



République Algérienne démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences
Département de Chimie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Option : Chimie Pharmaceutique

Thème

*Extraction et étude des activités antioxydantes
et antibactériennes des polyphénols de la
Cannelle de Chine*

Présentée par : M^{elle} AMINI Chahinaz et M^{elle} HAMDIDOUCHE Sabrina

Soutenue publiquement le : 10/09 / 2016

devant le jury composé de :

M^{me} KICHOU Noura

MCB – UMMTO

Présidente

M^{elle} TOUZOURT Saïda

MAA - UMMTO

Examinatrice

M^r BENCHOUAK Mounir

MAA - UMMTO

Rapporteur

Année 2015 – 2016.

Remerciements

C'est avec un réel plaisir qu'on réserve ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à nos chers parents, pour leur soutien, réconfort et encouragement dans les moments de doute....Tous les mots ne suffiraient pas...Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien et votre amour.

On adresse nos sincères remerciements à notre encadreur M^r BENCHOULAK Mounir pour sa disponibilité et ses remarques constructives ; pour son soutien scientifique mais aussi humain durant toute la période de réalisation de se modeste travail.

Nos remerciements sincères et respectueux vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail:M^{me} KICHOU Noura MCB à l'UMMTO, M^{elle} TOUZOUIRT Saïda, MAB à l'UMMTO.

On remercie vivement l'ingénieure de Laboratoire de Chimie pharmaceutique M^{elle} BEGGAZE Dahbia pour sa participation active à la préparation des extraits ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Nos remerciements sincères vont également à l'ingénieure de Laboratoire de Microbiologie (Département de Biologie) pour sa gentillesse et ses conseils sur la partie expérimentale de ce travail sur les tests antimicrobiens.

Merci à tous les membres du Département de Chimie de la Faculté des Sciences pour leur encouragement, leur bonne humeur et leur gentillesse ; ainsi à tous les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, et qui m'ont apporté leur soutien à tout point de vue pour mener à bien ce travail.

Merci à tous !



Dédicace

*A mes chers parents, pour leur amour, leur soutien et
tous leurs sacrifices*

A mes chères sœurs surtout Zahra.

A mes chers frères

A mes nièces Merina et Malek.

A mon fiancé Qualid et toute sa famille.

A tous mes amis(e) Amelia, Khadija et Lyes.

A toute la famille

HAMDOU BOUHE.

*A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui
existent au fond de mon cœur et de ma pensée.*

Sabrina

Dédicace

A mes très chère parents Houara et Abdenour

Vous avez toujours été présent pour les bons conseils. Votre amour et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie.

A mes chère frères Gaye et Massyl

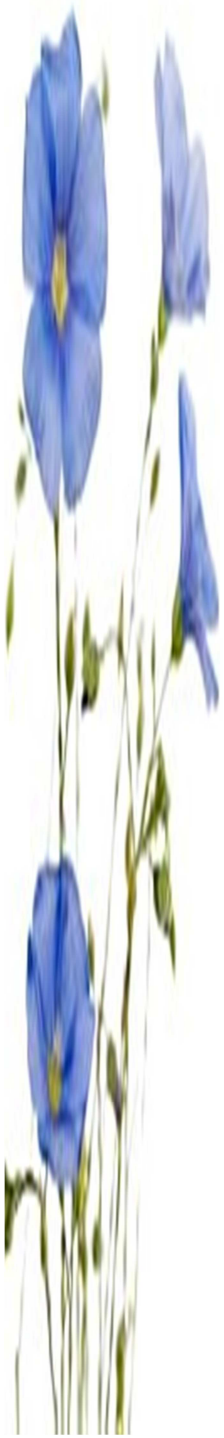
A ma grande mère Zahoua

A tous mes ami(e)s

Et a toutes la famille AMEN

Veillez trouvé dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

Phahinas



Liste des abréviations

ABS	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
C	Concentration d'extraits éthanolique équivalente à l'acide galique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)
C₀	Concentration de la solution mère aqueuse
CCM	Chromatographie sur couche mince
DPPH	2,2-diphenyl picrylhydrazyl
g	Gramme
GPx	Glutathion Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSH	Glutathion oxydé
L	Litre
µl	Microlitre
m₀	Masse initial d'extrait éthanolique de broyat de la cannelle
me	Masse de l'extrait après évaporation du solvant.
ml	Millilitre
mmol	Mili mole
mg	Milligramme
mg EAG/ml d'extrait	mg équivalent en acide gallique par millilitre d'extrait

mgQE/ml	mg équivalent en quercetine par millilitre d'extrait
μM	Micromolaire
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
nm	Nanomètre
R	Rendement
R_f	Rapport frontal
SOD	Superoxyde dismutase
UV	Ultraviolet

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Page
01	Classification de la Cannelle de chine	04
02	Principales classes de composés phénoliques	09
03	Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant	14
04	Différentes phases de la peroxydation lipidique en présence d'EROs et leurs réactions chimiques	21
05	Réactifs chimiques utilisés	24
06	Solutions à différentes concentration préparé de l'extrait éthanolique	30
07	Sensibilité des souches vis-à-vis d'extrait	35
08	Résultats des tests chimiques d'identification des constituants de la cannelle de l'extrait	38
09	Résultats de l'activité antiradicalaire de l'extraits vis-à-vis de H ₂ O ₂	40
10	Résultats de pourcentage d'oxydations	40
11	Résultats de pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique	41
12	Résultats de pourcentage de réduction	41
13	Principales couleurs observés sur le chromatogramme CCM des extraits éthanolique et méthanolique dans le visible et l'UV à 365 nm	42
14	Valeurs des rapports frontales des extraits éthanolique et méthanolique	44
15	Résultats de l'activité antimicrobienne	44
16	Résultats d'analyse spectroscopique UV/Vis	45

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
01	Partie aérienne de la Cannelle de chine (<i>Cinnamomum cassia</i>)	03
02	Cannelle de Ceylan et cannelle de chine	05
03	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène	18
04	Liaisons de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	19
05	Procédure expérimentale d'extraction des polyphénols totaux de la cannelle	26
06	Liaison possible de AlCl ₃ avec le noyau flavone	29
07	Principe de la méthode de diffusion sur disque	33
08	Droite d'étalonnage de l'acide gallique dans le dosage de Folin-Ciocalteu	39
09	Activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique du Cannelle vis-à-vis du radical peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	41
10	Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de <i>Cannelle</i> à 700 nm	42
11	Chromatogramme CCM des extraits éthanolique et méthanolique dans la phase mobile de n-butanol - acide acétique - eau (5V/2V/1V) et une phase stationnaire de gel de silice	43
12	Résultats de l'activité antibactérienne (disque d'inhibition)	45
13	Spectre UV/vis du l'extrait aqueux à 10 ⁻⁴ M à 350nm	46

Sommaire

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

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

Chapitre I : Cannelle de chine

1. Généralités.....	02
----------------------------	-----------

2. Description botanique.....	02
--------------------------------------	-----------

➤ Types de Cannelle.....	04
---------------------------------	-----------

3. Composition chimique.....	05
-------------------------------------	-----------

4. Propriétés thérapeutiques.....	07
--	-----------

➤ Indications traditionnelles	07
--------------------------------------	-----------

Chapitre II : Polyphénols

1. Présentions générale sur les polyphénols	08
--	-----------

2. Classification des polyphénols.....	08
---	-----------

3. Propriétés chimiques des polyphénols	09
--	-----------

4. Intérêts thérapeutiques des polyphénols	10
---	-----------

4.1. Activité anticancéreuse	10
---	-----------

4.2. Prévention contre les maladies cardiovasculaires	11
--	-----------

4.3. Prévention contre les maladies hormono-dépendantes.....	11
---	-----------

5. Activités antibactériennes.....	11
---	-----------

5.1. Généralités	11
-------------------------------	-----------

5.2. Activités antimicrobiennes des polyphénols	12
--	-----------

Chapitre III : Stress oxydant

1. Stress oxydatif.....	13
1.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	13
1.1.1. Définition.....	13
1.1.2 Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène in vivo ...	15
1.2. Stress oxydatif.....	18
1.2.1. Définition.....	18
1.2.2. Effets physiologiques des EROs	19
1.2.2.1. Dégradation par oxydation de l'ADN	19
1.2.2.2. Oxydation des protéines	20
1.2.2.3. Peroxydation lipidique.....	20
1.2.3. Prise en charges des EROs.....	22
1.2.3.1. Systemes anti-oxydants enzymatiques.....	22
1.2.3.2. Systemes anti-oxydants non enzymatiques.....	23

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Matériels	24
1.1. Matériel végétal.....	24
1.2 Réactifs.....	24
2. Méthodes.....	25
2.1. Préparation de l'extrait éthanolique.....	25
2.2. Testes chimiques d'identification des constituants végétaux.....	26
2.2.1. Tests pour les flavonoïdes	26
2.2.2. Test pour les tanins hydrolysables.....	27
2.2.3. Test pour les tanins condensés	27
2.2.4. Test pour les saponines.....	27
2.2.5. Test pour les terponoïdes	27
2.2.6. Test pour les glycosides	28
2.2.7. Test pour les stéroïdes.....	28

2.3. Dosage des polyphénols totaux.....	28
2.4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	29
2.5. Activité antioxydante.....	30
2.5.1. Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	30
2.5.2. Pouvoir réducteur.....	31
2.5.3. Etude chromatographique de l'extrait préparé (CCM).....	31
2.6. Activité antimicrobienne.....	32
2.7. Analyse spectroscopique.....	35

Résultats et discussion

Résultats.....	37
1. Calcul de rendement.....	37
2. Tests chimiques d'identification	37
3. Dosages spectrophotométrique	38
3.1. Dosage des polyphénols totaux	38
3.2. Dosages des flavonoïdes totaux.....	40
4. Activités antioxydantes.....	40
4.1. Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	40
4.2. Pouvoir réducteur.....	41
4.3. Etude chromatographique de l'extrait préparé.....	42
5. Activité antimicrobienne.....	44
6. Analyse spectroscopique.....	45
Discussion.....	47
1. Préparation de l'extrait de la cannelle	47
2. Tests chimiques d'identification	47
3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	47
4. Activité antioxydante in vitro.....	48
4.1. Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	48
4.2. Pouvoir réducteur.....	48

4.3. Etude chromatographique de l'extrait préparé.....	48
5. Activité antimicrobienne.....	49
6. Analyse spectroscopique.....	49
Conclusion	50
Références bibliographiques.....	51

Introduction

Les plantes médicinales font partie de l'histoire de tous les continents. A travers les siècles, le savoir concernant les plantes s'est organisé, documenté et a été transmis de génération en génération. Aujourd'hui, le recours à la médecine par les plantes devient quotidien, sous forme de prévention et n'est plus réservé au traitement des maladies.

La Cannelle de Chine est une plante médicinale et aromatique connue depuis longtemps pour son pouvoir bienfaiteur. Elle dispose de nombreux composants tels que les flavonoïdes, agissant comme des antioxydants, des inhibiteurs d'enzymes, et des précurseurs de substances toxiques. En outre, ces composés sont impliqués dans la photosensibilisation et de transfert d'énergie, contrôle de la respiration, ainsi que la défense contre l'infection. Utilisée souvent pour la phytothérapie ; dans le processus de stress oxydatif et la lutte contre les maladies infectieuses, mais la découverte des antioxydants synthétiques et des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire. Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de la Cannelle de Chine en utilisant la méthode de macération par solvant. Différentes techniques ont été réalisées sur l'extrait éthanolique afin de prouver la présence de ces deux activités tels que le piégeage du radical libre H_2O_2 , le pouvoir réducteur, la CCM, ainsi le test antimicrobien.

Chapitre I

Cannelle de Chine

1. Généralités

Le terme « **cannelle** » est apparu au XII^e siècle, vient du latin *canna*, qui signifie « roseau », probablement par allusion à la forme de tuyau que prennent les bâtons d'écorce de cannelle en séchant. [2]

La cannelle fait partie des épices exportées par l'Orient depuis 4000 ans. Réputée pour ses **vertus** tant **fortifiantes** que **purifiantes**, sa présence est mentionnée pour la première fois dans un traité attribué à l'empereur Sheng-Nung qui régnait en 2700 ans avant Jésus Christ. [7]

Originaire des régions montagneuses de l'Annam, du Sri Lanka (anciennement appelé Ceylan) et des régions de l'Est de l'Himalaya, du Nord de l'Inde et du Vietnam, le cannellier est aujourd'hui cultivé dans tous les pays bordant l'océan Indien de même que dans les Antilles, au Brésil et en Guyane. [5,7]

2. Description botanique

Le **Cannelier de Chine** (*Cinnamomum aromaticum*) est une espèce d'arbre de la famille des *Lauraceae* (figure 1) ; communément appelée «Cannelle de Ceylan », «fausse cannelle », « cannelle bâtarde », « cannelle de Padang », « cannelle de Saïgon » ou encore « cannelle de Cochinchine ». [7,12]

Cet arbre est toujours vert, de 5-7 mètre de haut, aux grandes feuilles persistantes entières, insérées en hélice, coriaces, possède une écorce épaisse et rugueuse. [10,13]

Les inflorescences sont des grappes très ramifiées de fleurs jaunes, régulières et à 6 pétales.

