

UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologie Végétale

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE LA PLANTE Erythraea centaurium (L.) Pers DE LA
REGION DE M'SILA.**

ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'ESPECE ETUDIEE.

Par

Sarra CHABANE

Devant le jury composé de :

Mme SAIDI F.	Pr., U.S.D. Blida 1	Présidente
Mme SMAIL-SAADOUN N.	Pr., U, Tizi Ouzou	Examinatrice
Mme KARA F / Z.	MCA., U.S.D. Blida 1	Examinatrice
Mme TAIL G.	MCA. U.S.D. Blida 1	Promotrice

Blida, Mai 2017

Remerciements

Je remercie chaleureusement madame TAIL G, ma directrice de mémoire, et je lui exprime toute ma reconnaissance de m'avoir accueillie dans son équipe avec gentillesse et bienveillance, ainsi que pour ses qualités pédagogiques et l'enthousiasme communicatif dont elle sait faire preuve.

Je remercie également Professeur SAIDI F, chef d'option, qui nous a offert l'opportunité de réaliser un tel travail de recherche ainsi que pour tous ses encouragements.

Je remercie profondément Docteur BOUDJLLEL A, Maître de conférences au département de biologie de l'université de M'Sila, pour avoir dirigé ce travail tout en me laissant libre dans mes choix.

J'aimerais également remercier le Professeur SMAIL-SAADOUN N, Université de Tizi Ouzou, le Docteur KARA F/Z. maître de conférences au département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Université SAAD DAHLEB Blide, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes sincères remerciements vont au chef de laboratoire du département de Biologie, Université de M'Sila monsieur SEGHIRI Kamel pour leur aide et conseil tout le long de ce travail

J'adresse également mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet : BAALI F, BECISSA O.

Dédicace

A celle qui m'a mis au monde.

*A celle qui ma offert un soutien inconditionnel durant
toute ma vie*

A ma chère maman

Que Dieu nous la garde toujours heureuse.

*A celui qui ne se fatigue jamais pour nous apporter la
joie.*

A mon cher père

*A mon frère Khadir et tous mes autres frères et
ma soeur*

A tous ceux qui n'ont pas été cité amicalement

Sarra

RESUME

L'objectif de notre présente étude porte sur la valorisation d'une plante médicinale issue de la biodiversité végétale de la région du Hodna. Une étude bibliographique ethnobotanique a montré que l'espèce *Erythraea centaurium* (L.) Pers est indiqué comme agent anti-inflammatoire, antipyrétique, analgésique et antioxydant.

L'extraction de différentes fractions (extrait aqueux, éthanolique et n-butanolique) de la partie aérienne de la petite centaurée a été accomplie par différents protocoles expérimentaux.

L'analyse phytochimique qualitative réalisée par les tests préliminaires et la chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits a confirmé la présence de plusieurs molécules tels que : les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins.

L'évaluation quantitative du contenu en polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de la plante indique la présence de teneurs variables en ces composés.

Les données expérimentales de la toxicité chez les rats Albinos Wistar suggèrent de classer *Erythraea centaurium* (L.) Pers dans la catégorie des plantes légèrement toxique par voie orale, Certains paramètres biochimiques liés à la fonction hépatique ont été perturbé. L'observation histologique s'est caractérisée par de légères altérations structurales du foie, des reins et du cœur.

L'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers a indiqué que l'extrait éthanolique de la plante présente la plus grande activité antioxydante.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers a révélé que les extraits sont non actif sur les champignons. Les extraits éthanolique et n-butanolique possèdent un pouvoir antibactérien dose dépendant sur les souches testées.

Nos résultats indiquent également que les extraits de la plante possèdent une faible activité antipyrétique et une activité analgésique très significative de la fraction n-butanolique de la petite centaurée

Mots clés : *Erythraea centaurium*(L.) Pers, Extraction, Analyse qualitative et quantitative, Etude toxicopharmacologiques,.

ABSTRACT

An ethnobotanical bibliographic study showed that the species *Erythraea centaurium* (L.) Pers widely used in traditional medicine in Algeria, particularly in the region of M'Sila: is indicated as an antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant agent.

The extraction of different fractions (aqueous, ethanolic, n-butanolic extracts) of the aerial parts of common centaury was accomplished with several experimental protocols.

The qualitative analysis of different extracts allowed to highlight many secondary metabolites classes. Furthermore, the quantitative analysis showed the presence of variable total polyphenols and flavonoids concentrations.

The pharmacological properties of the studied plant species indicate a notable analgesic and antioxidant activity, as well as a significant antibacterial and antipyretic activity. The absence of toxic effects is confirmed thanks to the biochemical dosage general observation and the histological study of the rats' organs after the sacrifice.

Keywords: *Erythraea centaurium* (L.) Pers, Extraction, Qualitative and quantitative analysis, Toxicopharmacological study.

ملخص

تهدف الدراسة التي قمنا بها إلى تقييم نوع من النباتات الطبية المميزة لمنطقة الحضنة.

البحث في عديد المراجع الاثنوبوتانية اظهر أن النبتة *Erythraea centaurium* (L.) Pers تستخدم كمضاد للالتهاب, خافض للحرارة, مسكن للألم و مضاد للأكسدة.

مجموعة من البروتوكولات التجريبية تم القيام بها من اجل الحصول على مستخلصات مختلفة: مستخلص مائي, مستخلص اثنولي, مستخلص – بوتانولي للجزء الأخضر (الهوائي) للنبتة.

الدراسة الفيتوكيميائية النوعية التي اجريناها من خلال الاختبارات الاولية و الكروماتوغرافيا (س س م) اكدت وجود مركبات مثل البوليفينول، الفلافونويد والعفص.

التقييم الكمي لمحتوى البوليفينول الإجمالي و الفلافونويد في مختلف مستخلصات النبتة يدل على وجودها بتراكيز متفاوتة.

المعطيات التجريبية لسمية النبتة على الجرذان البيضاء " البينوس" تسمح بتصنيف *Erythraea centaurium* (L.) Pers ضمن النباتات ذات السمية المنخفضة اذا استهلكت عن طريق الأكل, ما يؤدي إلى التغير في بعض المقاييس البيوكيميائية المتعلقة بوظيفة الكبد. أما الدراسة المجهرية على مستوى الأنسجة فقد اظهرت تضرر بسيط على مستوى بنية الكبد, الكلى و القلب. اظهر المستخلص الاثنولي مقارنة مع بقية المستخلصات سابقة الذكر أعلى نشاط مضاد للاكسدة.

تقييم فاعلية مضادات الميكروبات لمختلف مستخلصات النبتة أكد عدم نشاطها على الفطريات. أما المستخلصات الاثنولية و البوتانولية فلها فاعلية الجرعة ضد السلالات البكتيرية المستعملة.

تشير النتائج أيضا إلى أن مستخلصات النبتة *Erythraea centaurium* (L.) Pers لها نشاط قليل كخافض للحرارة ولكن بالمقابل المستخلص البوتانولي يتميز بنشاط عالي كمسكن للألم.

الكلمات المفتاحية: *Erythraea centaurium* (L.) Pers، الاستخلاص، التحليل الكمي والكيفي، دراسة السمية.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	
RESUME	
LISTE DES ABREVIATIONS, FIGURES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION.....	12
Chapitre 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
1. Présentation de la plante d'étude.....	15
1.1. <i>Erythraea centaurium</i> (L.) Pers.....	15
1.2. Systématique	16
1.3. Description botanique	16
1.4. Composition chimique	17
1.5. Utilisation de la plante.....	17
2. Métabolites secondaires.....	18
2.1. Grands groupes de métabolites secondaires.....	19
2.1.1. Composés phénoliques.....	20
2.1.1.1. Acides phénoliques.....	20
2.1.1.2. Flavonoïdes.....	20
2.1.1.3. Tanins.....	21
2.1.2. Alcaloïdes.....	22
2.1.3. Terpènes.....	22
3. Etude toxicopharmacologique.....	23
3.1. Toxicité des plantes	23
3.2. Activité antioxydante.....	23
3.3. Activité antimicrobienne.....	23
3.4. Activité antipyrétique.....	24
3.4.1. Température corporelle, la fièvre, l'hyperthermie	24
3.4.2. Action des antipyrétiques	24
3.5. Activité analgésique.....	26
3.5.1. Douleur	26
3.5.2. Action analgésique.....	26
Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES.....	28
1. Etude ethnobotanique.....	28
1.1. Présentation de la zone d'étude.....	28
1.1.1. Localisation géographique.....	28
1.1.2. Climat de la région.....	29
1.1.3. Climagramme d'Emberger.....	30
1.2. Choix de la plante.....	32

2. Matériel.....	33
2.1. Matériel biologique.....	33
2.1.1. Matériel végétal.....	33
2.1.1.1. <i>Erythraea centaurium</i> (L.) Pers.....	33
2.1.2. Matériel animal.....	33
3. Méthodes.....	34
3.1. Étude morphologique	34
3.2. Coupes histologiques de la tige et de la feuille.....	34
3.3. Méthodes d'extraction.....	34
3.3.1. Extraction des huiles essentielles.....	34
3.3.2. Extraction au soxhlet.....	35
3.3.3. Extraction par infusion.....	35
3.4. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits.....	38
3.4.1. Criblage phytochimique de quelques substances bioactives.....	38
3.4.2. Séparation chromatographique des extraits sur couche mince (CCM).....	39
3.4.3. Dosage des phénols totaux.....	42
3.4.4. Dosage des flavonoïdes.....	43
3.5. Etude toxicopharmacologique d' <i>Erythraea centaurium</i> (L.) Pers	44
3.5.1. Test de toxicité.....	44
3.5.1.1. Dosages biochimiques sanguin après sacrifice des animaux.....	45
3.5.1.2. Coupes histologique des organes	47
3.5.2. Test des activités biologiques.....	48
3.5.2.1. Activité antioxydante : test au DPPH.....	48
3.5.2.2. Activité antimicrobienne et antifongique.....	49
3.5.2.3. Activité antipyrétique.....	50
3.5.2.4. Activité analgésique.....	51
➤ Test de torsion (Writhing test).....	51
➤ Test de la plaque chauffante.....	53
4. Analyse statistique des résultats.....	54
Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	55
1. Choix de la plante d'étude <i>Erythraea centaurium</i> (L.) Pers	55
2. Etude morphologique et anatomique de la plante	57
2.1. Etude morphologique.....	57
2.2. Etude anatomique.....	59
3. Rendements d'extractions.....	61
4. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits.....	63
4.1. Screening phytochimique.....	63
4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	65
4.3. Dosage des polyphénols totaux.....	68

