact of Abiotic Elicitors on In vitro Production of Plant Secondary Metabolites: A Review, *Journal of Advanced Research in Biotechnology*.

- Nayak SS., Ghosh, AK., Debnath, B., Vishnoi, SP., Jha T. (2004).** Synergistic effect of methanol extract of *Abies webbiana* leaves on sleeping time induced by standard sedatives in mice and anti-inflammatory activity of extracts in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 397-402.
- Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016).** Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- Parducci, L., Szmidt, A.E., Madaghiele, A., Anzidei, M., Vendramin, A. (2001).** Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theor Appl Genet* (2001) 102: 733-740.
- Paris, R et Moyse, H. (1969).** Précis de matière médicale. Paris : Masson.
- Patrick, J., Haines, B. (1988).** Training and transfer of fault finding skill. *Ergonomics*, 31, pp 193-210.
- Petrovska, B. (2012).** Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015).** Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Preiser, J. C. (2012).** Oxidative stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(2), 147-154.
- Proksch, P., Kirkiacharian. (1992).** *Orthosiphon aristatus* – Der Katzenbart
.Pflanzeninhaltsstoffe und ihre potentielle diuretische Wirkung. *Z Phytotherapie* 13: 63- 69.
- Qiao-Ping Xiang, Ran Wei, Yi-Zhen Shao, Zu-Yu Yang, Xiao-Quan, Wang et Xian-Chun Zhang. (2014).** Phylogenetic relationships, possible ancient hybridization, and biogeographic history of *Abies* (Pinaceae) based on data from nuclear, plastid, and mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82 (2015) 1–14.
- Quezel, P & Medail, F. (1997).** Hot-Spots analysis for conservation of plant biodiversity in the mediterranean basin.– *Ann. Missouri Bot. Gard.* 84(1) : 112-127.
- Quezel, P. (1985).** Les sapins du pourtour méditerranéen. *Forêt méditerranéenne*, t. VII, n°1.

- Quezel, P. et Santa S. (1962-1963).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *C.N.R.S. Paris*. 1170 p.
- Rakotonanahary, M. (2012).** Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28.
- Ramdan, MF. (2010).** Rapid antiradical method for screening deep fried oils. *Journal of consumer protection and food safety*. 5:47-50.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- Richard, C., Kiredjian, M., (1995).** Laboratory Methods for the Identification of Strictly Aerobic Gram-negative Bacilli. Paris, Institut Pasteur.
- Rizk, AM. (1982).** Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia* 52:35-42.
- Robinow, C. F. (1944).** Cytological observations on *Bact. coli*, *Proteus vulgaris* and various aerobic spore-forming bacteria with special reference to the nuclear structures. *Journal of Hygiene*, 43(06), 413–423.
- Rojas, R. R., Charlet, L. D., Leopold, R. A. (1992).** A differential scanning calorimetric analysis of inoculative freezing in an insect. *Cryo. Lett.* 13: 355-362.
- Sagdiç, O. (2003).** Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36: 467-473.
- Sanchez-Moreno, C. (2002).** Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137.
- Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed. Tec & Doc, Paris*, p. 2-10.
- Sava, C., Sirbu, R., and Dumitrescu, C. (2006).** “Analyse Qualitative et Quantitative Des Anthocyanes Dans Des Produits Naturels.” *Scientific Study & Research* VII (4) : 785–98.
- Singh, RK., Bhattacharya. SK., Acharya, SB. (2000).** Pharmacological activity of *Abies pindrow*. *J. Ethnopharmacol*, 73, 47-51.

- Stevens, E. J., Armstrong, K.W., Bezar, H.J., Griffin, W.B., Hampton, J.G. (2004).** Fodder oats: an overview (Chapter II). Plant Production and Protection Series No. 33, FAO. Rome.
- Sumaya-Martinez M.T. (2004).** Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Bretagne Occidentale. France, 188p.
- Tlili-Ait Kaki, Y. Bennadja, S. Chefrou, A. (2013).** Revalorisation d'une essence endémique : le sapin de Numidie (*Abies numidica*). *Flora Mediterranea*, 23, 123-129.
- Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., Coulibaly, A. (2012).** Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied Biosciences* 58 : 4234– 4242.
- Trease, E., et Evans, W. C. (1987).** Pharmacognosie Billiaire Tindall, London 13 th Edition. Pp61-62.
- Vandepitte, J., Engbaek, E., Plot, P., Heuk, CC. (1994).** Bactériologie clinique : techniques de base pour le laboratoire O.M.S. Genève, 62-64.
- Vela, E. & Benhouhou, S. (2007).** Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le bassin méditerranéen (Afrique du Nord). – C. R. Biologies **330**: 589-605.
- Weston, L. A., & Mathesius, U. (2013).** Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2), 283–297.
- Yahi, N., Knees, S. & Gardner, M. (2011).** *Abies numidica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T30320A9534972.
- Yoneyama, S., Togashi, I., Honma, S., Aoyama, M. (1989).** Inhibitory effects of extracts of todomatsu, *Abies sachalinensis* Mast, on the mycelial growth of edible fungi (in Japanese). *J Hokkaido For Prod. Res. Inst.*, 3, 16-22.
- Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002).** What is oxidative stress? *Japan medical association journal*, 45(7), 271-276.
- Zelovitis, J., Stefanou, D., Evangelou, A. (2000).** Antiproliferative and anticarcinogenic.