Le fruit est une baie ressemblant à celle du laurier noble, de la taille d'une petite olive. Se cultivant à partir de semis ou de boutures, le cannellier peut atteindre 15 m de haut. En fonction de son espèce, il devient arbre ou reste arbrisseau. Ne supportant pas les

Chapitre I Cannelle de Chine

températures inférieures à 15 °C, il ne vit que dans les régions tropicales ou subtropicales. [11]

Poussant sur un sol riche et léger, il ne se récolte pour la première fois que six ou sept ans après sa plantation. Les branches sont alors coupées pour la récolte de l'écorce qui sera mise ensuite à sécher après l'avoir dépouillée de son épiderme. En séchant, elle s'enroule sur elle-même, formant des bâtonnets friables ressemblant à des tubes. [4,6]

En plus de l'écorce destinée au marché des épices, on en tire une huile essentielle largement employée en confiserie et en parfumerie, de même que dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques, notamment pour masquer la saveur de certains médicaments. A conserver au frais, au sec et à l'abri de la lumière ; dans un contenant hermétique pour éviter que la cannelle (bâtons ou poudre) perd son arôme.



Figure 1 : Partie aérienne de la Cannelle de chine (*Cinnamomum cassia*).

Tableau 1 : Classification de la Cannelle de chine. [6]

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Magnoliidae
Ordre	Lurales
Famille	Lauraceae
Genre	Cinnamomum
Nom binominal	Cinnamomum aromaticum
Noms communs	Cannelle de Ceylan, Cannelle de Chine.
Noms scientifiques	Cinnamomum verum (synonyme : zeylanicum), Cinnamomum cassia (synonyme : C.aromaticum) et autres
Nom anglais	Cinnamon
Partie utilisée	Ecorce, feuilles

➤ Types de Cannelle

Une bonne cannelle doit être friable, avoir des lamelles fines et être pleine à l'intérieur, formant un enroulement de feuilles. [4]

Il ya deux types de Cannelle : la « vraie » cannelle (ou Cannelle de Ceylan) est de couleur ocre et les bâtonnets, qui sont faits de fines couches d'écorce (environ 1mm d'épaisseur), sont facilement friables. Elle est reconnaissable par sa subtilité, son parfum puissant, doux et chaud à la fois.

Et aussi la Cannelle de Chine (ou fausse cannelle) de couleur orange tirant vers le rouge ou le brun, les bâtonnets sont plus grossiers et plus épais (environ 2 à 3mm d'épaisseur), peu sucrée voir légèrement amère. [5]

Plusieurs espèces de canneliers sont exploitées localement pour leur écorce, mais la cannelle offerte sur le marché international est généralement fournie par le cannelier de Ceylan (*C. verum*) et le cannelier de Chine (*C. cassia*). [2]



Figure 2 : Cannelle de Ceylan et cannelle de chine.

3. Composition chimique

L'écorce du cannelier de chine contient principalement :

- **Des fibres :** Les épices ne sont pas les premiers aliments auxquels on pense quand on parle de fibres alimentaires ; pourtant les fibres constituent plus de la moitié du poids de la cannelle moulue : une portion aussi petite que 2 g de cannelle (1 cuillère à thé) renferme en effet 1,3 g de fibres. [5]

- **Antioxydants** : La cannelle moulue a été classée au quatrième rang parmi les 50 aliments renfermant le plus d'antioxydants par portion de 100 g. Une autre étude a démontré que l'activité antioxydante de la cannelle pourrait être augmentée lorsqu'elle est soumise à la chaleur. [9]
- **Proanthocyanidines** : La cannelle est l'aliment qui contient le plus de proanthocyanidines par 100 g, après la fève de cacao. En effet, les proanthocyanidines ont démontré certaines propriétés antioxydantes chez l'humain, en protégeant par exemple les globules et les lipides sanguins contre le stress oxydatif. [9]
- **Cinnamaldéhyde** : La cannelle est très riche en ce composé phénolique volatil, au pouvoir antioxydant [1]. Une étude in vitro sur des échantillons de sang humain a démontré que la cinnamaldéhyde avait la capacité de diminuer l'activité de la 5-lipoxygénase, un enzyme associé à l'apparition de réactions inflammatoires ou allergiques (comme l'asthme, la rhinite allergique, le psoriasis). La cinnamaldéhyde ferait également partie des composés procurant à la cannelle des propriétés antimicrobiennes.
- **Manganèse** : La cannelle moulue est une bonne source de manganèse. Le manganèse agit comme cofacteur de plusieurs enzymes qui facilitent une douzaine de différents processus métaboliques. Il participe également à la prévention des dommages causés par les radicaux libres.
- **Fer** : La cannelle moulue est une source de fer pour l'homme. Ce minéral est essentiel au transport de l'oxygène et à la formation des globules rouges dans le sang. Il joue aussi un rôle dans la fabrication de nouvelles cellules, d'hormones et de neurotransmetteurs (messagers dans l'influx nerveux).
- **Amidon.**
- Une quantité notable de **coumarine** (environ 2 à 4g/Kg de poudre d'écorce).[10]
- **Eugénol** (0,5%).

- Acétate d'eugényl (2,2%).

4. Propriétés thérapeutiques

- Antibactérienne très puissante à très large spectre d'action.
- Antivirale et stimulante immunitaire.
- Fongicide.
- Parasiticide.
- Antifermentaire.
- Tonique utérine et emménagogue.
- Tonique sexuelle et aphrodisiaque.
- Stimulante respiratoire et nerveuse.
- Hyperémiante.
- Anticoagulante, fluidifiante sanguine. [4,6]

➤ Indications traditionnelles

- Infections gastro-intestinales d'étiologies variées : diarrhées, amibiases, typhus, dysenteries.
- Bronchites, gripes.
- Cystites, urétrites, vaginites leucorrhéiques.
- Impuissance masculine, frigidité.
- Infections tropicales (filariose: provoquée par des vers parasites du genre filaire transmises par les moustiques).
- Fatigues profondes, dépression.
- Acné, anthrax. [10].

Chapitre II

Polyphénols

Les polyphénols constituent aujourd'hui un vaste sujet de recherches qui intéressent non seulement le chimiste, mais aussi les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier sur la saveur des aliments. Leur incidence sur la conservation des produits retient également l'attention dans le secteur alimentaire, mais aussi dans celui des cosmétiques et de la pharmacologie. Les propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires des polyphénols suscitent également beaucoup d'intérêt dans le domaine médical par leur caractère préventif à l'égard de diverses pathologies, comme les maladies cardiovasculaires ou dégénératives. [14]

1. Présentations générale sur les polyphénols

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. [15]

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. [16]

2. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont regroupés en une classe constituée d'environ 8000 composés. [17]. Ces composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (tableau 2), qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucide, lipide, protéines...) [19].

Tableau 2 : Principales classes de composés phénoliques [18].

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acide hydroxybenzoïque	P-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques coumarines	Acide caféique scopolétine	Pomme de terre, pomme, citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ .C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, Catéchine Naringénine daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fruit rouge Pomme, raisin Citrus soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyaux des fruits
(C ₁₅) _n	Tanins		Raisin rouge, kaki

3. Propriétés chimiques des polyphénols

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement celles du phénol lui-même. Elles sont cependant fortement modulées par les substituants typique des noyaux phénoliques, en particulier ceux qui sont capables d'étendre la délocalisation électronique : substituants à effet mésomère donneur d'électrons ou attracteur d'électrons [19].

Les substitutions les plus rencontrées sur les phénols des végétaux sont principalement la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, lesquels peuvent être acylés. Les polyphénols sont généralement glycosylés dans leur état naturel. [25]

4. Intérêts thérapeutiques des polyphénols

La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments, comme le Daflon produit à base de diosmine. Traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veinolympatique (jambes lourdes, douleurs, impatiences du primo-décubitus).

Parmi les nombreux intérêts qu'offrent les polyphénols à la santé, nous pouvons citer les suivants [27].

4.1. Activité anticancéreuse

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse. En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes.

La catéchine a montré une activité anti-tumorale. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver l'action de la P-glycoprotéine qui est impliquée dans la résistance phénotypique des cellules cancéreuses. La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes et la réduction des radicaux libres. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène et inhibe l'activité de la collagénase.

Les flavonoïdes ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon [29].

4.2. Prévention contre les maladies cardiovasculaires

En effet, la consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaire. Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'arthérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde [27].

4.3. Prévention contre les maladies hormono-dépendantes

L'exemple le plus important est la prévention contre l'ostéoporose. Ceci en modulant la réponse aux oestrogènes endogènes. Certains polyphénols et plus particulièrement les isoflavones ont une affinité remarquable pour les récepteurs d'oestrogènes et sont qualifiés pour cela de phytoestrogènes.

Aussi, les effets bénéfiques des polyphénols (lignanes en particulier) dans la prévention de cancers hormono-dépendants ont été largement documentés ces dernières années par des études épidémiologiques identifiant une relation entre la présence de lignanes dans la ration alimentaire et le taux d'incidence de certains cancers. [26]

5. Activités antibactériennes

5.1. Généralités

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise. [28]

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes. [29]

5.2. Activités antimicrobiennes des polyphénols

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dû à leur diversité structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [28].

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques. [29]

Les mécanismes responsables de la toxicité des polyphénols envers les microorganismes incluent l'inhibition enzymatique par les composés oxydés, probablement via la réaction avec les groupes sulfhydryle ou par les interactions non spécifiques avec les protéines.[30] L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonols est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule. La déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rendre perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer le zinc (via la propriété de chélation des métaux) sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries [30].

Chapitre III

Stress oxydant

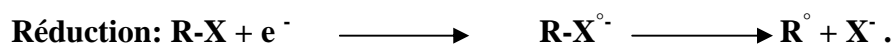
1. Stress oxydatif

1.1. Espèces réactives de l'oxygène

1.1.1. Définition

Un radical libre est toute molécule ou un fragment d'une molécule possédant un électron célibataire (non apparié) sur sa couche périphérique. [32]

Il peut être formé par une autre espèce non radicalaire par la perte ou le gain d'électron au cours d'une réaction d'oxydoréduction :



Les radicaux sont désignés par le signe ($^{\circ}$) représentant l'électron célibataire.

Il peut également être produit par fission homolytique (rupture symétrique d'une liaison covalente) à l'issue de laquelle chaque atome conserve son électron. [39]



Les radicaux libres sont des espèces chimiquement instables et leur durée de vie est généralement très courte. Le champ magnétique créé par la rotation de l'électron célibataire n'est pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules plus stables pour capter ou céder des électrons et ils peuvent initier des réactions radicalaires en chaîne en engendrant de nouvelles espèces radicalaires dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation des lipides. [7,42]

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle

particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\circ -}$) et le radical hydroxyle (OH°), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO°). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **Espèces Réactives de l'Oxygène « ERO » (en anglais ROS: Reactive Oxygen Species)**. [33]

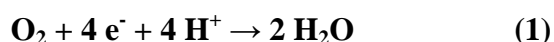
Les oxyradicaux ou espèces radicalaires dérivées de l'oxygène peuvent avoir différentes structures [21] dont les formules sont rassemblées dans le tableau 3.

Tableau 3. Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant.

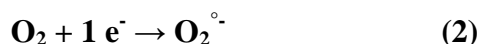
ROS	Formule chimique
Radical anion superoxyde	$O_2^{\circ -}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Trioxygène moléculaire (l'ozone)	O_3
Oxygène singulet	1O_2
Radical hydroxyle	OH°
Radical hydroperoxyde	HOO°
Radical peroxyde	ROO°
Peroxyde et hydroperoxyde	$ROOR^{\circ}$ et $ROOH$
Radical alkoxyde	RO°
Radical oxyde nitrique	NO°
Peroxynitrite	$ONOO^{\circ}$
Hypochlorite	ClO°

1.1.2 Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène in vivo

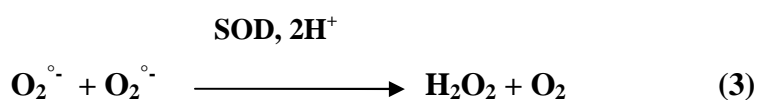
La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale. [15,35]



Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q).

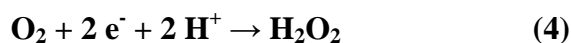


De même, la NADH-deshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales, peuvent conduire à la formation de radicaux $\text{O}_2^{\circ-}$. Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation (réaction (3)).