4.4. Dosage des flavonoïdes.....	70
5. Etude toxicopharmacologique.....	71
5.1. Test de toxicité.....	71
5.2. Activité antioxydante.....	79
5.3. Activité antimicrobienne.....	81
5.4. Activité antipyrétique.....	85
5.5. Activité analgésique.....	86
5.5.1 Test de torsion (Writhing test).....	86
5.5.2. Test de la plaque chauffante.....	88
DISCUSSION GENERALE	90
CONCLUSION	94
REFERENCES	
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

AC	Acide
AG	Acide gallique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ATCC	American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)
AU	Acide urique
Bil	Bilirubine
CCM	Chromatographie sur couche mince
CL ₅₀	Concentration létale de 50% de la population
COX	Cyclo-oxygénases
Créa	Créatinine
Da	Dalton
DL ₅₀	Dose létale de 50% de population
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DNPH	Dinitrophénylhydrazine
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
E	Extrait
E-Aq	Extrait aqueux
E-BuOH	Extrait n-butanolique
EC ₅₀	Efficient concentration 50
E-EtOH	Extrait éthanolique
EQ	Equivalent Quercétine
ET	Ecart type
G	Grossissement
GAE	Equivalent acide gallique
HE	Huile essentielle
IC ₅₀	Concentration inhibitrice de 50 % des radicaux libres
IFC	Facteur de consensus d'informateurs
MS	Matière sèche
NA	Non active
nm	Nanomètre

OMS	Organisation mondiale de la santé
PAL	Phosphatase alcaline
P.C	Poids corporel
PGD ₂	Prostaglandine D
PGE ₂	Prostaglandine E
PGF ₂	Prostaglandine F
Ph.Eur	Pharmacopée Européenne
R	Rendement
RF	Rapport frontal
TAX	Thromboxane
TGO	Transaminase glutamate oxaloacétate
TGP	Transaminase glutamate purivate
UV	Valeur d'utilisation
µg	Microgramme
µl	Microlitre

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 :	<i>Erythraea centaurium</i> (L.) Pers.	17
Figure 1.2 :	Structure de l'acide caféique.	20
Figure 1.3:	Structure de base d'un flavonoïde.	21
Figure 1.4:	Unité de base du terpène.	22
Figure 1.5 :	Physiologie de la fièvre.	25
Figure 1.6:	Inhibition des cyclo-oxygénases.	27
Figure 2.1:	Localisation géographique de la Wilaya de M'Sila.	28
Figure 2.2 :	Diagramme ombrothermique de la région de M'Sila en 2014	29
Figure 2.3 :	Climagramme d'Emberger de la région de M'Sila (1988-2016)	31
Figure 2.4 :	Extraction, identification, toxicité et activités biologiques des différents extraits de la partie aérienne d' <i>Erythraea centaurium</i> (L.) Pers.	37
Figure 2.5 :	Schéma de la transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive.	48
Figure 3.1 :	Aspect morphologique d' <i>Erythraea centaurium</i> (L.) Pers.	58
Figure 3.2 :	Différentes couches cellulaires de la tige.	60
Figure 3.3 :	Coupe transversale de la partie centrale de la feuille.	60
Figure 3.4 :	Chromatogramme de l'extrait n-butanolique, Acide Gallique et Quercétine.	68
Figure 3.5 :	Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique.	69
Figure 3.6 :	Courbe étalonnage de la Quercétine.	70
Figure 3.7 :	Variation des valeurs de la masse relative des organes des rats.	75
Figure 3.8 :	Coupes histologiques du foie chez les rats traités à différentes doses.	76
Figure 3.9 :	Coupes histologiques du rein chez les rats traités par la dose 500mg/kg de poids corporel.	77
Figure 3.10:	Coupes histologiques du cœur chez les rats traités à différentes doses.	78
Figure 3.11 :	Antibiogramme.	84
Figure 3.12 :	Activité antibactérienne de l'E-EtOH.	84
Figure 3.13 :	Activité antibactérienne de l'E-BuOH.	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 :	Position systématique de la petite centaurée.	16
Tableau 1.2 :	Quelques propriétés biologiques des quelques polyphénols.	19
Tableau 2.1 :	Données climatique de la Wilaya de M'Sila de l'année 2014	29
		30
Tableau 2.2 :	Quotient pluviothermique d'Emberger de la région de M'Sila (1988-2016)	
Tableau 2.3 :	Réactifs spécifiques et réactions positifs du criblage phytochimique.	38
Tableau 2.4 :	Systèmes solvants utilisés dans le séparations CCM.	40
Tableau 2.5 :	Composés phénoliques identifiés par CCM.	41
Tableau 2.6 :	Traitement des rats de la toxicité.	44
Tableau 2.7 :	Classes de toxicité selon l'échelle de Hodge et Sterner (1943).	45
Tableau 2.8 :	Traitement des rats de l'activité antipyrétique.	51
Tableau 2.9 :	Traitement des rats de l'activité analgésique (Test de torsion).	52
Tableau 2.10 :	Traitement des rats de l'activité analgésique (Test de plaque chauffante).	53
Tableau 3.1 :	Quelques domaines d'indication thérapeutique issu de la base de données PHARMACOPEE.	55
Tableau 3.2 :	Liste de quelques plantes utilisées dans le traitement de l'inflammation.	56
Tableau 3.3 :	Rendements des extraits obtenus.	62
Tableau 3.4 :	Résultats du Screening phytochimique de l'extrait aqueux.	64
Tableau 3.5 :	Résultats de la CCM des extraits éthanolique et n-butanolique.	66
Tableau 3.6 :	Teneurs en phénols totaux de la petite centaurée.	69
Tableau 3.7 :	Teneurs en flavonoïdes de la petite centaurée.	71
Tableau 3.8 :	Evaluation de la toxicité de l'extrait aqueux d' <i>E. centaurium</i> (L.) Pers sur Les rats.	72
Tableau 3.9 :	Paramètres biochimiques après sacrifice des rats.	73
Tableau 3.10 :	Activité antioxydante des extraits de la plante d'étude.	80
Tableau 3.11 :	Activité antimicrobienne des extraits.	81
Tableau 3.12 :	Effet des différents traitements sur la fièvre induite par la levure	85

bière.

Tableau 3.13 : Effet des différents traitements sur la douleur induite par l'acide acétique.	86
Tableau 3.14: Effet des différents traitements sur la douleur induite par la plaque chauffante.	88

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'homme a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire [1].

Les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales, sont dues à la présence de centaines, voire de milliers de composés naturels bioactifs appelés : métabolites secondaires tels que les Huiles essentielles, les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoïdes... Ils font et restent l'objet de nombreuses recherches in vivo comme in vitro et ont de nombreuses activités pharmacologiques prouvées scientifiquement telles que : l'activité antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, antioxydante, antidiabétique, analgésique et antipyrétique [1] [2].

En Algérie, la recherche en ethnobotanique s'est intéressée aux plantes médicinales et à leurs usages. L'un des points essentiels de cette recherche, est d'avoir un contact étroit et permanent avec les herboristes et les tradipraticiens. L'enquête sur terrain rencontre plusieurs obstacles dont le plus important est le refus de communication de la part des détenteurs de l'information sur les plantes médicinales ; cette pharmacopée, n'est pas écrite et se transmet jusqu'à présent de génération en génération, chez les guérisseurs et herboristes uniquement par voie orale des connaissances et la pratique de l'art médical. Aujourd'hui, le résultat des enquêtes ethnobotaniques de différentes régions de l'Algérie (Est, Ouest, Centre et Sud) commence à voir le jour dans des revues nationales et internationales [3].

L'utilisation des plantes médicinales en Algérie, bénéficie de l'image d'une médecine douce car naturelle. Il faut pourtant être vigilant quant aux effets secondaires potentiels engendrés par la thérapie traditionnelle. En présence d'une substance inconnue, la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité qui apporte des renseignements

sur la marge thérapeutique, c'est à dire le rapport entre la dose active et la dose toxique pour l'espèce animale testée. Cette étude toxicologique vient renforcer l'étude pharmacologique quant à l'utilisation sans risque des plantes médicinales [4].

Les syndromes inflammatoires sont très fréquemment rencontrés en pratique courante. La réaction inflammatoire d'origine infectieuse ou non infectieuse peut entraîner un état de choc avec défaillance multi-viscérale qui engage le pronostic vital (décès dans 50% des cas). Ces affections qui englobent fièvre et douleur sont d'une très grande diversité et évoluent généralement vers la chronicité en l'absence d'un traitement complet et efficace d'où la nécessité de la recherche et de mise au point de médicaments anti-inflammatoires accessibles par tous [5].

Parmi les plantes médicinales, la petite centaurée ou l'*Erythraea centaurium* (L.) Pers qui fait partie des plantes à principes amers. Elle est aussi "herbe aux mille écus" [6]. Cette plante est indiquée essentiellement pour l'appétit, les troubles dyspeptiques. Dans la médecine populaire, elle est utilisée pour le diabète, comme anti-inflammatoire, antioxydant, antipyrétique et antalgique [7].