المخلص

الصنوبر البري من النباتات النادرة لمنطقة القبائل الصغرى (جبال البابور) بالجزائر من عائلة الصنوبريات غنية بمنتجات الأيض الثانوي. تم استخلاص عينات الدراسة من الأوراق باستعمال الميثانول ثم يتم تجزئة المستخلص الميثانولي باستخدام المذيبات ذات القطبية المتزايدة.

الهدف من هذه الدراسة هو التوصيف الكيميائي النباتي لمستخلص n-Butanol وتقييم نشاطه المضاد للأكسدة والبكتيريا ذلك باستعمال أربع طرق مختلفة وهي كالاتي: طريقة الأسر للجذور الحرة (DPPH)، اختبار ABTS، CUPRAC وقوة ارجاع الحديد (pouvoir réducteur) أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلص n-Butanol له قوة مضادة للأكسدة.

كشفت دراسة التأثير المضاد للبكتيريا لهذا المستخلص ، باستخدام طريقة نشر القرص على أربع سلالات من الجرام - وعلى سلالتين من الجرام + ، أن السلالات حساسة للغاية للمستخلص مع مناطق تثبيط كبير.

Abstract

Abies Numidica is an autochthonous plant, which belongs to the Pinaceae family, located in the region of small Kabylia as well as Babor's mountains in Algeria. Its richness in secondary metabolites has led us to extract them from its leaves with methanol; then the methanolic extract is fractionated using solvents with an increasing polarity.

The ultimate objective of this study is the phytochemical characterisation of the n-butanolic extract, as well as the evaluation of its antioxidant and antibacterial activity.

To determine the antioxidant properties, four discrepant methods have been used: the DPPH free radical scavenging test, the ABTS^{•+} scavenging activity, the cupric reduction (CUPRAC) and the reducing power test. The obtained results showed a significant antioxidant power of the n-butanolic extract.

The study of the antibacterial effect of this extract, using the disk diffusion method on four Gram⁻ strains and on two Gram⁺ strains, revealed that the strains are very sensitive to the extract with areas of significant inhibitions.

Année universitaire : 2018-2019

Présenté par : BOUGHEZAL CHAKIB
BOUGUELLI AHCENE BRAHIM
SEDRATI ABDELMOUMIN

**Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de la fraction
n-Butanolique extraite des feuilles d'*Abies numidica***

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie de la Nutrition

Résumé :

L'*Abies numidica* est une plante endémique appartenant à la famille des *Pinacea*, localisée dans les monts Babor et Tababort en petite Kabylie. Sa richesse en métabolites secondaires nous a conduits à procéder à leur extraction à partir de ses feuilles par le méthanol ; puis l'extrait méthanolique est fractionné en utilisant des solvants à polarité croissante.

L'objectif de cette étude est la caractérisation phytochimique de l'extrait n-Butanolique, ainsi que l'évaluation de son activité antioxydante et antibactérienne.

Pour apprécier les propriétés antioxydantes quatre méthodes différentes sont utilisées: le test de piégeage du radical libre DPPH, l'activité scavenging de l'ABTS⁺, la réduction cuprique (CUPRAC) et le test du pouvoir réducteur. Les résultats obtenus ont montré un pouvoir antioxydant important de l'extrait n-butanolique.

L'étude de l'effet antibactérien de cet extrait, utilisant la méthode de diffusion par disques sur quatre souches à Gram- et sur deux souches à Gram+, a révélé que les souches sont très sensibles vis-à-vis de l'extrait avec des zones d'inhibitions importantes.

Mots clés : *Abies numidica*, métabolites secondaires, activité antibactérienne, activité antioxydante

Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1

Membres du jury

Président : Pr. KHLIFI Douadi

Encadrante : Dr. BELLIL Inès

Examineur : Dr. MOSBAH Asma

Date de Soutenance : le 17/07/2019