L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) ainsi formée n'est pas elle-même un radical libre mais une molécule (ayant tous ses électrons périphériques appariés). Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène (réaction (4)) en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase...) qui se

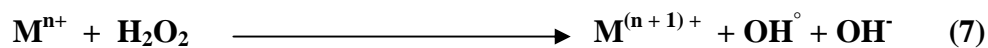
trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxyosomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de H₂O₂. [34,41]



L'eau oxygénée est un intermédiaire réduit de l'oxygène qui est relativement toxique. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxyosomes) et les glutathion peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (réaction (5)), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique, symbolisé ici par GSH) par l'eau oxygénée (réaction (6)).

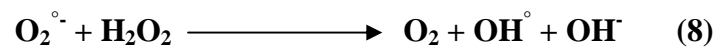


La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle OH[°] en présence de cations métalliques [40] tels que Fe²⁺ ou Cu⁺ par la réaction de *Fenton* (réaction (7)).

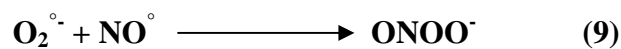


En plus de la réaction de Fenton qui constitue la source majeure de la production *in vivo* du radical OH[°], le radical anion superoxyde O₂^{°-} peut participer à la formation de ce radical à travers :

- La réaction de Haber-Weiss (réaction 8) :



- La possibilité de réactions biradicalaires entre le radical superoxyde et d'autres radicaux libres, produisant des produits secondaires toxiques [39]. C'est le cas en particulier de la réaction de monoxyde d'azote avec le radical superoxyde qui conduit à la formation de peroxynitrite, espèce connue pour ses effets délétère sur l'ADN, les protéines et les lipides (réaction 9):



Le radical hydroxyle OH° est le plus réactif des ROS. Dès qu'il se forme, il attaque les macromolécules de la cellule, et à cause de son temps de demi-vie très court, il réagit *in vivo* quasiment sur le lieu de production. [33]

Au cours du processus d'inflammation cellulaire, les cellules du système immunitaire produisent une variété de ROS y compris le peroxyde d'oxygène et le radical NO° . Ce dernier peut être aussi produit par plusieurs cellules à partir d'arginine et d'oxygène par une réaction catalysé par la NO-synthase. A fort concentration, le NO° devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec le radical $\text{O}_2^{\circ-}$ pour former l'anion peroxynitrite $\text{ONOO}^{\circ-}$.

Plusieurs ROS peuvent se former dans l'organisme vivant, comme l'acide hypochloreux (HOCl), le radical alkoxy (RO°) et le radical peroxy (ROO°). Les principales sources endogènes d'espèces réactives sont représenté dans la figure (5).

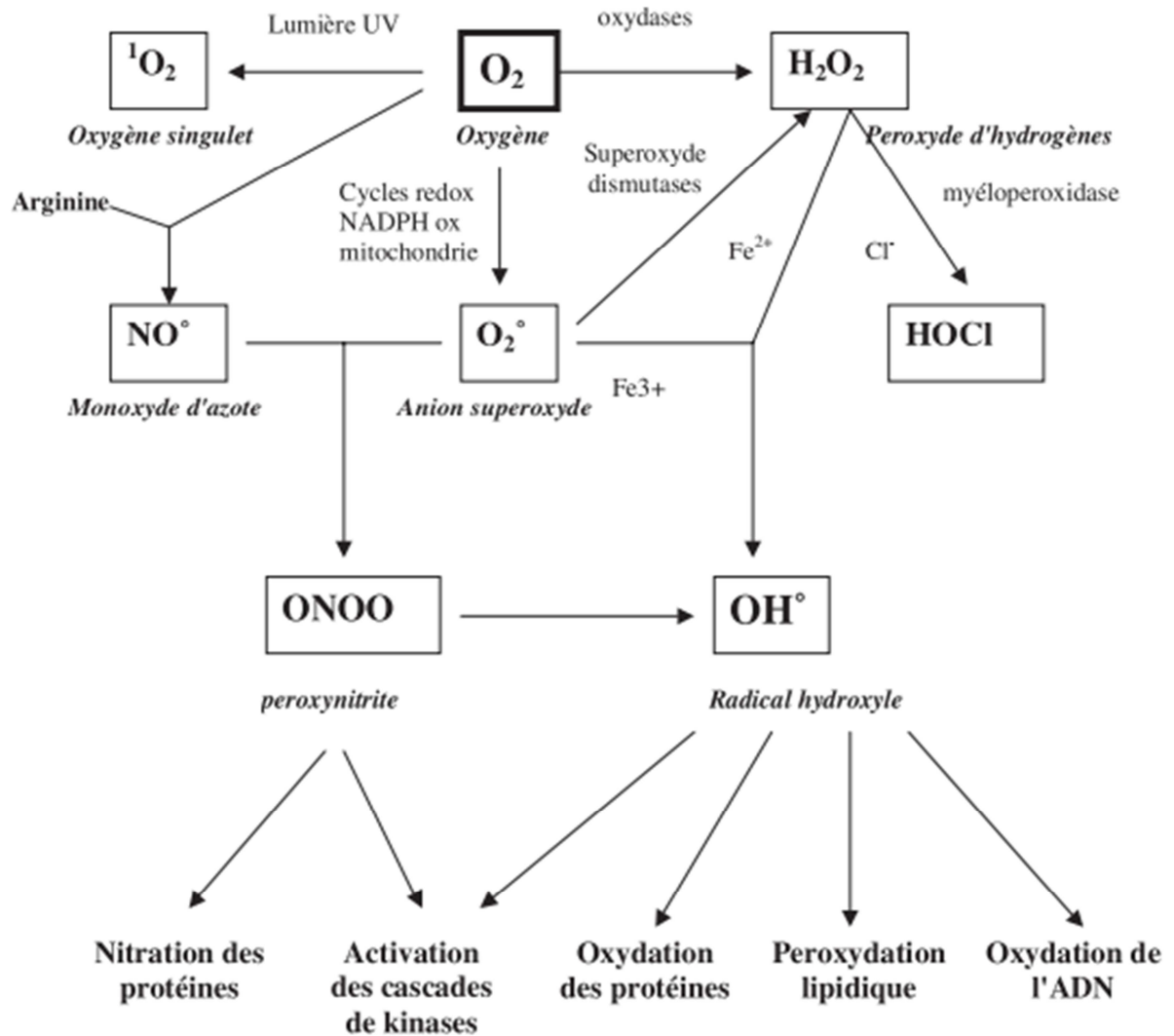


Figure 3. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène. [32]

1.2. Stress oxydatif

1.2.1. Définition

Le stress oxydant est un syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de radicaux libres oxygénés. [31,39]

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines: déficit nutritionnel en antioxydant, surproduction endogène d'origine inflammatoire,

exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (alcool, fumé,...). Pour y faire face l'organisme dispose d'enzymes antioxydants codés par un génome permettant une adaptation à une dose raisonnable de radicaux de l'oxygène. [34,39]

1.2.2. Effets physiologiques des EROs

1.2.2.1. Dégradation par oxydation de l'ADN

Il est désormais établi que la production d'EROs conduit à la formation d'un large spectre de modifications de l'ADN. Les modifications des bases puriques et pyrimidiques, les cassures simple et double-brin, et les sites abasiques, [7,34,36] oxydés ou non, constituent les catégories principales de dommages oxydatifs de l'ADN.

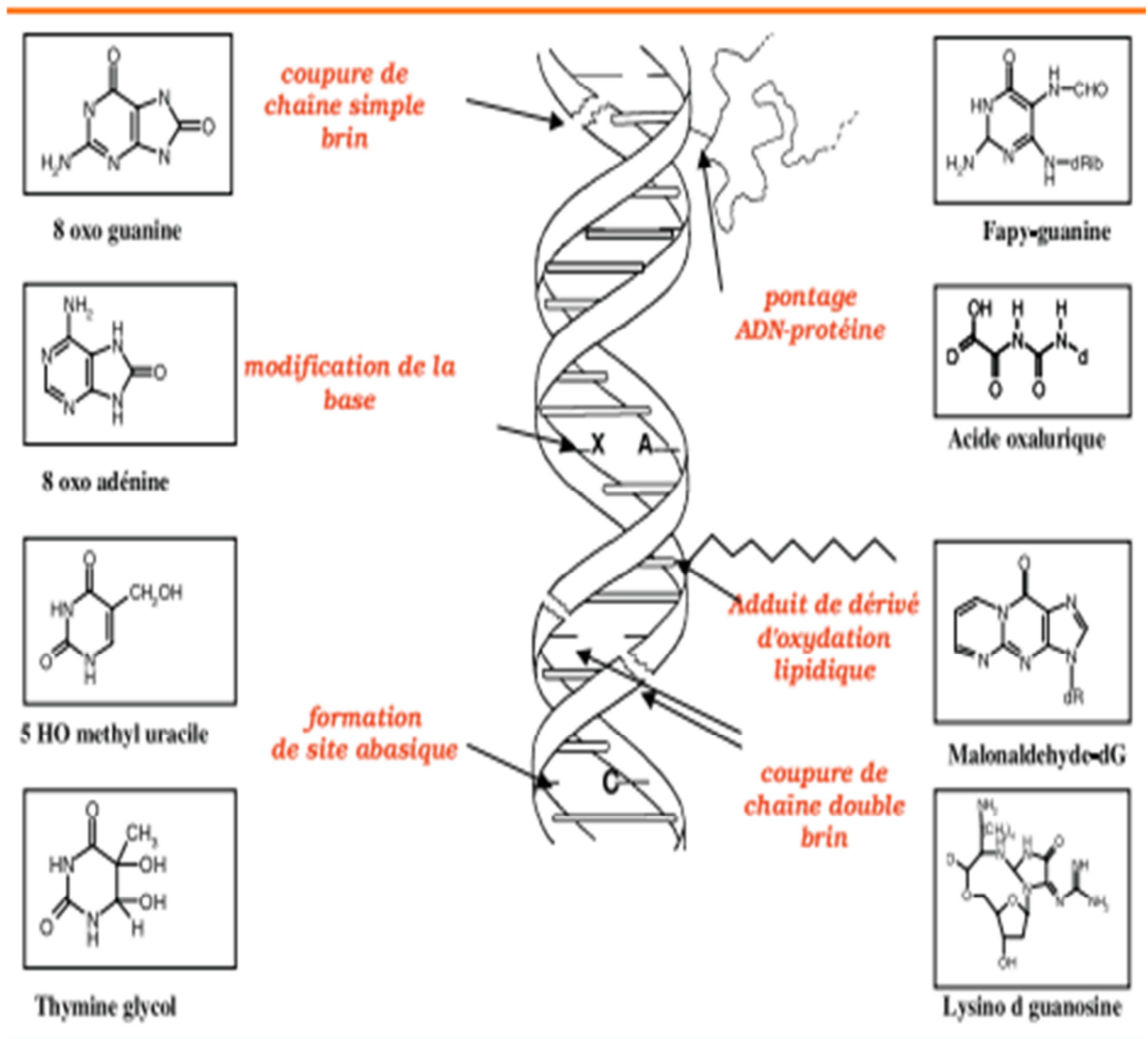


Figure 4. Liaisons de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules. [33]

1.2.2.2. Oxydation des protéines

Dans les conditions physiologiques, les cibles majeures des EROs sont les acides aminés soufrés, les acides aminés basiques (arginine, lysine) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Certains acides aminés comme la cystéine (Cyst) sont particulièrement l'oxydation via leur groupement thiol. La cystéine une fois oxydée conduit à plusieurs composés comme l'acide cystéique, ou génère des ponts disulfures. Ceux-ci peuvent être aisément régénérés en fonction thiols, in vivo par le glutathion réduit ou la thiorédoxine réduite. L'oxydation réversible de la cystéine joue un rôle important dans l'activation ou l'inactivation de certaines protéines. [41]

1.2.2.3. Peroxydation lipidique

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Ce phénomène est la peroxydation lipidique. [33]

Parmi les acides gras polyinsaturés, l'acide linoléique est le plus abondant dans les tissus des mammifères. La position d'un ou plusieurs groupements méthylène entre deux double-liaisons les rend particulièrement sensibles à l'oxydation par les EROs. Ainsi, la peroxydation des acides gras polyinsaturés les rend plus hydrophiles, ce qui tend à altérer la structure des membranes cellulaires et à perturber le fonctionnement de ces membranes, notamment leur rôle de barrière de transport et de récepteur. Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés biologiques présentent trois phases principales (Tableau 4) :

- Une phase d'initiation capable d'arracher un atome d'hydrogène.
- Une phase de propagation : le radical form moléculaire, donnant un radical peroxy $ROO\bullet$, qui va à son tour arracher un atome d'hydrogène sur la chaîne insaturée voisine pour générer un hydroperoxyde $ROOH$ instable et un nouveau radical R assurant la propagation du processus.

- Une phase de terminaison, où se recombinent différents radicaux form des composés stables.