Le sujet de ce mémoire rejoint l'interrogation globale suivante : Est-ce que l'utilisation de la petite centaurée par la population du Hodna en tant qu'analgésique et antipyrétique est justifiée ? Si oui quelle classe de composé actif est responsable de ces activités ? Et est-ce que la plante peut présenter une toxicité lors de son utilisation ?

Pour répondre à cette interrogation, nous avons visé un double objectif pharmaco-toxicologique :

- Etude de la toxicité des extraits (infusé et n-butanolique) de la plante étudiée sur les rats wistar albinos.
- Evaluation des activités biologiques à savoir l'activité antipyrétique, analgésique, antioxydante et antimicrobienne.

Cette étude sera subdivisée en deux parties :

- Une recherche bibliographique où nous apportons des données générales sur *Erythraea centaurium* (L.) Pers.
- Une seconde partie dans laquelle nous apportons les méthodes utilisées, les résultats obtenus ainsi que leur discussion et nous finirons par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Présentation de la plante d'étude

1.1. : *Erythraea centaurium* (L.) Pers

La petite centaurée appartient à la famille des Gentianacées. Cette dernière comprend 100 genres et 1800 espèces, répartis sur l'ensemble des continents sauf dans l'Antractique [8]. En Algérie, la famille des Gentianacées renferme 4 genres: *Blachstonia*, *Cicendia*, *Exaculum* et *Centaurium* [9].

Le genre *Centaurium* est un genre à systématique difficile. Les espèces sont pour la plupart variables et reliées les unes aux autres par des formes intermédiaires de telle sorte qu'il est très difficile de savoir combien d'espèces véritables comptent ce genre. Il est largement répandu en Europe, à l'ouest de l'Asie et surtout dans le bassin méditerranéen [8].

La petite centaurée a fait l'objet de nombreuses controverses. La synonymie complexe qui lui est liée provient du fait que cette espèce a été découverte et décrite par des auteurs différents dans des régions différentes assez éloignées. En Algérie par exemple, l'espèce est connue sous le nom de *Centaurium umbellatum* (Gibb.) Beck ou *Erythraea centaurium* (L.) Pers [9], tandis qu'en Europe, elle porte le nom de *Centaurium erythraea* Rafn [10].

E. centaurium (L.) Pers est une espèce annuelle ou bisannuelle. Elle est largement répandue dans les broussailles, les pâturages humides et ensoleillés et les terrains sablon [11]. La période de récolte s'effectue lors de la floraison qui s'étale du mois d'Avril au mois de juin [12].

1.2. Systématique

La classification botanique de l'espèce *Erythraea centaurium* (L.) Pers est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 1.1 : Position systématique de la petite centaurée [9].

Domaine : Eukaryota	Ordre : Gentianales
Règne : Plantae	Famille : Gentianacées
Division: Magnoliophyta	Genre : <i>Erythraea</i>
Classe : Magnoliopsida	Espèce : <i>E.centaurium</i> (L.) Pers
Nom binomial : <i>Erythraea centaurium</i> (L.) Pers	
Nom vernaculaire algérien : Merarat el hanech, Quanttarium es saghir Français : Petite centaurée, herbe fièvre, herbe amère	

1.3. Description botanique

Erythraea centaurium (L.) Pers est une petite plante herbacée, mesurant de 10 à 50 cm de haut, elle est parfois réduite à un coussin plaqué au sol [12].

Le bouton floral est de couleur rose pale au moment de floraison (Fig 1.1). Les fleurs sont disposées dans le même plan [9]. La corolle est à tube cylindrique assez long resserré à son sommet. Les inflorescences sont en panicule corymbiforme dense [13][14]. Le calice à la floraison atteint tout au plus la demi-longueur du tube de la corolle, tandis que la capsule est plus longue que le calice [15].

Les tiges plus ou moins grêles garnies par des feuilles entières, sans pétiole [15].



Bouton floral fermé



Bouton floral ouvert

Figure 1.1 : *Erythraea centaurium* (L.) Pers (Original 2014).

1.4. Composition chimique

Les extraits d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers sont riches en polyphénols tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins [13]; ils contiennent aussi des terpènes et des alcaloïdes [14][16].

1.5. Utilisations de la plante

En médecine traditionnelle, *Erythraea centaurium* (L.) Pers est très utilisé en tant qu'antipyrétique, anti-inflammatoire [5], stomachique et digestifs [16]. Plusieurs études scientifiques ont prouvé son efficacité comme agent antihyperglycémiant, anti-inflammatoire, antioxydant, antipyrétique, analgésique, cicatrisant et diurétique [17][18][19][20].

2. Métabolites secondaires

Les plantes médicinales renferment des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions biochimiques ayant lieu dans l'organisme [2]. On distingue ainsi deux groupes de métabolites [21]:

- Les métabolites primaires : se sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules d'une plante pour y assurer sa survie (glucides, protéines, lipides et acides nucléiques).
- Les métabolites secondaires : se sont des molécules ayant une répartition limitée dans la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. ils sont divisés principalement en polyphénols, terpènes et alcaloïdes.

Les métabolites secondaires jouent plusieurs rôles sur les plans physiologiques, technologiques et nutritionnels. Ces multiples rôles sont en relation avec leurs structures chimiques d'où l'intérêt particulier accordé aux recherches sur ces métabolites (Tab 1.2) [22].

Tableau 1.2 : Quelques propriétés biologiques des quelques polyphénols [22].

Composés	Activités biologiques
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactérienne, antifongique, Antiparasitaire, Anti-ulcéreuse, Antioxydante.
Coumarines	Anti parasitaire, Antioœdémateuse, Anti-inflammatoire, Analgésique.
Flavonoïdes	Antibactérienne, Antiparasitaire, Antivirale, Antitumorale, Hypotenseur, Anti-inflammatoire, Analgésique, Anticarcinogène, Diurétique, Ostéogène, Antioxydante, Anti-atherogénique, Antithrombotique, Anti-allergique.
Anthocyanes	Protectrice, Capillaro-veineux, Antioxydante.
Tannins galliques et catéchiqes	Antioxydante.
Lignanes	Anti-inflammatoire, Analgésique
Saponines	Antitumorale, Anticancérigène.

2.1. Grands groupes de métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes, parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possède une très large gamme d'activités biologiques [23].

De façon générale, l'activité biologique, des composés phénoliques et spécialement les flavonoïdes, est très recherchée. Les flavonoïdes occupent une place très prépondérante dans le groupe des phénols. Ils sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses telles que anti-inflammatoire, vasodilatateurs,... [24].

2.1.1. Composés phénoliques

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits) [25]. Les principales classes des composés phénoliques sont: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines (Fig 1.6) [26].

2.1.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les végétaux et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique.

Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique (Fig 1.2), férulique et sinapique [27].

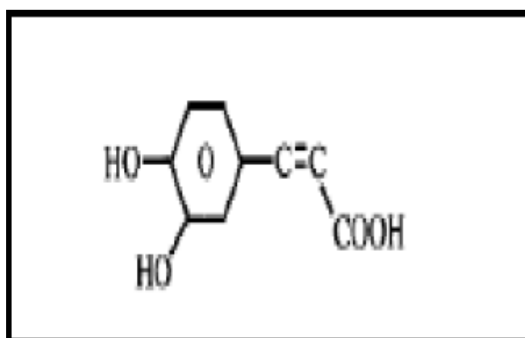


Figure 1.2 : Structure de l'acide caféique [27].

2.1.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires [28]. Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux. Ils sont rencontrés dans les fruits et les légumes, le thé, le café et dans plusieurs plantes médicinales utilisées comme remèdes en médecine traditionnelle dans le monde [29].

Ces composés dérivent de l'enchaînement benzo-γ-pyrone (Fig 1.3).

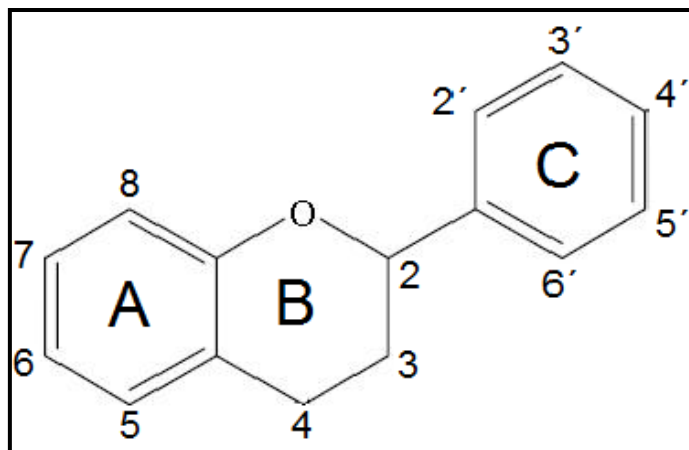


Figure 1.3: Structure de base d'un flavonoïde [29].

La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permet de distinguer les différentes classes de flavonoïdes [30] :

- Les flavonols.
- Les anthocyanidines (ou anthocyanidols).
- Les flavanols.

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones, de génines (entité dépourvue de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) [30].

Les flavonoïdes possèdent plusieurs activités biologiques, dont l'activité la mieux décrite est l'activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres: radicaux hydroxyles OH^\cdot , anions superoxydes $\text{O}_2^\cdot-$ et les radicaux peroxylipidiques. Ils ont aussi une action sur les vaisseaux sanguins en maintenant une perméabilité vasculaire normale [29]. Ils exercent une activité antidiabétique et hypotryglycémiant chez les animaux diabétiques [31].

2.1.1.3. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau. Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Dalton. On distingue deux grands groupes de tanins différents, à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [2].

2.1.2. Alcaloïdes

En général, ces composés possèdent au moins un atome d'azote hétérocyclique. Actuellement, la structure chimique d'environ 16 000 alcaloïdes est connue. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Ils ont une nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs [32].