Tableau 4 : Différentes phases de la peroxydation lipidique en présence d'EROs et leurs réactions chimiques. [41]

Phase d'oxydation lipidique	Réaction(s) chimique(s)
Initiation	$RH + OH^\circ \longrightarrow R^\circ + H_2O$
Propagation	$R^\circ + O_2 \longrightarrow ROO^\circ$ $ROO^\circ + RH \longrightarrow ROOH + R^\circ$
Terminaison	$R^\circ + R^\circ \longrightarrow RR$ $ROO^\circ + R^\circ \longrightarrow ROR$ $ROO^\circ + ROO^\circ \longrightarrow ROOR + O_2$

1.2.3. Prise en charges des EROs

1.2.3.1. Systemes anti-oxydants enzymatiques

Les EROs sont des molécules capables de modifier l'ensemble des composants cellulaires et de perturber ainsi leur fonction. Il est donc important que les EROs ne s'accumulent pas en grande quantité dans la cellule. La production d'EROs est maîtrisée par l'intervention d'enzymes spécifiques et de piègeurs de radicaux libres. Le métabolisme cellulaire répond aux attaques des radicaux libres par une voie enzymatique avec notamment les superoxydes dismutase (SOD1 et SOD2) et la catalase. Ces enzymes constituent ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant. Il existe en parallèle une voie non enzymatique telle que le glutathion et l'acide L-ascorbique qui captent les radicaux libres. Les molécules limitant la quantité d'EROs dans la cellule sont désignées par le terme d'antioxydants et désignent « toute substance présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, qui retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat ». [41]

- **Le superoxyde dismutase**

Le superoxyde dismutase est une des rares enzymes capable d'avoir un radical comme substrat, en l'occurrence l'anion superoxyde. La superoxyde dismutase transforme les radicaux superoxydes ($O_2^{\circ-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce dernier étant beaucoup moins réactif. Le peroxyde d'hydrogène produit sera ensuite détoxifié par la catalase.

- **La catalase**

Cette enzyme retrouvée spécifiquement dans les peroxysomes et les hématies, permet la dismutation de l' H_2O_2 en eau et en oxygène. La catalase est un homotétramère comportant 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec Fe^{3+} lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité catalase. Le 3-amino-1,2,4-triazole en présence de peroxyde d'hydrogène est un inhibiteur de la catalase. La catalase peut être inactivée par le peroxyde d'hydrogène à des concentrations supérieures à 100 μM .

- **La glutathion peroxydase**

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme également capable de prendre en charge le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique. Son substrat est le glutathion (GSH) mais d'autres peroxydases existent utilisant le cytochrome c et le NADH.

Il existe 5 isoenzymes de la glutathion peroxydase chez les eucaryotes, dont la plus abondante est la glutathion peroxydase 1 qui est exprimée dans la plupart des cellules. Toutefois, il faut noter que la GPx n'est pas spécifique du H₂O₂, mais plutôt du glutathion. Toutes les GPx sont inhibées d'une façon irréversible par les cyanures quand le GSH est absent du milieu et par l'iodoacétate. Elles sont également inhibées par les ions superoxydes.

1.2.3.2. Systemes anti-oxydants non enzymatiques

- **Le système glutathion**

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) impliqué dans de nombreux processus métaboliques, parmi lesquels le maintien des communications intercellulaire et la prévention de l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. Il constitue le thiol majoritaire au niveau intracellulaire (concentration de l'ordre de 10⁻⁴ à 10⁻³ mol/L), où il est présent essentiellement sous forme réduite. Au cours du vieillissement, un déplacement de cet équilibre entre forme thiol et forme disulfure a été mis en évidence et pourrait être impliqué dans des dysfonctionnements cellulaires observés avec l'âge. [41]

Le glutathion, un chélateur hydrophilique direct retrouvé dans pratiquement tous les compartiments cellulaires, constitue un cofacteur pour la GPx et permet de régénérer les vitamines **C** et **E** dans leur forme active. La détoxification des EROs formés de façon continue au cours du métabolisme oxydatif est donc impérative. Le glutathion peut chélater les ions cuivreux et ainsi limiter les réactions de type Fenton. En tant qu'antioxydant, le glutathion peut donc intervenir par deux types de mécanismes : la capture d'espèces radicalaires et la participation à l'activité d'enzymes anti-oxydants.

➤ **Autres anti-oxydants**

Les antioxydants non-enzymatiques incluent l'acide ascorbique (vitamine C) ou l' α -tocophérol (vitamine E). La vitamine E est le chélateur le plus efficace afin de contrecarrer les radicaux peroxy dans la bicouche de phospholipides membranaires. Cependant, un des produits finaux de l' α -tocophérol (LOOH) est réactif et doit par la suite, être neutralisé par la glutathion peroxydase.

Partie expérimentale

Matériels
&
Méthodes

1. Matériels

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de chimie pharmaceutique de département de chimie de l'UMMTO.

1.1. Matériel végétal

La matière végétale (cannelle bâton , origine de chine), a été broyée par un mortier. La poudre obtenue est utilisé pour la préparation de l'extrait éthanolique des polyphénols totaux.

1.2. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont représenté dans le tableau 5.

Tableau 5 : Réactifs chimiques utilisés.

Nom chimique	Formule brute
Ethanol	C_2H_6O
Chloroforme	$CHCl_3$
Acide sulfurique	H_2SO_4
Ferricyanide de potassium	$[K_3Fe(CN)]$
Chlorure ferreux	$FeCl_2$
Hydrogénocarbonate de sodium	$NaHCO_3$
Méthanol	CH_3OH
Chlorure d'aluminium	$AlCl_3$
Acide acétique	CH_3COOH
Réactif de folin-Ciocalteu	

2. Méthodes

- **Techniques d'extractions**

Macération : consiste à laisser séjourner un corps solide dans un liquide ou dans un milieu humide, pour extraire certains principes actifs ou nutritifs de ce corps ou pour obtenir une modification de celui-ci, état d'un corps soumis à cette action.

Hydrodistillation : est un procédé très ancien permettant de séparer des substances d'une mixture liquide. En chauffant le liquide, les constituants se vaporisent selon leur température d'ébullition respective. Un condenseur permet de refroidir ces vapeurs afin de récupérer ces substances dans des récipients appropriés.

Infusion : Préparation liquide buvable, obtenue par l'action de l'eau bouillante sur une substance (souvent une plante) dont les principes solubles actifs se diffusent dans l'eau par macération.

Décoction : est une méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante. Elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, bois.

2.1. Préparation de l'extrait éthanolique

Pour extraire les polyphénols de broyat de la cannelle de chine par macération, nous avons opté pour le protocole décrit par Romani et al [43]. En y apportant quelques modifications (on a utilisé l'éthanol comme solvant d'extraction au lieu de méthanol).

Un poids de 25g de la poudre de la cannelle, est mis en macération dans 100ml d'éthanol 96% pendant 24h. Cette opération est réalisée 04 fois (25g de la poudre X 4 et 100ml d'éthanol X 4). Après filtration avec papier whattman, le filtrat obtenu dans les 4 opérations est mélangé dans un erlenmayer puis évaporé à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type HEIDOLPH. Le résidu d'évaporation est l'extrait des polyphénols totaux, qui a été utilisé dans cette étude. Cette méthode d'extraction a été réalisée 3 fois afin d'obtenir la quantité suffisante d'extrait pour les expériences effectuées.

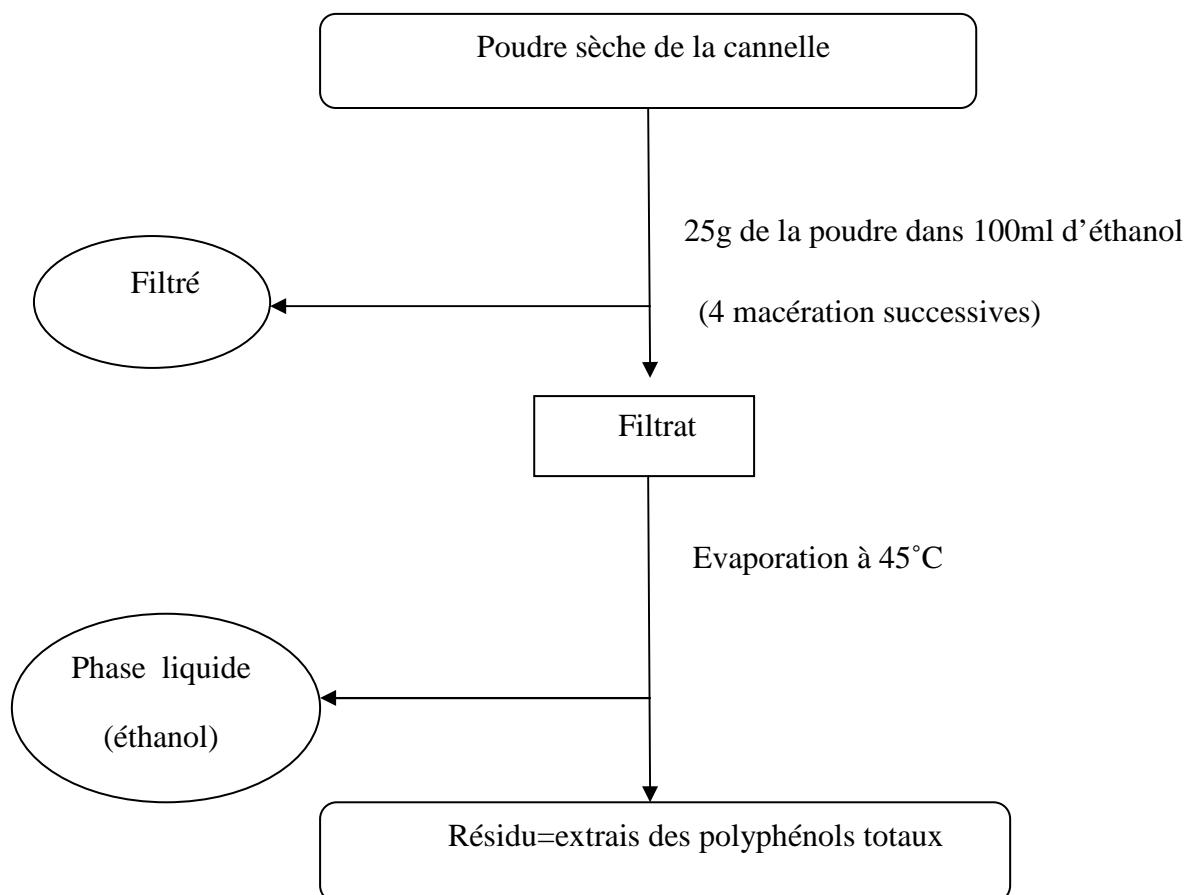


Figure 5 : Procédure expérimentale d'extraction des polyphénols totaux de la cannelle.

2.2. Testes chimiques d'identification des constituants végétaux

2.2.1. Tests pour les flavonoïdes

Deux tests ont été utilisés pour déterminer la présence de flavonoïdes dans l'extrait des polyphénols.

Préparation aqueuse

- 5 ml d'une solution d'ammoniaque diluée sont ajoutées à une portion du filtrat d'une solution aqueuse de l'extrait. L'observation de la couleur jaune, et sa disparition après

L'addition de quelques gouttes de l'acide sulfurique concentré, indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait [43].

- Quelques gouttes d'une solution d'aluminium (AlCl_3 à 1%) sont ajoutées à une portion du filtrat aqueux de l'extrait. L'observation de la couleur jaune indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait [43].

2.2.2. Test pour les tanins hydrolysables

0.250g d'extrait éthanolique sont ajoutés à 10 ml de l'eau distillée dans un tube à essai, puis porté à ébullition puis filtré. Quelques gouttes du chlorure ferreux sont ajoutées au filtrat. L'observation de la couleur vert-marron (tanins catéchiques) ou bleu nuit (tanins gallique), indique présence des tanins hydrolysables dans l'extrait [43].

2.2.3. Test pour les tanins condensés

Déposition d'un précipité rouge quand un extrait aqueux est porté à ébullition avec l'acide chlorhydrique aqueux (HCl à 1%) [43]

2.2.4. Test pour les saponines

Pour mettre en évidence la présence des saponines, nous avons introduit 10 ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence des saponines [35].

2.2.5. Test pour les terpenoïdes

5 ml de solution aqueuse de l'extrait sont ajoutés à 2 ml du chloroforme, après une simple agitation, nous avons ajouté quelques gouttes de H_2SO_4 [44]. 2 phases ont été formées :
Une phase de couleur bleu-vert en haut qui indique la présence des terpenoïdes
Une deuxième phase en bas : ayant la même couleur de l'extrait éthanoïque.

2.2.6. Test pour les glycosides

1 ml d'acide acétique glacial, quelques gouttes de FeCl_3 et H_2SO_4 concentré sont mélangées.

Un précipité vert-bleu indique la présence des glycosides [44].

2.2.7. Test pour les stéroïdes

1 ml de l'extrait des phénols totaux est mélangé avec 2 ml de chloroforme. Une réaction de précipitation est observée. Après filtration, nous avons obtenu une couleur marron violacé qui indique la présence des stéroïdes [44].

2.3. Dosage des polyphénols totaux

La détermination quantitative des phénols totaux dans l'extrait préparé est réalisée par la méthode de McDonald et al [45] basé sur le réactif de Folin-Ciocalteu .

Principe

Le dosage des polyphénols totaux est basé sur la capacité de ces derniers à être oxydés par un mélange d'acides phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) appelé couramment réactif de Folin-Ciocalteu. Ces derniers sont réduits en oxydes de couleur bleu dont le maximum d'absorption est à 760 nm. Cette réduction se fait en deux étapes ; une phase rapide de 30 min conduisant à la couleur bleu suivie d'une phase plus lente pendant laquelle la couleur évolue vers le bleu foncé. La concentration en composés phénoliques se détermine à la fin de la phase rapide et s'exprime en équivalent acide gallique [47].

Mode opératoire

0.125 ml d'une solution méthanolique de l'extrait (0.1 mg/ml), sont mélangé avec un volume de 1.250 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dix fois dilué par l'eau distillée). Après agitation on ajoute 1 ml de Na_2HCO_3 aqueux à 1M. Le mélange obtenu est agité puis chauffé à 45°C pendant 15 minutes dans un bain Marie. L'absorbance du mélange réactionnel est mesuré à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (ZUZI SPECTROPHOTOMETE, UV-4211/SO) Contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, on remplaçant le volume de l'extrait par le même volume de l'eau distillée.

Matériels & Méthodes

Une courbe de calibration se prépare de la même façon à celle de l'échantillon, par la préparation de différentes concentrations de l'acide gallique dans l'éthanol-eau (50 :50 , v/v) allant de 0 à 250 mg/l.

2.4. Dosage des flavonoïdes totaux

Le contenu des flavonoïdes totaux dans l'extrait préparé a été déterminé par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium (AlCl_3) de Chang et al [46].

Principe

Le chlorure d'aluminium AlCl_3 forme des complexes acides stables avec le groupe cétone en position (4) et l'un des deux groupes hydroxyle sur la position C3 et C5 chez les flavones et les flavonols, comme il forme aussi des complexes acides labiles avec les groupes ortho-dihydroxyls dans les deux cycles A et B des flavonoïdes. Ces complexes sont caractérisés par la longueur d'onde d'absorption moyenne de 415 nm.

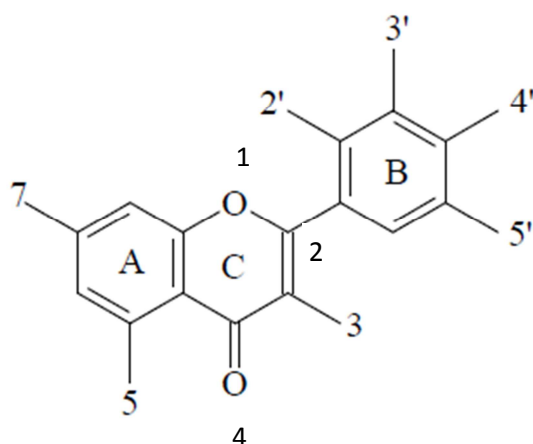


Figure 6 : Liaison possible d' AlCl_3 avec le noyau flavone.

Mode opératoire

0.250 ml de la solution méthanolique (0.1 mg/ml) de l'extrait est séparément mélangé avec 0.75 ml du méthanol, 50 μl de AlCl_3 aqueux à 10%, 50 μl d'acétate de potassium ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) aqueux (1M) et 1.4 ml d'eau distillé. Après incubation à température ambiante pendant 30 minutes, les absorbances du mélange réactionnel sont mesurées à 415 nm avec le spectrophotomètre (ZUZI SPECTROPHOTOMETE, UV-4211/SO).

Matériels & Méthodes

Le volume du chlorure d'aluminium aqueux à 10% est substitué par le même volume d'eau distillée dans l'échantillon blanc.

Une courbe de calibration est préparée de la même manière à celle de l'échantillon, par la préparation de différentes solutions méthanoliques de la quercétine allant de la concentration de 25 à 100 µg/ml

2.5. Activité antioxydante

2.5.1. Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Le piégeage du radical peroxyde d'hydrogène a été déterminé par la méthode de Cheng et al.

Quatre solutions de l'extrait à différentes concentrations ont été préparées selon le tableau (6).

Tableau 6.Solutions à différentes concentration préparé de l'extrait éthanolique.

Solution	1	2	3	4
Concentration (mg/ml)	50	100	150	200

Une solution de H₂O₂ à une concentration de 2 mmol/L a été préparée dans le tampon phosphate (pH 7,4). Un volume de 0.6 ml de chaque solution de l'extrait a été mélangé avec 10 ml de la solution de H₂O₂. D'autre part, on prépare un blanc dans les mêmes conditions sans la présence de l'extrait (antioxydant).

Après 10 min, l'absorbance de peroxyde d'hydrogène a été mesuré à 230 nm [58].

$$\% \text{ de piégeage } H_2O_2 = [(A_0 - A_1)/A_0]/100.$$

Telle que :

A_0 : représente l'absorbance sans l'antioxydant.

A_1 : représente l'absorbance en présence d'antioxydant.

2.5.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de la Cannelle est déterminé selon la méthode d'Oyaizu et al [56,59]. Différentes concentrations d'extrait (50 - 200 mg/ml) sont mélangés avec 2.5 ml de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanide de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min, ensuite l'absorbance est lue à 700 nm à l'aide de spectrophotomètre.

2.5.3. Etude chromatographique de l'extrait préparé (CCM)

Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM), également appelée chromatographie planaire est une méthode qui permet l'analyse de la composition d'un mélange par la séparation de ses constituants, l'analyse de la pureté et/ou l'identification d'une substance par comparaison avec la substance de référence. [48,49,54]

Cette méthode physique est basée sur la différence d'affinité de substances vis – à – vis d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. Brièvement, quelques gouttes d'un mélange ou d'une substance pure solubilisés dans un solvant sont déposées sur un support solide (phase stationnaire, adsorbant). Ensuite la base de ce support est placée dans une cuve remplie de la phase mobile qui peut être soit un solvant unique soit un mélange de plusieurs solvants. La phase mobile ou éluant migre vers le haut de la phase stationnaire par capillarité en entraînant avec elle les substances déposées. Les substances migrent à une hauteur qui dépend de leur affinité avec le solvant mais aussi de leur affinité avec la phase stationnaire. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu polyphénolique et flavonoïque de l'extrait. [51, 53,54]

Matériels & Méthodes

Les conditions chromatographiques adoptées pour la réalisation de cette technique sont :

Phase stationnaire

Plaque chromatographique pré-étalées de gel de silice.

Phase mobile

Mélange de solvant : n-butanol – acide acétique - eau (5V/2V/1V) [53].

Échantillon

Extrait préparé des flavonoïdes totaux.

Révélation

Après développement, les plaques sont observées :

*Dans le visible et sous la lumière UV à 365 nm.

*Dans le visible après pulvérisation par une solution de KMNO_4 à 0.01M.

Les couleurs observées sur les plaques dans le visible et sous la lumière UV à 365 nm, apportent des informations sur la nature des principaux constituants de l'extrait, ensuite le rapport frontal des deux extraits est évalué. [61]

2.6. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de la Cannelle est évaluée par la technique de diffusion sur disque selon la méthode décrite par Falleh et al [60] vis-à-vis de quatre souches bactériennes.

Principe

La méthode de diffusion sur disque est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne (figure 9) .

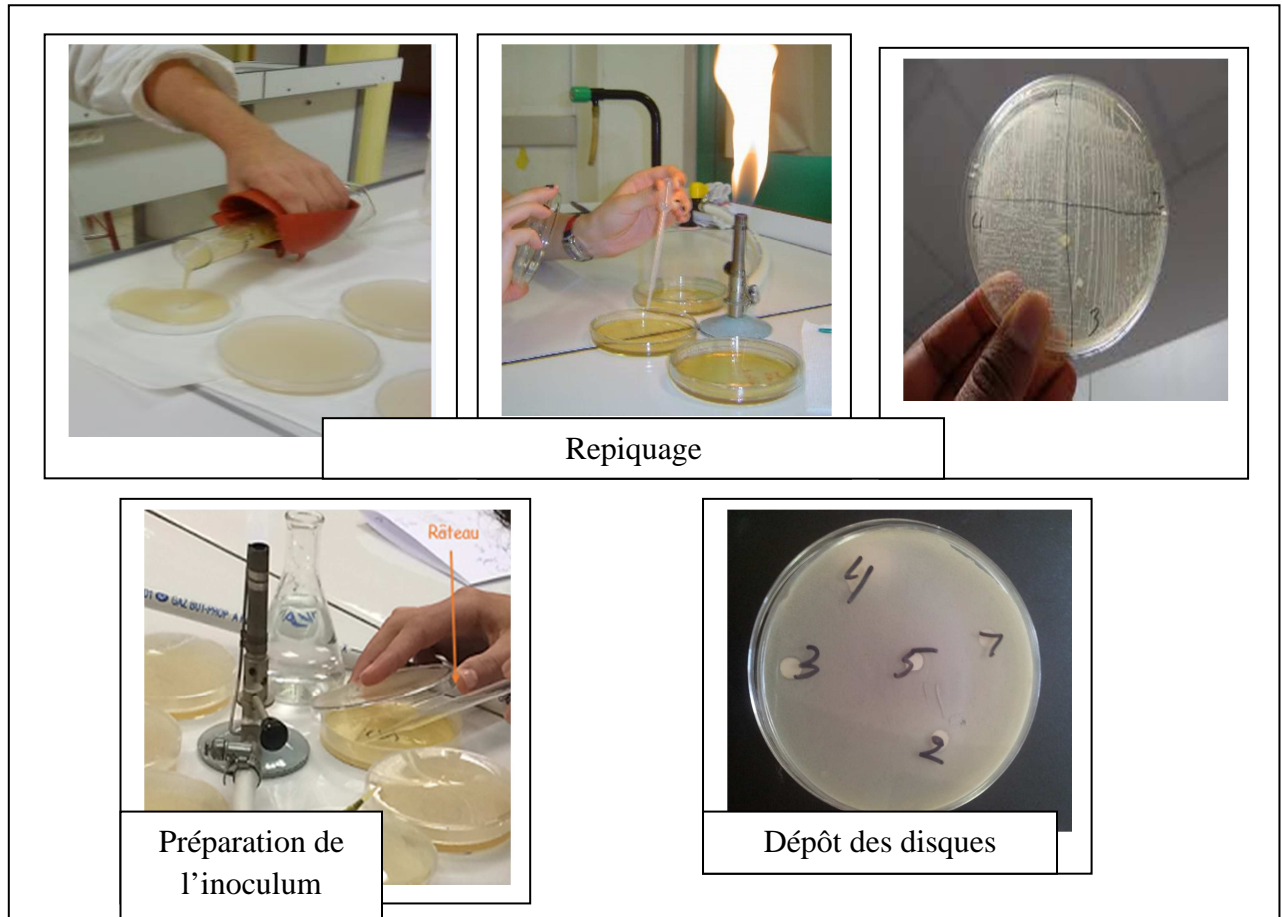


Figure 7. Principe de la méthode de diffusion sur disque.

Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir migratoire de l'extrait aqueux à l'intérieur d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture nutritif [57].

Le Protocole d'évaluation de l'activité antimicrobienne est le suivant [50,55] :

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne de la Cannelle ont tous été fournis par le laboratoire de microbiologie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou et sont les suivants :

- Staphylococcus aureus, Bacillus cereus : bactéries Gram+.
- Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa : bactéries Gram -.

1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit :

Matériels & Méthodes

Dissoudre 38 g de la gélose Mueller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis verser dans des flacons et autoclaver pendant 15 minutes à 121°C. Lors de l'utilisation, plonger les flacons dans un bain mari (pour avoir la gélose à l'état liquide) et verser le contenu dans des boîtes de Pétri dans une zone stérile.

2. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés par l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3. Préparation des dilutions d'extraits de la Cannelle

L'extrait de la Cannelle a été dissous dans l'eau distillée pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives : 0.1mg /ml ; 0.125mg/ml ; 0.250mg/ml ; 0.5mg/ml.

4. Repiquage

Faire couler dans une zone stérile ; environ 10 ml de la gélose nutritive dans des boîtes de Pétri et laisser à température ambiante jusqu'à solidification du milieu

A l'aide d'une anse de platine ; on racle quelques colonies de chaque souche bactérienne puis on les étale à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60°C après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Enfin, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h pour optimiser leur croissance.

5. Préparation de l'inoculum

On racle à l'aide d'une anse de platine ; quelques colonies bien isolées de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau physiologique.