2.1.3. Terpènes

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération de molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones dont l'unité de base est l'isoprène (Fig 1.4).

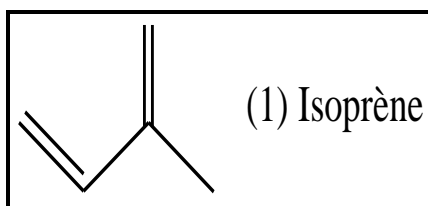


Figure 1.4 : Unité de base du terpène [34].

Les extraits de ces molécules sont employés comme condiment ou comme parfum. Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques $(C_5H_8)_n$. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien disposés en anneaux [33].

3. Etude toxicopharmacologique

3.1. Toxicité des plantes

Les effets toxiques d'une substance varient considérablement selon sa nature, l'organe cible et son mécanisme d'action. Ces effets constituent la résultante d'interactions biochimiques entre la substance toxique et/ou ses métabolites et les structures de l'organisme. Une meilleure connaissance de ces caractéristiques permet d'améliorer l'évaluation des risques potentiels pour la santé, et facilite le développement de mesures rationnelles dans la prévention et le traitement [35].

La toxicité s'exprime généralement par la dose qui provoque la mort de 50% des organismes vivants d'essai (DL_{50}), ou qui entraîne un effet néfaste mesurable sur 50% des organismes vivants, ou qui induit une réduction de 50% des réponses des organismes d'essai par rapport aux organismes témoins (non traité ou sain) [35].

3.2. Activité antioxydante

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par HALLIWELL, comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » [36]. C'est une molécule qui est capable de neutraliser les Espèce Réactive Oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres [37].

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants (Espèce Réactive Oxygène) et les antioxydants en faveur des premiers [38].

3.3. Activité antimicrobienne

La thérapeutique des infections bactériennes et fongiques se base principalement sur l'usage des antibiotiques et des antifongiques. La prescription à grande échelle de ces molécules a entraîné l'apparition de souches résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles molécules à base des plantes. Ces dernières sont constituées principalement de métabolites

secondaires, dont les composés phénoliques sont largement utilisés comme agents antimicrobiens en médecine populaire [39].

3.4. Activité antipyrétique

3.4.1. Température corporelle, fièvre ou hyperthermie

La température corporelle est une caractéristique de l'espèce, chez l'être humain, elle est régulée autour de 37°C avec de faibles variations interindividuelles (moins de 1°C). Elle est régulée par l'axe hypothalamique qui maintient l'équilibre des différentes réactions chimiques impliquées dans le fonctionnement de l'organisme [40].

La fièvre est une élévation de la température corporelle, le plus souvent en réponse à une invasion du corps par des microorganismes ou des éléments reconnus pathologiques. Elle correspond à une réponse physiologique complexe, qui implique une production de cytokines par les globules blancs. Ces derniers sont activés par le stimulus pyrogène et qui aboutit à une élévation de la température corporelle [41].

La fièvre diffère de l'hyperthermie qui est une élévation de la température corporelle non régulée, dans laquelle n'interviennent pas les cytokines et qui ne répond pas aux antipyrétiques habituels. Elle est due à la libération de protéines appelées les interleukines dans les liquides biologiques, ce qui règle le thermostat à un niveau supérieur à la moyenne. Lorsque le thermostat est ramené brutalement à son réglage normal grâce aux médicaments tels que l'aspirine ou le paracétamol, tous les mécanismes d'élimination de la chaleur se mettent en route (transpiration et vasodilatation).

3.4.2. Action des antipyrétiques

Les antipyrétiques sont des molécules qui bloquent ou inversent l'élévation de la température corporelle déclenchée par les cytokines pyrogènes [41].

La figure 1.5 indique les différents agents pyrogènes et les interleukines responsables du stimulus de l'hypothalamus qui déclenche une élévation de la température. L'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens par inhibition des prostaglandines provoque une diminution de l'hyperthermie.

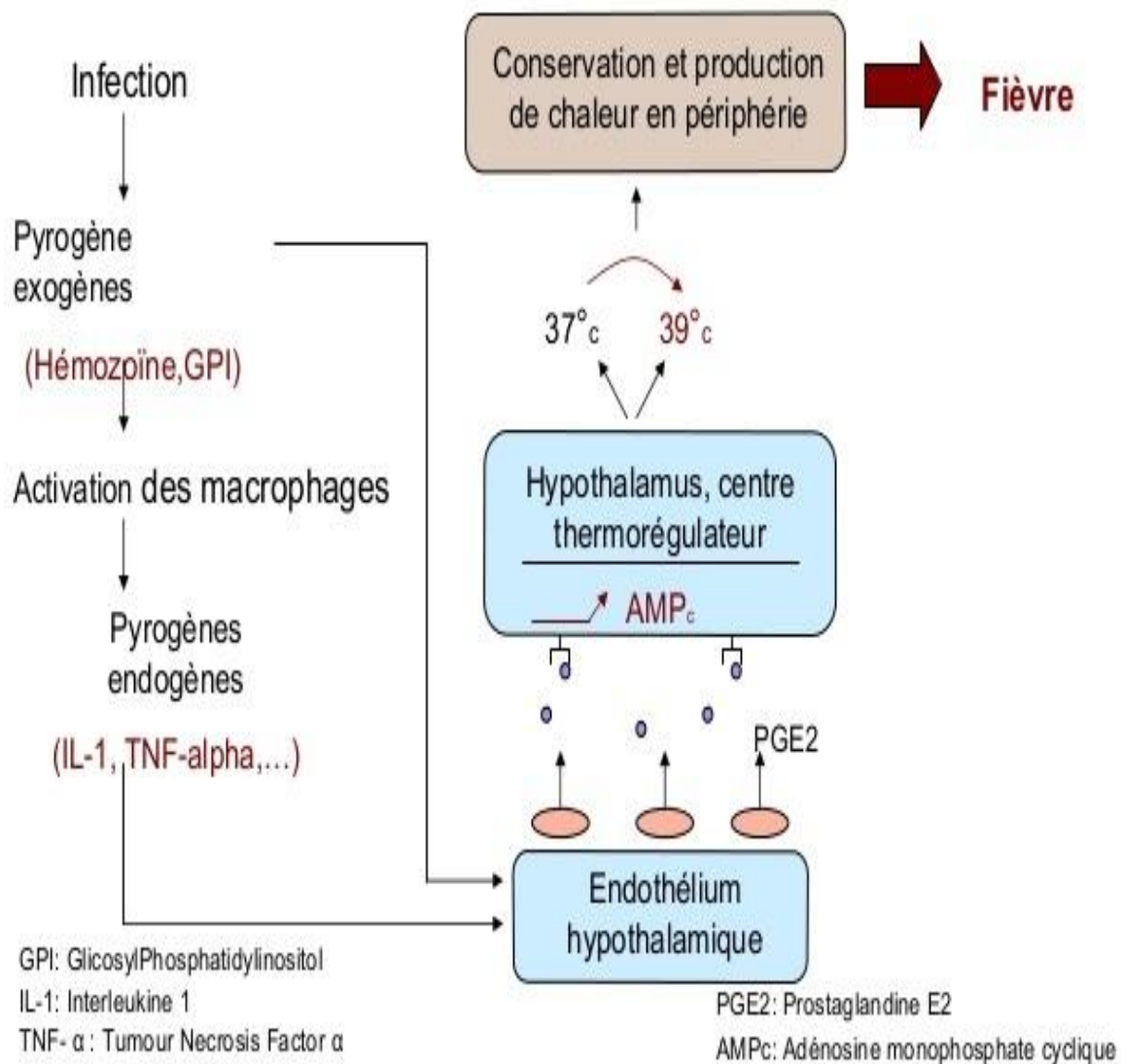


Figure1.5 : Physiologie de la fièvre [41].

3.5. Activité analgésique

3.5.1. Douleur

La douleur résulte des processus physiologiques complexes déclenchés lorsque les terminaisons nerveuses périphériques libres réagissent à des stimuli nociceptifs de natures diverses tels que les brûlures, les piqûres, les pincements, les compressions, agents algésiques de nature physique et chimique, les produits toxiques L'histamine, la bradykinine et les prostaglandines (PGE1, PGF) interviennent au cours du processus douloureux [40].

3.5.2. Action des analgésiques

Les analgésiques sont des médicaments à action symptomatique, qui atténuent ou abolissent les sensations douloureuses sans provoquer une perte de conscience, ou une dépression des autres sensations contrairement aux anesthésiques. Ils constituent une famille hétérogène du point de vue chimique et pharmacologique [41].

La famille des enzymes (Cyclo-oxygénases) COX est responsable du métabolisme de l'acide arachidonique en prostaglandine, une molécule instable qui est, à son tour, convertie en de nombreux autres composés inflammatoires qui sont impliqués dans les processus de la douleur.

Des études ont suggéré que le paracétamol peut inhiber les cyclo-oxygénases réduisant ainsi le niveau de la prostaglandine E₂ (Fig 1 .6) [42].