Après avoir bien homogénéisé la suspension bactérienne, la densité optique (**DO**) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO.LTD. (UK) VIS-7220G). Elle doit être entre **0.08 à 0.10 à 625 nm**. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

6. Ensemencement et dépôt des disques

Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée Mueller-Hinton de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose Mueller-Hinton inoculée à l'aide d'une pince stérile.

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

7. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos translucides d'inhibitions autour des disques à l'aide d'une règle (exprimé en mm).

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis d'extrait étudié est classée selon le diamètre d'inhibition (tableau 7).

Tableau 7.Sensibilité des souches vis-à-vis d'extrait.

Diamètre d'inhibition « D »	Sensibilité
< 8 mm	Non sensible (-)
Compris entre 9-14 mm	Sensible (+)
15-19 mm	Très sensible (++)
>20 mm	Extrêmement sensible (+++)

2.7. Analyse spectroscopique

- **Spectroscopie ultra-violet /vis (UV/Vis)**

Principe

La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le

Matériels & Méthodes

domaine de l'ultraviolet (100 nm – 400 nm), du visible (400 nm – 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm - 1 400 nm). Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transition électronique(s). Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide.

Le spectre est le plus souvent présenté comme une fonction de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Il peut aussi être présenté comme le coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde.

Les échantillons de l'extrait éthanolique ont été dissouts dans l'eau distillée à 10^{-4} M et les mesures d'absorbance ont été enregistrées avec le spectrophotomètre (ZUZI SPECTROPHOTOMETER UV-4211/SO) allant de 200 à 800 nm. (Laboratoire de Chimie pharmaceutique de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou).

Résultat
&
Discussions

Résultats

1. Calcul de rendement

Les quatre macérations de 25 g de la poudre dans 100 ml d'éthanol ont données 6,70 g d'extrait de couleur brune foncée.

$$\mathbf{R} = (\mathbf{m_E/m_0}) * \mathbf{100}$$

R : rendement de l'extraction

m₀ : masse initiale de broyat de la cannelle à extraire.

m_E : masse de l'extrait brut éthanolique obtenu.

Le rendement d'extraction éthanolique des broyats de la cannelle est :

$$R = (6.70/100) * 100$$

$$\mathbf{R} = \mathbf{6.70\%}.$$

Le rendement d'extraction éthanolique de la poudre de la cannelle étudiés est de 6.70% montre que la cannelle est riche en polyphénols.

2. Tests chimiques d'identification

Les résultats des tests chimiques d'identification des constituants de l'extrait donnent le tableau suivant :

Tableau 8 : Résultats des tests chimiques d'identification des constituants de la cannelle de l'extrait.

Test pour		Résultats
Flavonoïdes	Test 1	+
	Test 2	+
Les tanins hydrolysables		+
Les tanins condensés		-
Les saponines		-
Les terpenoïdes		+
Glycosides		-
Stéroïdes		+

(+) = présence du constituant dans l'extrait.

(-) = absence du constituant dans l'extrait.

3. Dosages spectrophotométrique

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans l'extrait préparé, réalisé par la méthode spectrophotométrique de McDonald et al [51] a donné les résultats suivants :

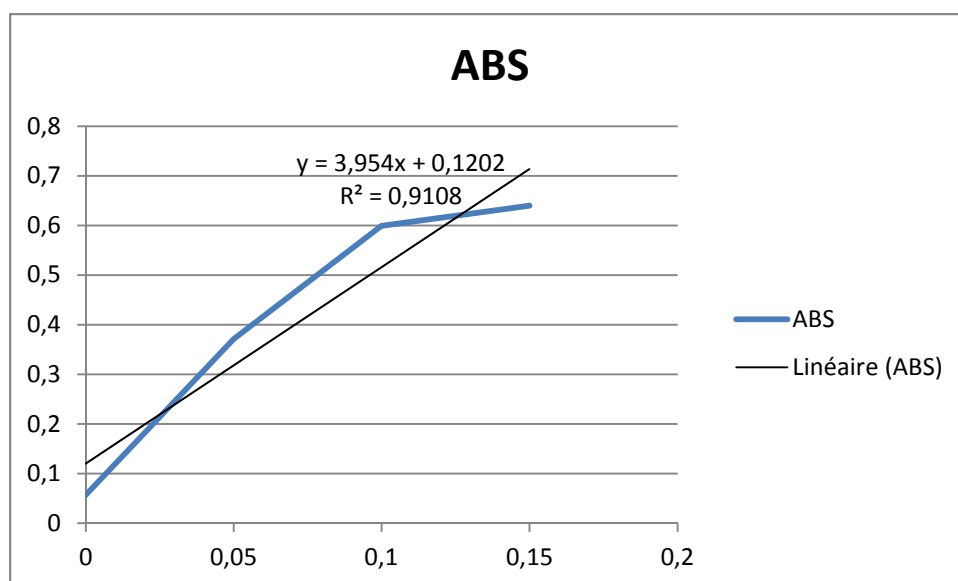


Figure 8. Droite d'étalonnage de l'acide gallique dans le dosage de Folin-Ciocalteu.

L'équation de la courbe de calibration préparée par l'acide gallique est :

$$Y = 3.954x + 0.120, R^2 = 0.910$$

Y : absorbance mesuré par le spectrophotomètre.

x : concentration de la solution de l'acide gallique (mg/l) dans l'éthanol-eau (50/50, v/v).

La concentration des phénols totaux dans l'extrait, exprimée comme acide gallique équivalent (AGE), est calculée par l'équation précédente comme suit :

$$C = x = (y - 0,120) / 3,954 \text{ (mg/ml)}$$

Y : absorbance de la solution analysée de l'extrait, mesurée par le spectrophotomètre.

C : concentration recherchée des phénols totaux dans la solution analysée de l'extrait, exprimée comme (AGE) en (mg/ml).

L'absorbance de notre échantillon est de **0.538**

$$C = x = (0.538 - 0.120) / 0.395. \implies C = 0.11 \text{ mg/ml}$$

$$C = 0.11 \text{ mg AGE/ml (extrait)} \implies C = 01 \text{ g AGE / g d'extrait.}$$

3.2. Dosages des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux réalisé par la méthode spectrophotométrique de Chang et al a donné les résultats suivants :

L'équation de la courbe de calibration préparée par la quercetine est :

$$y = 0.0067 x + 0.0132 ; R^2 = 0.99 \text{ (Coefficient de corrélation)}$$

y : absorbance mesurée par le spectrophotomètre.

x : concentration de la solution éthanolique de la quercetine ($\mu\text{g/ml}$).

$$C = x = (y - 0.0132)/0.0067 \quad \text{et} \quad y = 0.08$$

$$C = 9,97\mu\text{g/ml} \quad \Longrightarrow \quad C = 99,7 \text{ mg QE / g d'extrait.}$$

4. Activités antioxydantes

4.1. Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Tableau 9. Résultats de l'activité antiradicalaire de l'extrait vis-à-vis de H_2O_2 .

[C] (mg/ml)	Blanc	50	100	150	200
Abs	0.139	0.108	0.195	0.251	0.285

Tableau 10. Résultats de pourcentage d'oxydations.

Solutions	Blanc	50	100	150	200
% d'oxydation	0.000	0.002	0.004	0.008	0.010

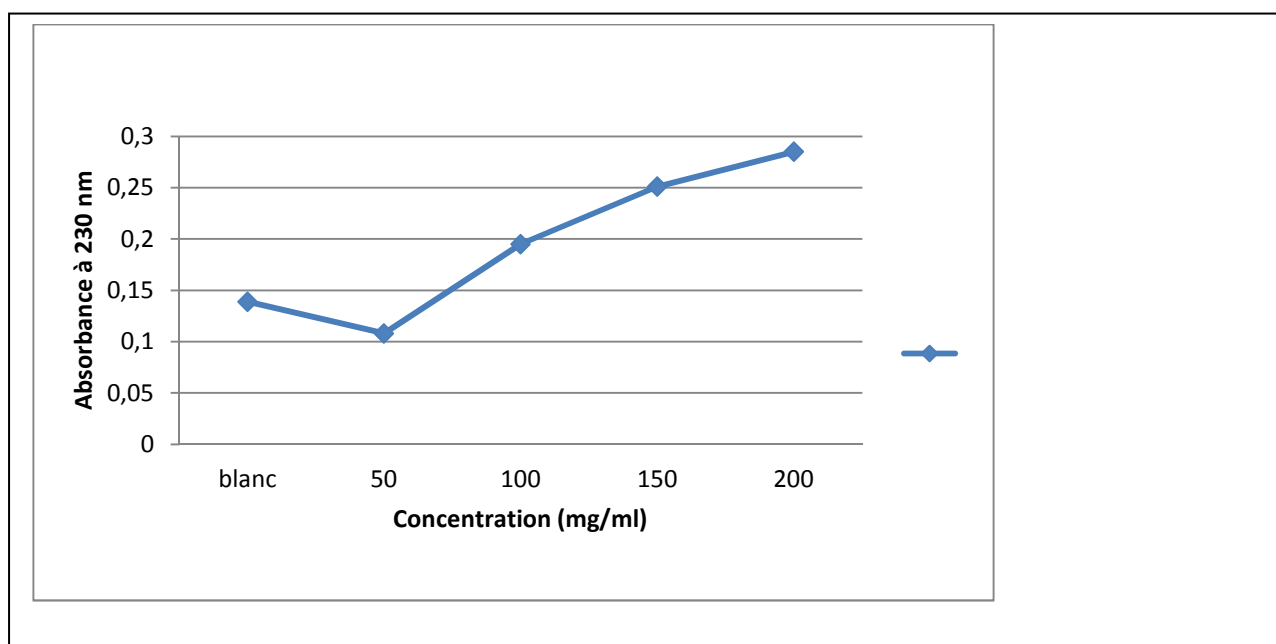


Figure 9: Activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique du Cannelle vis-à-vis du radical peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

4.2. Pouvoir réducteur

Les résultats montrent que l'extrait possède un pouvoir réducteur remarquable, et qui sont regroupé dans le tableau suivant:

Tableau 11. Résultats de pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique.

[C]extrait (mg/ml)	Blanc	50	100	150	200
Abs	0.045	0.096	0.300	0.413	0.512

Tableau 12. Résultats de % de réduction.

Solutions	Blanc	50	100	150	200
% de réduction	0.000	0.011	0.056	0.081	0.103

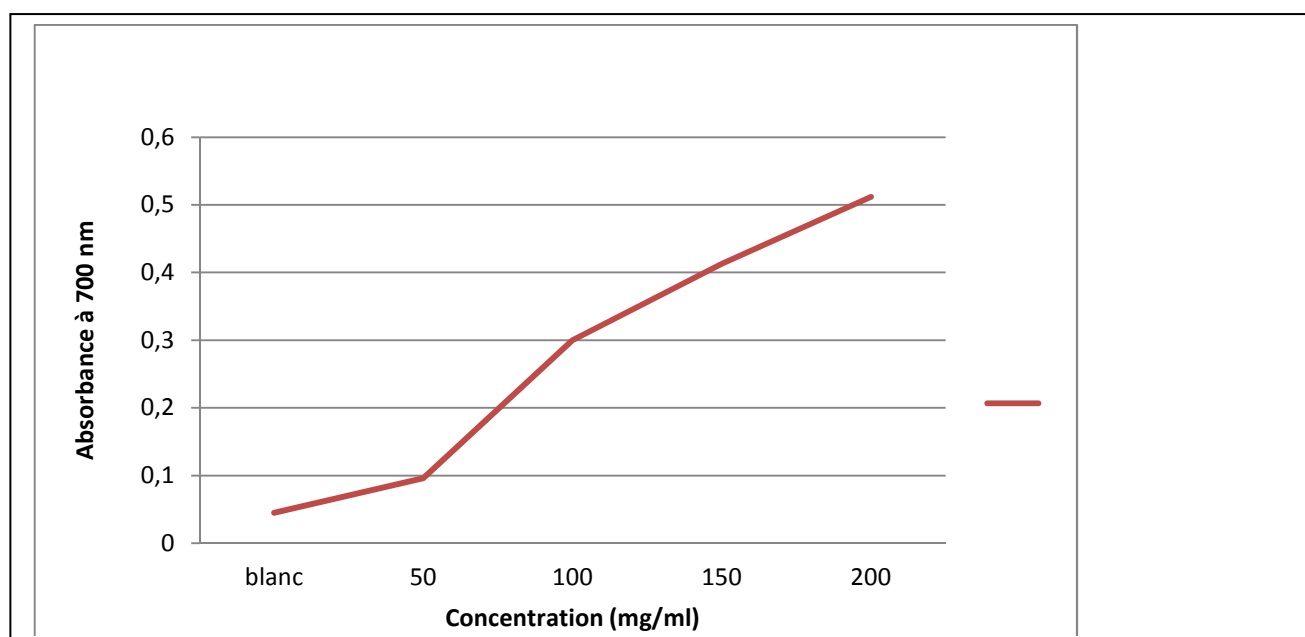


Figure 10. Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de *Cannelle* à 700 nm.

4.3. Etude chromatographique de l'extrait préparé

- **Chromatographie sur couche mince analytique (CCM)**

La chromatographie sur couche mince effectuée sur les extraits éthanolique (tache 1) et méthanolique (tache 2) ; avec un système solvant composé de n-butanol – acide acétique - eau (5V/2V/1V)[6] et une phase stationnaire de gel de silice, a donné les résultats représentés dans le tableau (11) et la figure (13).

Tableau 13. Principales couleurs observés sur le chromatogramme CCM des extraits éthanolique et méthanolique dans le visible et l'UV à 365 nm.

	Couleur dans la lumière visible	Couleur dans la lumière UV à 350 nm
Taches	Jaune orangé très pâle	bleue

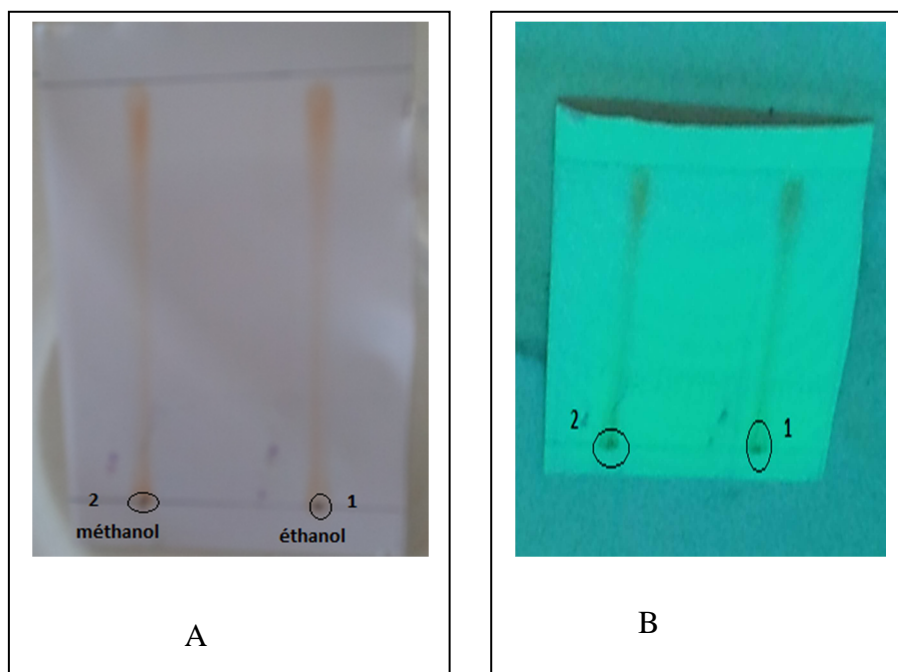


Figure 11.Chromatogramme CCM des extraits éthanolique et méthanolique dans la phase mobile de n-butanol - acide acétique - eau (5V/2V/1V) et une phase stationnaire de gel de silice.

(A) Dans le visible.

(B) Dans l'UV à 365 nm.

Calcul du rapport frontal R_f

$$R_f \% = h / H$$

h distance parcourue par l'extrait (cm).

H distance entre la ligne de dépôt jusqu'à le front du solvant =7.9 cm.

R_f rapport frontal (%).

Tableau 14. Valeurs des rapports frontales des extraits éthanolique et méthanolique.

	Extrait éthanolique	Extrait méthanolique
h (cm)	$h_1 = 7.5$	$h_2 = 7.4$
R_f (%)	$R_{f1} = 0.95$	$R_{f2} = 0.94$

5. Activité antimicrobienne

A partir d'une solution aqueuse de $C_0 = 1$ mg/ml de l'extrait, les dilutions suivantes sont préparées :

$$C_1 = 0.1 \text{ mg/ml,}$$

$$C_2 = 0.125 \text{ mg/ml,}$$

$$C_3 = 0.250 \text{ mg/ml,}$$

$$C_4 = 0.5 \text{ mg/ml,}$$

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 13 et la figure 14.

Tableau 15. Résultats de l'activité antimicrobienne.

		C_1	C_2	C_3	C_4
Diamètre (mm)	Bcillus	6	6	7	7
	E.coli	7	7	7	8
	Pseudo	8	9	10	12
	Staph	8	8	9	12

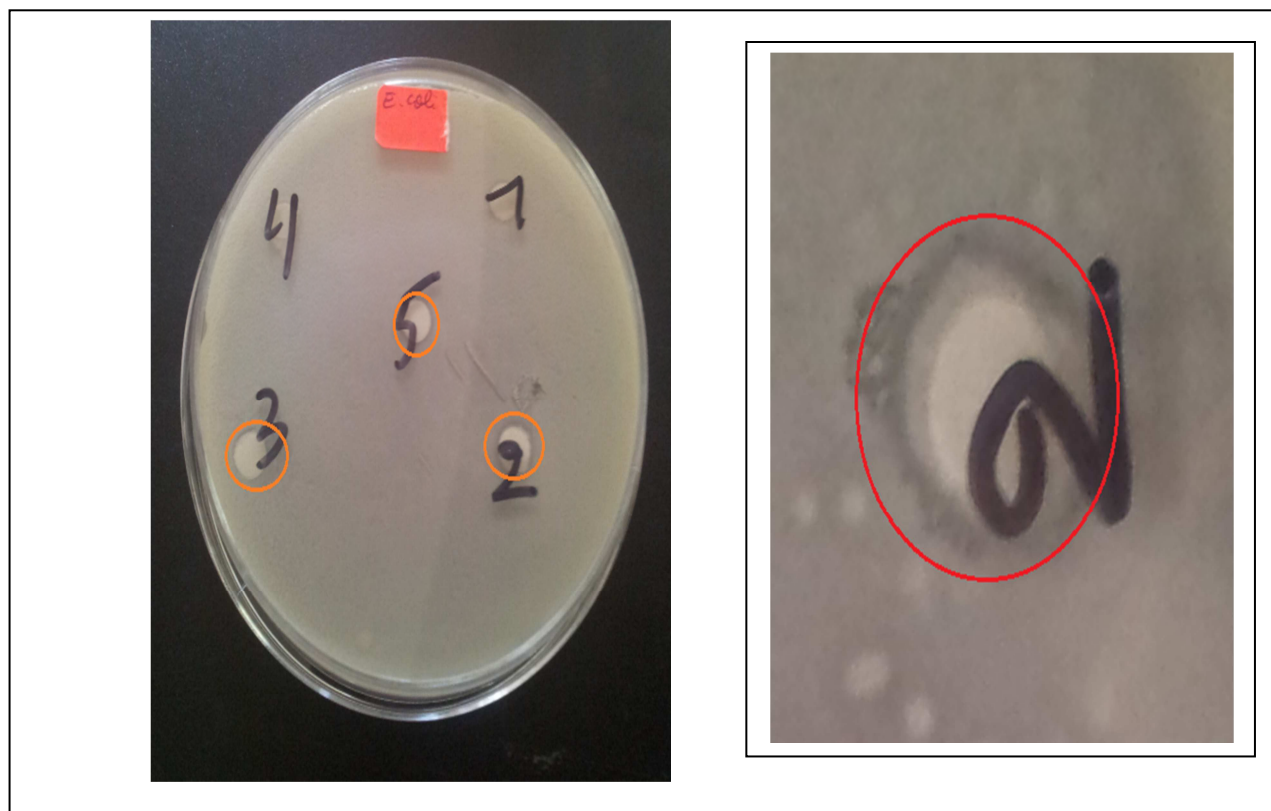


Figure 12.Résultats de l'activité antibactérienne (disque d'inhibition).

6. Analyse spectroscopique

Spectroscopie ultra-violet /vis (UV/Vis)

Tableau 16.Résultats d'analyse spectroscopique UV/Vis.

λ (nm)	200	300	400	500	600	700	800
Absorbances	1.856	1.474	0.091	0.043	0.031	0.029	0.023

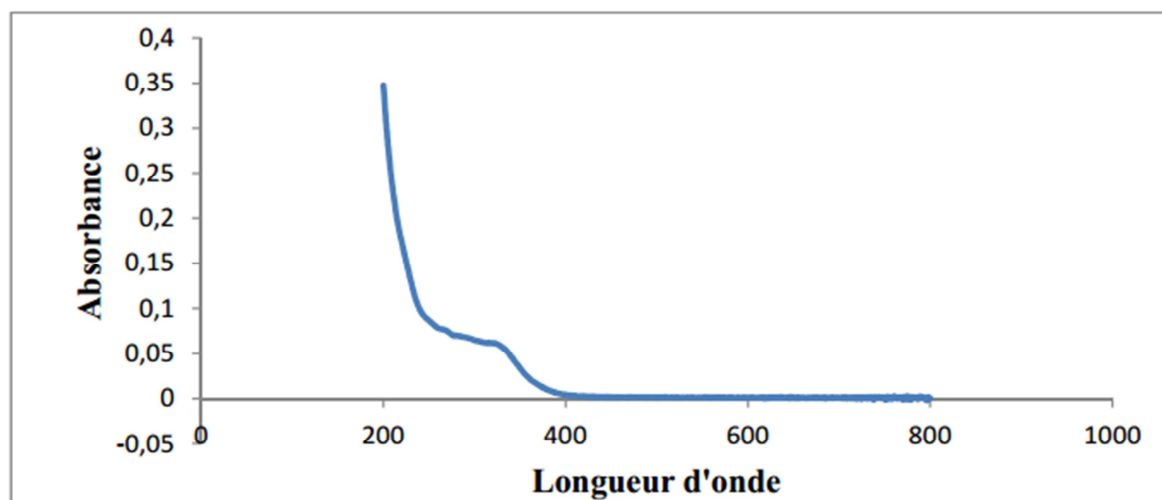


Figure 13. Spectre UV/vis de l'extrait aqueux à 10^{-4} M .

DISCUSSION

1. Préparation de l'extrait de la cannelle

Il est à noter que l'éthanol est un bon solvant d'extraction des polyphénols, car il a l'avantage de solubiliser correctement des composés phénoliques moyennement polaires et peut entraîner aussi des substances lipophiles résiduelles et l'un des solvants le plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques et l'obtention d'une meilleure activité antioxydante.

L'utilisation de la poudre a pour but d'améliorer l'extraction du fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter la surface du contact avec le solvant et faciliter sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage, encore les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules. De plus le déroulement de la macération pendant un temps étalé (24h) et à température ambiante permet respectivement, d'extraire au maximum les différents composés de la poudre et la prévention de leur altération ou modification probable par la température élevée.

2. Tests chimiques d'identification

Les deux tests d'identification des flavonoïdes et les tests chimiques d'identification des (tanins hydrolysables, saponines, stéroïdes) étaient positifs. Cependant les tests chimiques d'identification des tanins condensés, glycosides sont négatifs.

3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les composés phénoliques ont un grand intérêt parce qu'ils sont des antioxydants naturels et certaines d'entre eux sont des composés antimicrobiens. Par conséquent, il est nécessaire de déterminer la quantité totale des polyphénols et des flavonoïdes dans l'extrait de la cannelle étudié.

Le dosage des polyphénols totaux est fait par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est considérée comme la meilleure méthode de détermination du taux des polyphénols totaux des extraits de la cannelle qui a donné la valeur de **1,1 mg AGE/g d'extrait**.

Les flavonoïdes comme composés les plus intéressants des polyphénols sont aussi déterminés dans ce travail par la méthode du trichlorure d'aluminium. Le dosage a donné une valeur de **0,0916 mg QE/ g d'extrait** montrant aussi la présence des flavonoïdes en quantité importante dans l'extrait.

4. Activité antioxydante in vitro

4.1. Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

L'activité anti-radicalaire est très importante dû au rôle délétère des radicaux libres dans les systèmes biologiques. La méthode du radical de H_2O_2 , utilisée dans le présent travail, est une procédure commune dans laquelle l'activité antioxydante de l'échantillon étudié est estimée par l'absorbance de H_2O_2 .

D'après les résultats obtenus et qui sont exprimé sous forme de graphe, on remarque que l'absorbance de peroxyde d'hydrogène croit avec l'augmentation de la concentration des solutions en extrait de la poudre de la cannelle (antioxydant).Le pourcentage d'oxydation croit avec l'augmentation de la concentration des solutions préparés.

4.2. Pouvoir réducteur

Nous avons obtenu une courbe croissante proportionnelle à la concentration de l'extrait. On observe 2 étapes : une première rapide qui correspond à la réduction directe de $Fe^{3+}(CN)_6$ en une forme ferreuse $Fe^{2+}(CN)_6$, qui évolue dans la deuxième étape en un complexe plu stable ayant une forte absorption à 700 nm qui est le complexe $(Fe^{3+})_4 [Fe^{2+}(CN)_6]_3$.