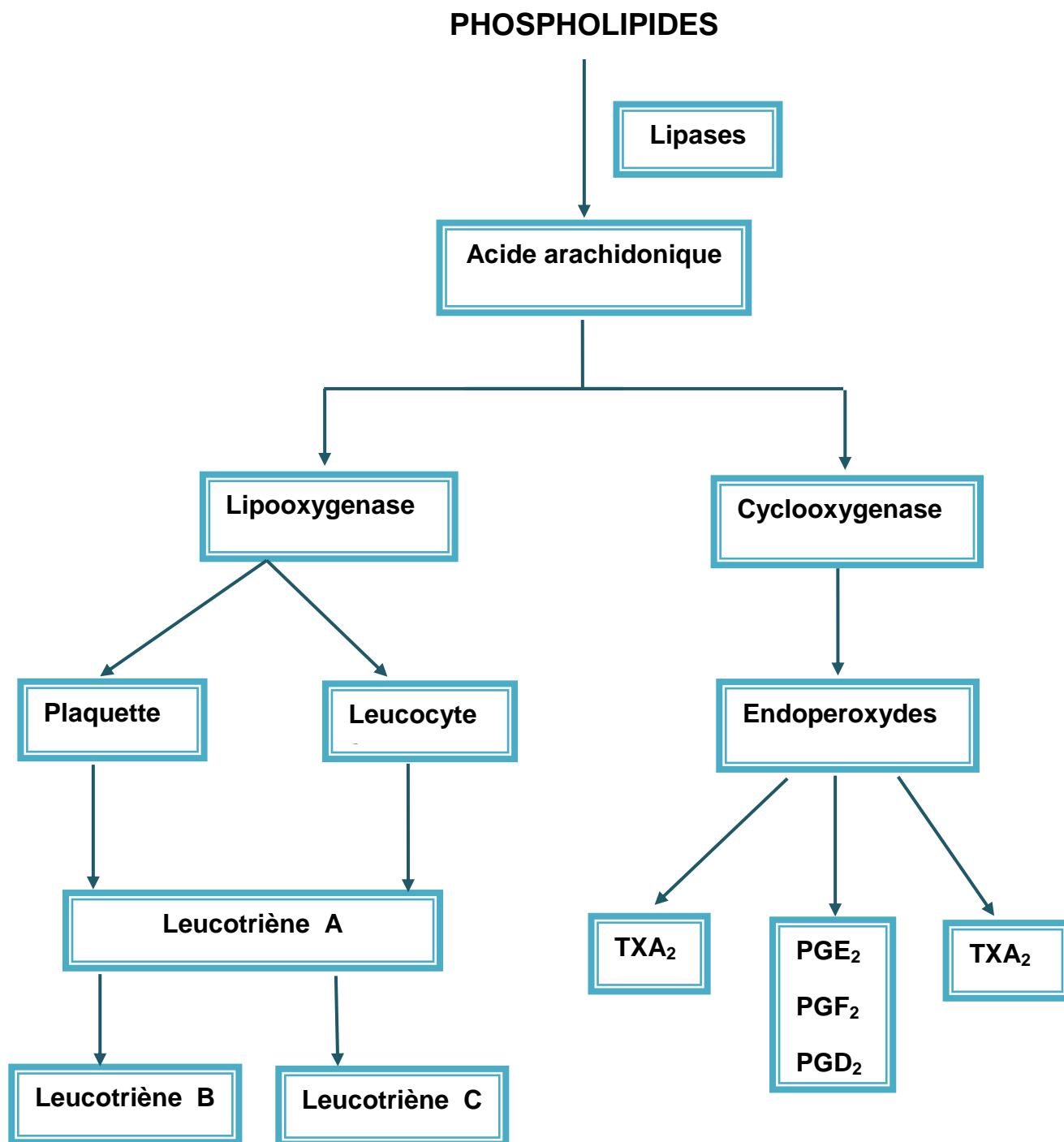


Figure 1.6 : Inhibition des cyclo-oxygénases [63].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

1. Etude ethnobotanique

1.1. Présentation de la zone d'étude

1.1.1. Localisation géographique

La Wilaya de M'Sila, dans ces limites actuelles, occupe une position privilégiée dans la partie centrale de l'Algérie du nord dans son ensemble, elle fait partie de la région des hauts plateaux du centre. Elle se situe à 35°40' latitude Nord et 04°30' longitude Est, sur une altitude d'environ 500 m. Elle est située au Sud Est d'Alger, limitée au Nord par les Wilaya de Médéa, Bordj Bou-Argeridj, Sétif et Bouira, à l'Ouest par Djelfa, à l'Est par Batna et au Sud par Djelfa et Biskra. Elle couvre pré de 18,175 Km² [43].

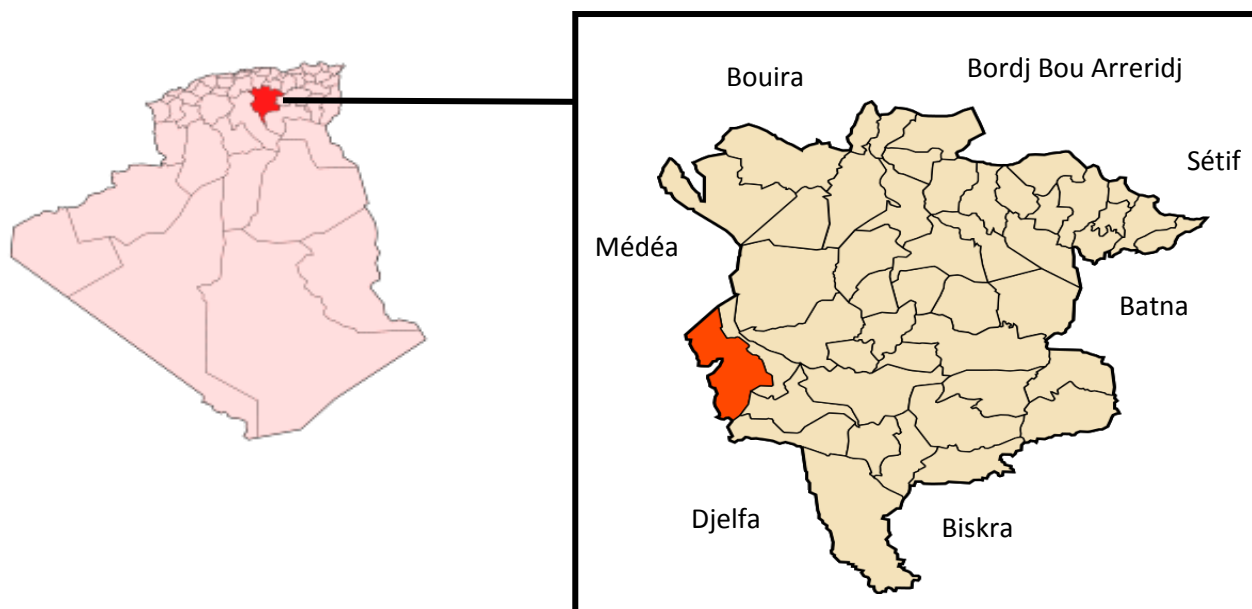


Figure 2.1 : Localisation géographique de la Wilaya de M'Sila [44].

1.1.2. Climat de la région

Le climat de la Wilaya est de type continental soumis en partie aux influences sahariennes. L'été y est sec et très chaud alors que l'hiver y est très froid.

Sur le plan pluviométrique, la zone la plus arrosée est située au nord ; elle reçoit plus de 480 mm par an, quant au reste du territoire, la zone la plus sèche est située à l'extrême sud de la Wilaya et reçoit moins de 200mm / an [43].

Les précipitations moyennes annuelles de la Wilaya en 2013 sont de 13,3 mm par an.

Les températures moyennes de l'année sont de 20°C, enregistré au mois plus chaud (Juillet) sont de 33,9°C, et le mois plus froid (Février) sont de 6,6°C (Tab 2.1) [43].

Tab 2.1 : Données climatique de la Wilaya de M'Sila de l'année 2014 [43].

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
T°C	9,6	11,5	12,8	19,7	23,2	27,6	31,8	32,5	28,1	22,1	15,4	9,1
Préc(mm)	20	7	19	0	50	11	6	0	13	2	27	13

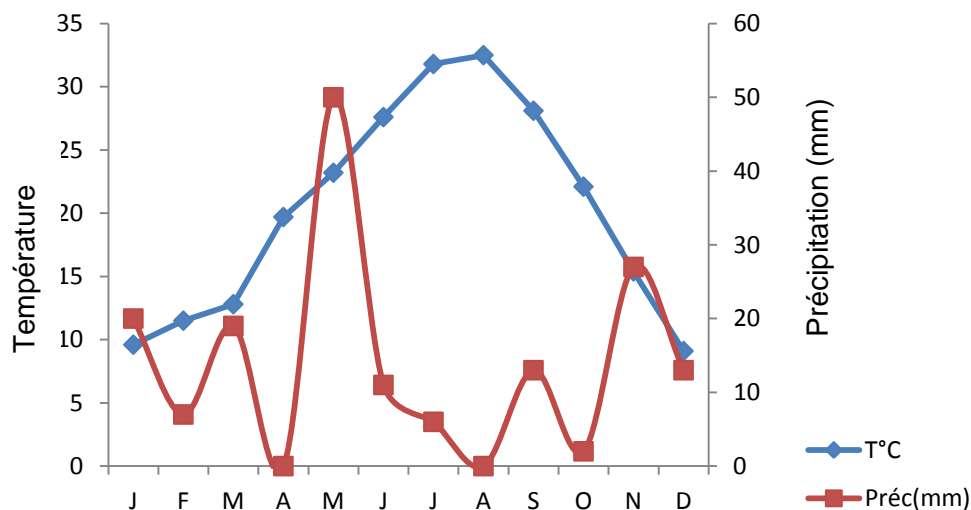


Figure 2.2 : Diagramme ombrothermique de la région de M'Sila en 2014 [43].

1.1.3.Climagramme d'Emberger :

Dans le but d'étudier les différents types de climat de la région méditerranéenne,

EMBERGER [45] a élaboré un Climagramme qui permet de déterminer l'étage bioclimatique d'une station donnée. Il est déterminé à partir de la formule:

$$Q_2 = 2000P / M_2 - m$$

Où :

- P : Précipitations moyennes annuelles (mm).
- M : Températures moyennes des maxima du mois le plus chaud (°C).
- m : Températures moyennes des minima du mois le plus froid (°C).

STEWART transforme cette équation, en l'adaptant avec le climat de l'Algérie comme suit [46]:

$$Q_3 = 3,43 \times P / (M-m).$$

Ici nous retenons la formule du Q_3 pour caractériser le climat de notre région d'étude.

Q_2 : quotient pluviothermique d'Emberger.

Q_3 : quotient pluviothermique modifié par Stewart (1968 ; 1975)

P : pluviométrie annuelle (mm).

M : moyenne maximale du mois le plus chaud(°C).

m : moyenne minimale du mois le plus froid(°C).

Le tableau 2.2 montre le résultat de l'application de la formule de STEWART.

Les valeurs indiquées dans le tableau nous permettent de situer la région de M'Sila dans le climagramme d'Emberger.

Tableau 2.2 : Quotient pluviothermique d'Emberger de la région de M'Sila (1988-2016) [43].

Caractéristique du climat de la région de M'sila

P (mm)	Mois le plus chaud	M (°C)	Mois le plus froid	m (°C)	Q3
197	Juillet	39	Janvier	3,7	54,71

La valeur du quotient d’Emberger Q_3 est de 54,71 et la température annuelle minimale est de 3,7°C°.

Ces deux valeurs positionnent la région de M’Sila dans l’étage bioclimatique semi-aride supérieur à hiver doux (figure 2.3).

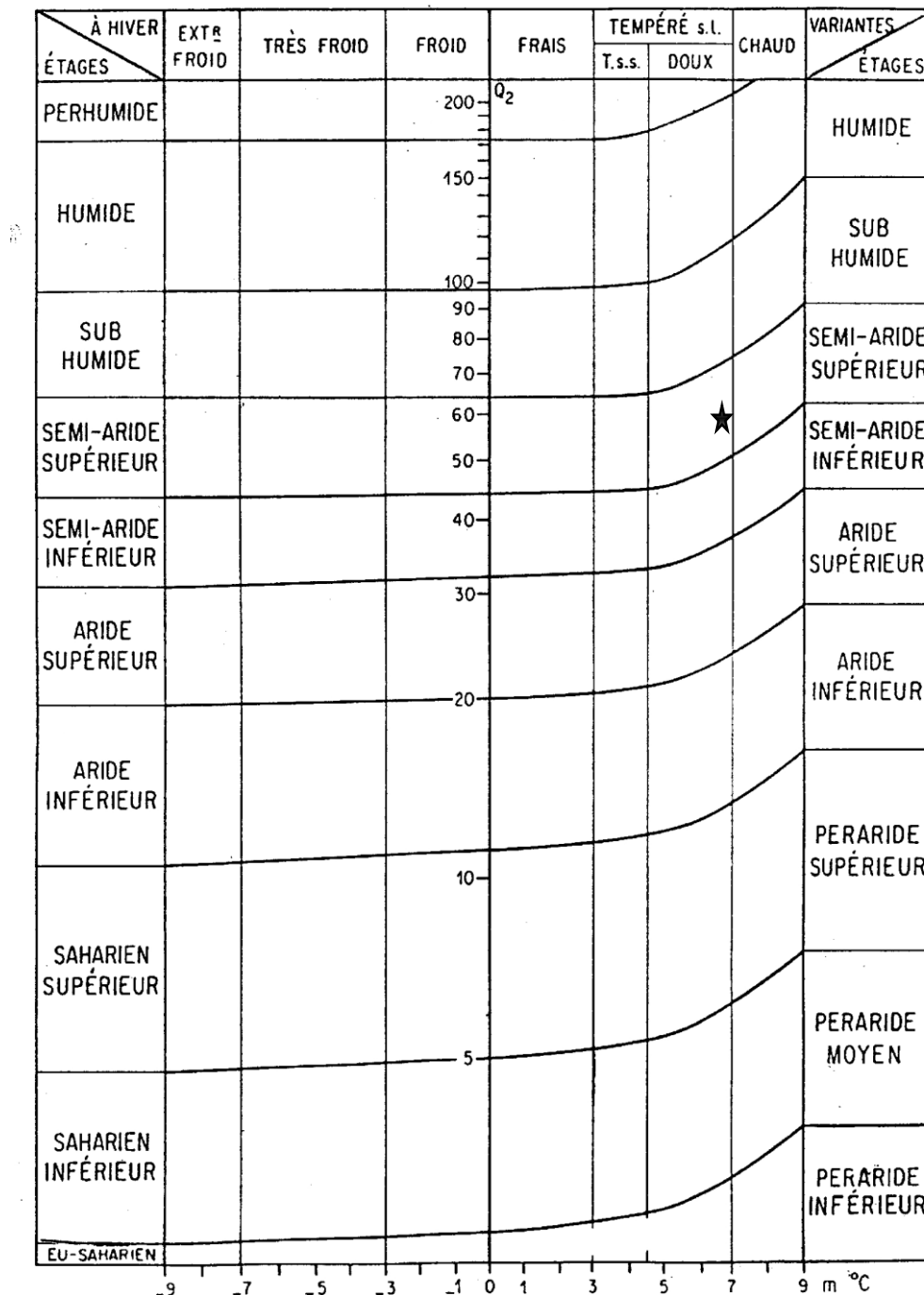


Figure 2.3 :_Climagramme d’Emberger de la région de M’Sila (1988-2016) [47].

1.2. Choix de la plante

Le choix de la plante est basé sur la consultation d'une base de données PHARMACOPEE des plantes médicinales de la région d'EL Hodna, qui existe au niveau du Département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mohamed Boudiaf de M'Sila. L'accès à cette base a permis la consultation de 1900 fiches questionnaires (Annexe 02). L'importance culturelle de la plante est déterminée par le calcul de quelques indices tels que : la Valeur d'Utilisation et le Facteur du Consensus d'Informateurs des plantes et de leurs utilisations.

- La valeur d'utilisation (UV) est calculée selon la formule suivante [5] :

$$UV = U/N$$

Où :

- U : Nombre de citation par espèce.
- N : Nombre d'informateurs.

- Le facteur de consensus d'informateurs (IFC), est l'indice qui permet d'évaluer la consistance de la connaissance des herboristes, il est basé sur les maladies qu'il traite et les plantes qu'il utilise. Un IFC élevé pour une catégorie donnée de maladies rend compte d'une tradition bien définie liée aux plantes médicinales associées à ces catégories de maladies. L'indice est calculé selon la formule suivante [48] :

$$IFC = \frac{Nur - Nt}{(Nur - 1)}$$

Où :

- Nur : Nombre d'indication pour un traitement donné.
- Nt : Nombre d'espèces impliquées dans cette même catégorie d'usage.

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Matériel végétal

2.1.1.1. *Erythraea centaurium* (L.) Pers

La plante a été récoltée pendant la période de floraison durant le mois de Mai 2014 dans la région Mdjedel, commune de Bou Saada, Wilaya de M'Sila. L'identification botanique a été faite par le Docteur SARRI Dj du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences, Université Mohammed Boudiaf, M'Sila.

En raison des confusions possibles entre les espèces du genre *Centaurium*, une étude morphologique et anatomique sur la plante fraîche a été réalisée.

Une étude anatomique a été réalisée au même laboratoire dans le but de spécifier les lieux de stockage des différents métabolites secondaires.

La partie aérienne a été lavée, séchée à l'ombre, puis broyée et conservée dans des sacs en papier jusqu'à son utilisation ultérieure dans les tests d'identifications phytochimiques, de toxicité et des activités biologiques.

2.1.2. Matériel animal

Des rats Wistar albinos mâles pesant entre 180 et 200 g ont été ramenés de l'Institut Pasteur d'Algérie (Centre d'élevage, Kouba, Alger). Ils ont été acclimatés aux conditions de l'animalerie pendant une semaine. Les animaux ont été alimentés avec le régime de croquette (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail, Bejaia) (Annexe 03), et de l'eau. Ils ont été maintenus aux conditions ambiantes de l'animalerie.

3. Méthodes

3.1. Étude morphologique

Les observations des différentes parties (fleur, tige, feuille) de la petite centaurée ont été effectuées à l'aide d'une loupe binoculaire avec différents grossissements.

3. 2. Coupe histologique de la tige et de la feuille

Des coupes histologiques ont été réalisées par la technique de la double coloration (Vert de Méthyle – Rouge Congo) [49] au niveau des feuilles et des tiges, considéré comme principale organe de stockage [50]. L'observation a été réalisée grâce à un microscope associé à une caméra (Motic Digital Microscope).

3.3. Méthodes d'extraction

Deux types d'extractions ont été réalisés lors de notre étude, une hydrodistillation et une extraction par solvants à différentes polarités.

3.3.1. Extraction des huiles essentielles

L'hydrodistillation au Clevenger est la méthode d'extraction des huiles essentielles (HE) adoptée au cours de notre expérimentation [51]. Cette technique courante permet de séparer les huiles essentielles à l'état pur et de fournir de meilleurs rendements. Pour cela, 50 g de la matière végétale sèche sont introduits dans un ballon contenant 500 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 4 h [52].

Le rendement en HE est déterminé par rapport à la matière végétale sèche. Il est calculé selon la formule suivante [53] :

$$R = \frac{VHE}{MMS} \times 100$$

Où :

- VHE: Volume d'HE (ml).
- MMS: Masse de la Matière végétale Sèche.

3.3.2. Extraction au soxhlet

L'extraction au Soxhlet est une méthode d'extraction en continue. Cette technique consiste à introduire 50 g du matériel végétal dans une cartouche en cellulose fixée sur un ballon, et surmontée d'un réfrigérant. 500 ml d'éthanol pur sont évaporés puis condensés tout en restant en contact avec le matériel végétal. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair [54].

L'extrait éthanolique (E-EtOH) obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre (Wattman N° 03) puis soumis à une évaporation à basse pression à 35 °C dans un rotavapor (Buchi 461).

L'extrait n-butanolique (E-BuOH) est obtenu par solubilisation de l'extrait éthanolique dans de l'eau chaude. L'extrait aqueux est soumis à trois lavages successifs avec du n-butanol [55].