4.3. Etude chromatographique de l'extrait préparé

- **Chromatographie sur couche mince analytique (CCM)**

L'analyse par CCM montre la présence de deux taches dans les deux extraits éthanolique et méthanolique, ce qui peut être expliquer par la probabilité de présence des acides phénols et de coumarine dans les deux extraits, ce qui explique la tâche bleue qui est apparue dans le chromatogramme sous la lumière UV à 365 nm [1]. La confirmation est

réalisée par l'ajout de permanganate de potassium (KMNO_4) à 1% qui provoque le changement de la couleur des taches obtenues. Les valeurs des rapports frontales éthanolique et méthanolique respectivement ($R_{f1} = 0.95$), ($R_{f2} = 0.94$) sont voisines de 1 ce qui explique la solubilité de l'extrait dans l'éthanol et le méthanol.

5. Activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de la Cannelle obtenus montrent que les germes *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* ne sont pas sensibles à l'extrait avec un $D = 6-7$ mm, alors que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ont un effet contre l'extrait aqueux avec un $D = 8-12$ mm. Par ailleurs, l'inhibition de la croissance bactérienne décroît avec l'abaissement de la concentration de l'extrait aqueux. Plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antimicrobienne tels que : le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, le type de l'extrait et particulièrement la concentration car d'après les résultats obtenus plus la concentration de l'extrait est élevée plus le pouvoir inhibiteur est important.

6. Analyse spectroscopique

- Spectroscopie ultra-violet /vis (UV/Vis)

L'échantillon a été dissous dans l'eau à 10^{-4} M, puis en faisant un balayage sur un intervalle de 200 à 800 nm. Nous avons obtenu un graphe qui montre l'apparition de deux bandes ; une qui absorbe entre 200 et 230 nm et l'autre entre 250 et 365, probablement en faveur de la présence des flavonoïdes.

Conclusion

Conclusion

La cannelle de chine en tant que source d'antioxydant phénolique est utilisée dans le traitement de diverses pathologies telles que les infections gastro-intestinales, bronchites, grippe et infections tropicales.

Notre étude a montré que l'extrait éthanolique de la cannelle de chine est riche en composés phénoliques tels que les flavonoïdes, tanins hydrolysables, terpénoïdes, stéroïdes. De cette étude ressort que la macération par l'éthanol est la meilleure technique d'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

A cause de sa composition polyphénolique, nos tests réalisés ont montré que l'extrait possède une activité antioxydante importante *in vitro* et une inhibition très importante vis-à-vis du radical H_2O_2 , un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et un pouvoir réducteur important.

En outre, l'extrait éthanolique de poudre de la cannelle de chine a montré une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis des quatre souches bactériennes.

De même, il serait intéressant d'envisager l'utilisation de la cannelle en phytothérapie afin de lutter contre les maladies infectieuses et prévenir le stress oxydatif.

D'autres études concernant l'identification des polyphénols et le pouvoir antioxydant de la cannelle peuvent être réalisées par l'HPLC et DPPH, ainsi que l'activité antibactérienne des huiles essentielles de cette plante et des extraits vis-à-vis d'autres souches bactériennes sont nécessaires.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. S.Goswami.2013.Efficacy of cinnamomum cassia blume in age induced sexual dysfunction of rats.*Journal of young pharmacists*. 5(4):p148.
2. O. Senhaji.2006. Etude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle. *Phytothérapie*.1(4) :p24.
3. T. Cecchini, B.Ticli. 2003. Les plantes médicinales : reconnaître les plantes, faire des recettes, décoctions, onguents pour soigner et soulager les douleurs du quotidien .Vecchi S.A.Paris. p90.
4. F. Edet.2004. La cannelle de ceylan et ses activités biologiques. Thèse de doctorat : Pharmacie. Grenoble.
5. Aruna M. Siewert. Antibiotiques naturels : l'arme secrète de la nature. Médicis. p55.
6. I. Paul.2001. Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse. 2^{ème} édition .p82.Londres .
7. R. Benaraba . 2007. Insulino résistance et stress oxydant dans le syndrome m' métabolique : étude expérimentale des effets protecteurs de microconstituants nutritionnels (polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III).Thèse de doctorat : Environnement et santé. Grenoble.
8. R. sanago .2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Thèse de doctorat .Bamako.
9. R. Beliveau . 2010. Plus de cannelle moins de cancers ? .*Votre vie* .48(1) :p1.
10. G.Auric.1998. Le petit herboriste illustré : les 140 plantes médicinales d'Europe.GAC :p61.
11. J. Bruneton. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales .Lavoisier : Tec & Doc .3^{ème} édition : p166.
12. O.Senhaji et al.2005. Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. *Mycologie médicale*.15(4) :p220.
13. I. Paul. Des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Larousse : p84.
14. P.Cuenat . 2007. Les polyphénols en agroalimentaire. *Cron*. 39(2) :p94.
15. S.Achat . 2013 .Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques. Thèse de doctorat: Biologie. Bejaïa.

Références bibliographiques

16. E-Z.Nkhili . 2009 .Polyphénols de l'alimentation extraction, interaction avec les ions de fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat : Génie de l'environnement .Marrakech.
17. T. Rong .2010. Chemistry and Biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*.2:p1231.
18. J- J. Macheix et al.2005.Les composés phénoliques des végétaux. Lausanne.1^{ère} éd.
19. P. Sarni et al. Les polyphénols en agroalimentaires.TEC et DOC : p21.Paris.
20. K. Chira et al.2008. Les polyphénols du raisin. *Phytonutrition fondamentale*.6 :p75.
21. E. Middleton et al. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.*Pharmacol Rev*.52(4):p673.
22. M.Hadi .2004 .La quercétions et ses dérivés : molécules à caractères pro-oxydant ou capteurs de radicaux libis: études et applications thérapeutique. Thèse de doctorat: Pharmaco chimie.Strasbourg.
23. C.O'H.Mosjidis et al.1990. Developmental differences in the location of polyphenols and condensed Tannins in leaves and stems of service lespedeza, cuncata. *Annals of botany*.6 :p355.
24. M. Assad.2015.Fractionnement des complexes lignines – polyphénols polysaccharide issus de déférentes biomasses lignocelluloriques par esctrusion BI-VIS et séparation chromatographique. Thèse de doctorat : Sciences des agro ressources. Toulouse.
25. A. Rezaire.2012. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien oenocarpusbatoua (patawa).Thèse de doctorat : Phytochimie . Guyane.
26. S.Akroum. 2011. Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturel. Thèse de doctorat: physio-toxicologique. Constantine.
27. A-S.Dilipghosh. 2009. Vascular action of polyphenols. *Inter science* .53:p322.
28. M.S.AliShdayeh et al.1997. Antimicrobial activity of 20 plants used in Folkloric medicine in the Palestinian area. *Ethno-pharma cology*.60:p265.
29. M.Cowan .1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 19(4): p564.

Références bibliographiques

- 30.** M.Daglia M.2014. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*.23: p1.
- 31.** A. Favier .1997. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. 55(1) :p9.
- 32.** J. Delattre et al.2005.Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques.2^{ème} éd : TEC&DOC.
- 33.** A. Favier.2003.Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.p108.
- 34.** A. Philippe et al.2011.Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*. 8 (1) :p1.
- 35.** M. Albert et al.2003. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*.p91.
- 36.** F. J-A Gaascht.2013. Découverte, identification et caractérisation de molécules d'origine naturelle capables de cibler les voies de transduction, de prolifération, d'inflammation et de mort cellulaire dans des cellules cancéreuses. Thèse de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé : Lorraine
- 37.** C. Girotti-Chanu.2006.Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *microtea debilis*. Thèse de doctorat : Biochimie. Lyon.
- 38.** G. Meriem.2014.Effets antioxydants et anti-inflammatoires des extraits de *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria*. Thèse de doctorat : En Physiologie et Biochimie de la Nutrition : Tlemcen.
- 39.** F. Pourmorad et al.2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Biotechnology* .5 (11) :p1142.
- 40.** B. Robert et al.2006.Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences* .22 :p266.
- 41.** M. Ronald .2011. Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle central de l'osmoregulation. Thèse de Doctorat : *Neurosciences* : Paris.

Références bibliographiques

42. J. Guillaume.2008.Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la physiopathologie canine. Thèse de doctorat : vétérinaire : Lyon.
43. E. H'O,Okwu et al. 2005. Phytochemical constituents of some nigerian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*4(7): p685.
44. Q. Muhhammad et al. 2013. Phytochemical screening of tamarixdioica. *Ex roch. Pharmacy research.* 7: p181.
45. S. McDonalds et al. 2011. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry.*73:p73.
46. F. Pourmorad et al. 2006. Antioxydant activity, phenol and flavonoids contents of some selected Iranianmedecinal plants. *Afr. J. biotechnol.*, 5(11):p1142.
47. M Julien et al. 2012 Classification et influences des polyphénols du bois de chêne sur la qualité sensorielle des vins (application des procédés Oakscan).Thèse de doctorat : Déontologie : Bordeaux
48. M. Wichtl et al .2003.Plantes thérapeutiques.2^{ème} éd. p 692.Paris.
49. F.Oumar Ouattara .2005.Traitement traditionnelle des infections sexuelles transmissibles au mali : étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Annona senegalensis* L .(ANNONACEAE) et de *Stachytarpheta angustifolia* VALH.(VERBENACEAE).Thèse de doctorat :Pharmacie : Bamako
50. A.Basli et al .2012.activité antibacterienne des polyphenols extrait d'une plante medicinale de la flore d'algerie .*Origanum glandulosum* Desf ;*phytotherapie* .10 :p2.
51. C. E-Kalamouni.2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat : Sciences des Agroressources. Toulouse.
52. Chang et al.2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102 : p771.
53. J.Hadj Salem .2009. Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoides de *nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat : Lorraine.

Références bibliographiques

- 54.** F.Kahlouche-Riachi .2014. evaluation chimique et activite antibacterienne de quelques plantes médicinales d'Algérie. Thèse de Doctorat. Constantine.
- 55.** S. Krimat et al.2014. Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *Coastal Life Medicine*.2(6):p478.
- 56.** B. Lillian et al. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *Campus de Santa Apolónia*.855:p1172.
- 57.** N. Chelli-Chentouf et al.2015. Effect of *Mentha viridis* L. extracts on Pathogenic Bacteria Adhesion. *Natural Remedies*. 10(2):p15.
- 58.** M. Masoumeh et al.2013. Evaluation of phytochemical and antioxidant activities from different parts of *Nasturtium officinale* R. Br. in Mazandaran. *Iranian Journal of Plant Physiology*. 3 (2): p 659.
- 59.** Parajuli et al.2012.antioxydant activity,total phenol and flavonoid contents in some selected medicinal plants of Nepal.*JHAS*.2(1):p27.
- 60.** P. Marie-Cécile .2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat : Science : Lausanne.
- 61.** L. Imène.2012. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. *Nature & Technologie*.9 :p44.

Résumé

Ce travail a eu pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait alcoolique de la Cannelle de chine (*Cinnamomum aromaticum*). L'extraction a été réalisée par macération. Le rendement d'extraction éthanolique des broyats de la cannelle est estimé à 6.70%. L'activité antioxydante a été évaluée par le dosage de H₂O₂ et le pouvoir réducteur. Par ailleurs, l'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'analyse qualitative des extraits par la chromatographie sur couche mince (CCM) a indiqué la présence des acides phénols et de la coumarine. L'estimation de la concentration des phénols totaux a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu avec une valeur de 1g AGE/g d'extrait, et celle des flavonoïdes par la méthode calorimétrique de AlCl₃ et donné une valeur de 99.7 mgQE/g d'extrait. Les micro-organismes examinés (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) ont révélés une sensibilité vis-à-vis de la Cannelle avec un D = 9-12mm. L'étude peut être complétement par le test de DPPH et HPLC.

Mots clés : *Cinnamomum aromaticum* ; extrait alcoolique ; flavonoïdes ; activité antimicrobienne ; activité antioxydante.

Abstract

This work aimed to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of alcoholic extract of China Cinnamon (*Cinnamomum aromaticum*). The extraction was carried out by maceration. The ethanol extraction yield of cinnamon shredded is estimated at 6.70%. The antioxidant activity was evaluated by the H₂O₂ titration test and the reducing power. Furthermore, the antimicrobial activity was evaluated by the Agar diffusion method. Qualitative analysis of extracts by thin layer chromatography (TLC) indicated the presence of phenolic acids and coumarin. The estimate of the concentration of total phenols was achieved by the Folin-Ciocalteu method with a value of 1g AGE / g of extract, and the flavonoids by the calorimetric method of AlCl₃ and given a value of 99.7 mgQE / g of extract. The microorganisms tested (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) have revealed a sensitivity against Cinnamon with a D = 9-12mm. The study can be complemented by the DPPH test and HPLC.

Keywords: *Cinnamomum aromaticum*; alcoholic extract; flavonoids; antimicrobial activity; antioxidant activity.