3.3.3. Extraction par infusion

L'extrait aqueux (E-Aq) a été préparé selon la méthode traditionnelle ; environ 2 g de la poudre de la partie aérienne de la petite centaurée ont été dissoutes dans de 20 ml d'eau bouillante. L'infusé a été laissé refroidir pendant 15 min à température ambiante. Après filtration, le filtrat obtenu a été séché à sec [56].

Toutes les extractions ont été réalisées en triple. Le rendement de chaque extraction est calculé selon la formule suivante [54] :

$$R = \frac{pEX}{pMS} \times 100$$

Où :

- R= rendement.
- pEX= poids de l'Extrait Sec.
- pMS= poids de la Matière Sèche.

L'étude de la toxicité n'a concerné que l'extrait aqueux de la plante (E-Aq) pour vérifier son innocuité par l'utilisateur.

Les extraits EtOH et BuOH ont été conservés à 4°C pour les tests d'activités biologiques (antioxydante, antibactérienne et antifongique). Les extraits BuOH et Aq ont été utilisés pour l'évaluation des activités analgésique et antipyrétique (Fig 2.4).

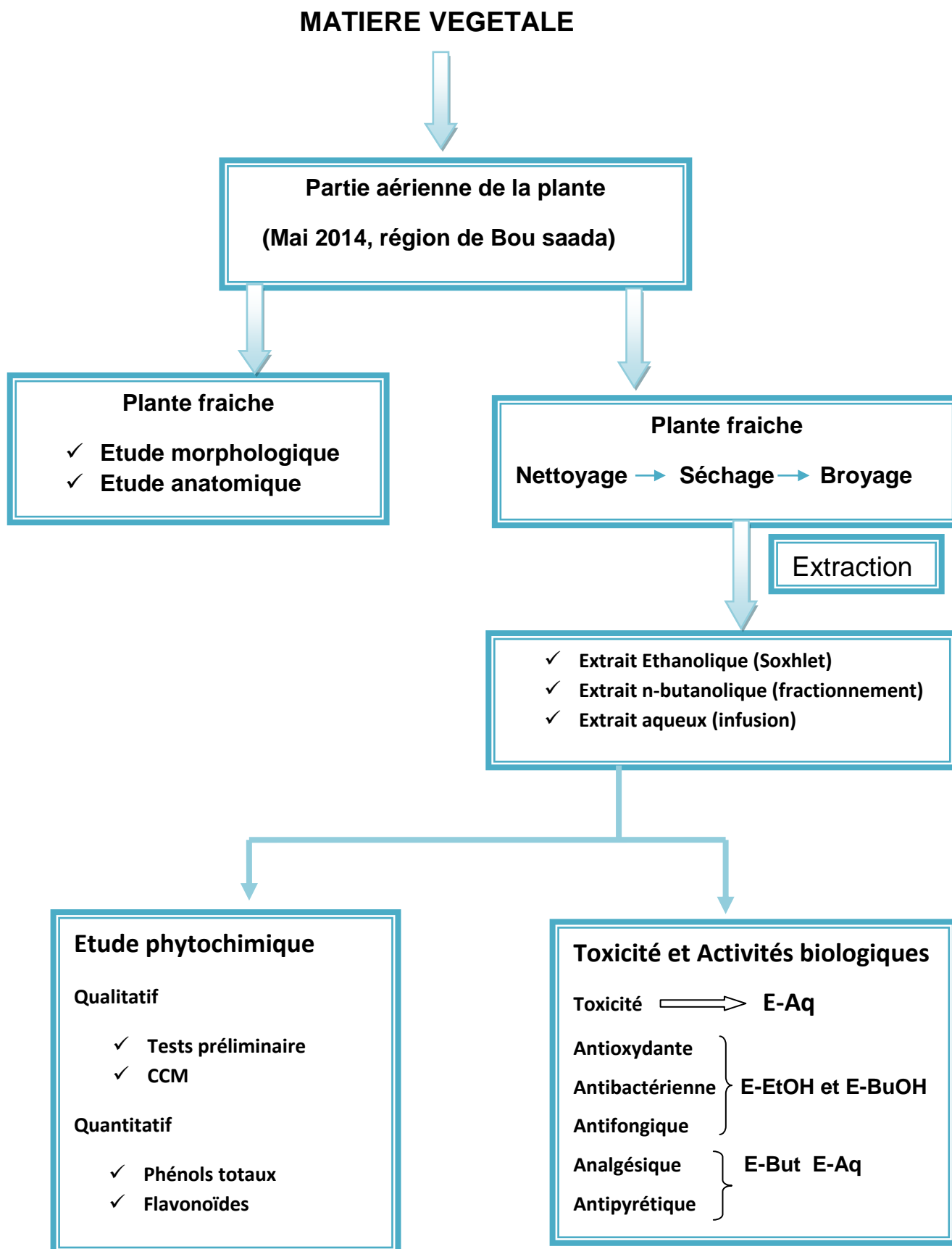


Figure 2.4 : Extraction, identification, toxicité et activités biologiques des différents extraits de la partie aérienne d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers.

3.4. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits

3.4.1. Criblage phytochimique de quelques substances bioactives

Les différentes analyses chimiques ont été effectuées par un criblage phytochimique. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. Le tableau 2.3 indique les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés (Annexe 05).

Tableau 2.3: Réactifs spécifiques et réactions positifs du criblage phytochimique.

Groupes chimiques	Réactifs et résultats positifs
Polyphénols	Acide chlorhydrique → Coloration rouge [57].
Flavonoïdes	Alcool chlorhydrique et copeaux de magnésium → Coloration rose-orangé [57].
Alcaloïdes	Mayer → Précipité blanc [58].
	Wagner → Précipité brun [58].
Tanins galliques	Chlorure de fer → Coloration bleu-noirâtre et précipité [59].
Tannins catéchiques	Chlorure de fer → Coloration bleu-verte [59].
Saponosides	Observation d'une mousse persistante (après agitation) [57].
Coumarine	Ammoniaque → fluorescence jaune [57].
Stérols et triterpènes	Anhydride acétique et chloroforme + d'acide sulfurique → Anneau rouge-brunâtre [59]

3.4.2. Séparation chromatographique des extraits sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode physico-chimique rapide de contrôle dont l'adsorbant ou phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme, appliquée sur un support. La phase mobile migre à la surface de la plaque par capillarité [60].

Pour l'analyse des extraits EtOH et BuOH, la silice 60 F254 Merck, 0,1 mm sur support d'aluminium (20 x 20 cm) a été utilisée comme phase stationnaire. Les plaques ont été déposées dans une cuve préalablement saturée par le système solvant. Ces extraits ont été analysés par plusieurs CCM en testant chaque fois un système de solvant de migration en comparaison avec des étalons (Quercétine, Acide Gallique) (Tab 2.4).

Après migration, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 nm et 366 nm. Les substances phénoliques sont des molécules UV actives et absorbent UV à 366 nm. Le rapport frontal (RF) pour chaque tâche a été calculé selon la formule suivante [13]:

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Tableau 2.4 : Systèmes solvants utilisés dans les séparations CCM [13].

Les systèmes solvants	Abréviation	Rapport (v/v)
Chloroforme /Méthanol	CM	8/2
Acétate d'éthyl /Méthanol /Eau.	AME	7/1,5/1,5
Acétate /n-Butanol.	AB	9/1
Acétate d'éthyl/Ac acétique /Eau.	AAE	8/1/1
Acétate d'éthyl /Ether diéthylique.	AE	2/8
Dichlorométhane/Méthanol.	DM	8/2
Dichlorométhane/Acétate d'éthyl.	DA	9/1
Acétate d'éthyl/Acide formique/Eau.	AFE	8/1/1

La révélation a été faite selon la coloration des spots puisqu'il existe une relation étroite entre la fluorescence et la structure chimique des substances (Tab 2.5) [61].

Tableau 2.5 : Composés phénoliques identifiés par CCM [62].

Couleurs sous UV 366 nm	Classes de polyphénols possibles
Mauve	Anthocyanidine-3-glycosides
Violet	Flavones
Bleu	Ac Phénol
Bleu vif	Ac Phénol
Bleu jaunâtre	/
Bleu blanc fluorescent	Flavonols, Flavones, Isoflavones et Flavanones
Bleu pale	Ac Phénol
Vert	Flavonols, Flavonones et Aurones
Jaune	Flavonols
Jaune grisâtre	/
Jaune pale	Flavonols
Orange	Anthocyanidine-3-glycoside
Rouge	Anthocyanidine-3-glycoside
Rouge vif	Anthocyanidine-3-glycoside
Gris	/
Gris sombre	/
Bleu sombre	/
Rose	Anthocyanidine-3,5-diglycosides
Rose pale	Anthocyanidine-3,5-diglycosides

Ce dosage qualitatif a été renforcé par un dosage quantitatif des principaux métabolites secondaires.

3.4.3. Dosage des phénols totaux

Le contenu des phénols totaux a été déterminé à l'aide de réactif Folin Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme standard. 200 µl de la solution d'extrait dilué (E-BuOH et E-Aq) ont été ajoutés à 1 ml de réactif de Folin Ciocalteu (10 fois dilués dans de l'eau distillée). Après 4 min, 800 µl de Na₂CO₃ (75 mg / ml) ont été ajoutés. Le mélange a été laissé pendant 45 min à température ambiante. Par la suite l'absorbance a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectrophotometer UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan). Les concentrations de composés phénoliques ont été exprimées en µg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG / mg d'extrait) [63]. Toutes les expériences ont été réalisées en triple.

La quantité des phénols totaux est calculée selon la formule suivante [63]:

$$C = c \cdot v / m$$

Où :

- C : Contenu total des polyphénols (µg Equivalent acide gallique /mg d'extrait).
- c : Concentration d'acide gallique (µg/ml).
- v : Volume de l'extrait (ml).
- m : Masse de la matière sèche (mg).

3.4.4. Dosage des flavonoïdes

La quantification du contenu flavonoïque a été estimée par la méthode de trichlorure d'aluminium, en utilisant la Quercétine comme standard. 1ml de l'extrait dilué (E-BuOH et E-Aq) a été mélangé avec 1 ml de la solution $AlCl_3$ (2%). Le mélange a été laissé pendant 30 min à température ambiante. Par la suite l'absorbance a été mesurée à 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectrophotometer UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan). Le taux des flavonoïdes est exprimé en μg équivalent de Quercétine par mg d'extrait [64]. Toutes les expériences ont été réalisées en triple.

Le taux des flavonoïdes est calculé selon la formule suivante [64]:

$$X = (A \cdot m_0) / (A_0 \cdot m)$$

Où :

- X : Quantité des flavonoïdes (μg Equivalent Quercétine /mg d'extrait).
- A : Absorbance de l'extrait.
- A_0 : Absorbance de la solution quercétine.
- m : Masse de l'extrait (mg).
- m_0 : Masse de la Quercétine dans la solution (μg).

3.5. Etude toxicopharmacologique d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers

3.5.1. Test de toxicité

Trois lots de cinq rats chacun, préalablement mis à jeun pendant 17 h, reçoivent par voie orale l'extrait aqueux aux doses 500, 1000 et 1500 mg/Kg de poids corporel durant 3 jours (Tab 2.6). Des observations sur le comportement et la létalité ont été faites au bout de 1 h, 4 h, 24h, 48 h et 72 h comparativement à un lot témoin sain qui ne reçoit que de l'eau distillée [65].

Tableau 2.6 : Traitement des rats de la toxicité.

Lot	Traitement
Lot 1	Eau distillé (témoin sain)
Lot 2	500 mg/Kg de poids corporel de l'E-Aq
Lot 3	1000 mg/Kg de poids corporel de l'E-Aq
Lot 4	1500 mg/Kg de poids corporel de l'E-Aq

La DL_{50} permet de mesurer la toxicité d'une substance et d'établir des classes de toxicité [62]. Une fois la DL_{50} déterminée, elle est comparée aux autres valeurs à l'aide d'une échelle de toxicité. Il y a quelques fois de la confusion parce qu'il existe différentes échelles de toxicité. Les deux échelles les plus couramment utilisées sont « l'échelle de Hodge et Sterner » et « l'échelle de Gosselin, Smith et Hodge ». Ces échelles diffèrent au niveau de l'indice de toxicité de chaque classe ainsi qu'au niveau des termes utilisés pour décrire chaque classe [66]. En général, plus la DL_{50} est petite, plus la toxicité est élevée. Le contraire est également vrai : plus la DL_{50} est élevé, plus la toxicité est faible comme le montre le tableau 2.7.

Tableau 2.7 : Classes de toxicité selon l'échelle de Hodge et Sterner (1943) [66].

DL ₅₀ orale	Indice de toxicité
Jusqu'à 1mg/Kg	Extrêmement toxique
1 à 50 mg/Kg	Hautement toxique
50 à 500 mg/Kg	Modérément toxique
500 à 5000 mg/Kg	Légèrement toxique
5000 à 15000 mg/Kg	Presque pas toxique
Plus de 15000 mg/Kg	Relativement inoffensif

3.5.1.1. Dosages biochimiques sanguin après sacrifice

Au quatrième jour, les rats ont été sacrifiés le matin à jeun. Le sang a été immédiatement recueilli dans des tubes héparines pour le dosage des différents paramètres biochimiques [64]. Tous les paramètres ont été dosés selon la fiche technique Spinreact, par le spectrophotomètre COBAS INTEGRA 400 Plus (Annexe 06).

➤ Dosage de la Phosphatase Alcaline (PAL)

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate (pNPP) à pH 10,4 libérant du p-nitrophénole et du phosphate en fonction de la réaction suivante:



La vitesse de formation du p-Nitrophénole, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé¹.

➤ Dosage de la Bilirubine totale (Bil)

La bilirubine se transforme en azobilirubine au contact de l'acide sulphanilyque diazotade et se mesure par photométrie. Sur les deux fractions présentes dans le sérum, la bilirubine-glucuronide et la bilirubine libre liée à l'albumine, seule la première réagit en milieu aqueux (bilirubine directe). La deuxième doit être mélangée à du dimetilsulphoxyde (DMSO) pour pouvoir réagir (bilirubine indirecte). Dans la détermination de la bilirubine indirecte, on détermine également la directe. Le résultat final donne la bilirubine totale.

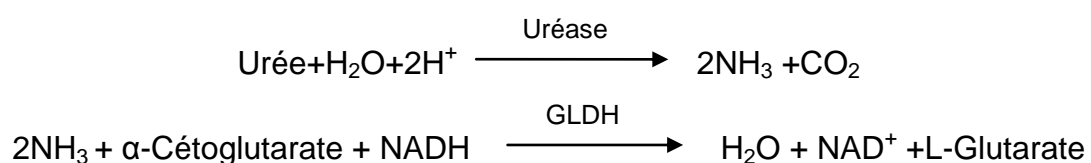
L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de bilirubine présente dans l'échantillon testé.

➤ Dosage des Transaminases (TGO/ TGP)

Les transaminases TGO et TGP présentes dans le sérum catalysent le transfert du groupement amine du glutamate vers l'oxaloacétate et le pyruvate dans des réactions réversibles. L'activité de ces enzymes est proportionnelle à la quantité du pyruvate où l'oxaloacétate formée après réaction avec 2, 4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH) dans un milieu alcalin.

➤ Dosage de l'Urée

La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode cinétique utilisant l'uréase selon les réactions suivantes.



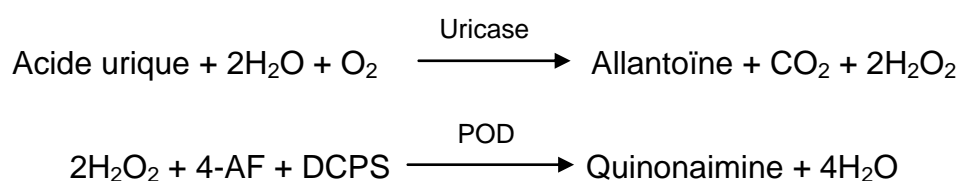
La concentration de l'urée plasmatique est proportionnelle à la disparition du NADH⁺.

➤ Dosage de la Créatinine (Créa)

La créatinine présente dans un échantillon réagit avec le picrate en milieu alcalin pour donner un complexe dans des périodes initiales courtes en évitant ainsi l'interférence d'autre composé.

➤ Dosage de l'Acide Urique (AU)

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène (2H₂O₂) qui, en présence de la peroxydase (POD), 4- aminophénazone (4-AF) et du 2-4 Diclorphénol sulphonate (DCPS) forme un composé rosacé:



L'intensité de quinonaimine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présente dans l'échantillon testé.

4.5.1.2. Coupes histologique des organes

Après sacrifice des rats, les organes (foie, cœur et reins) ont été prélevés, pesés puis conservés dans du formol à 10%.

Pour déterminer les effets toxiques de la plante sur les organes internes, des coupes histologiques du foie du cœur et des reins ont été réalisés au niveau d'un laboratoire privé d'anatomie pathologique, de la Wilaya de M'Sila. Les tranches tissulaires des organes ont été fixées dans du formol (10%) pendant 72h puis déshydratés par passage dans trois bains d'éthanol successifs de 8h à 16h (70-75°; 90-95° et 100°). Ensuite ils ont été éclaircis dans deux bains de quelques heures de xylène et inclus dans la paraffine par deux bains successifs à 60°C pendant quelques heures chacun.

Les blocs de paraffines obtenus ont été ensuite coupées par Microtome, les coupes ont été étalées sur des lames et séchées pendant 30 minutes à 37°C, réhydratées et colorées à l'hématoxyline-éosine [68].

3.5.2. Tests des activités biologiques

3.5.2.1. Activité antioxydante : test au DPPH

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (Fig 2.5) [69].

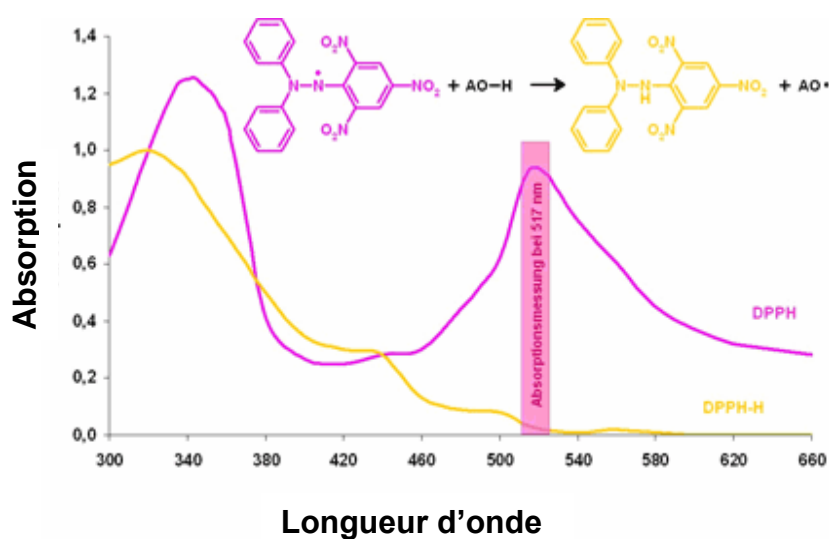


Figure 2.5 : Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive [70].

Dans des tubes on introduit 50 μ l de différentes concentrations (200 à 2000 mg/ml) de l'extrait (EtOH ou BuOH) et 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. Après agitation au vortex, les tubes ont été placés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 515 nm (Spectrophotometer UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan). Le contrôle négatif est composé de la solution méthanolique de DPPH et du méthanol [69].

Les essais ont été effectués en triple. Le pourcentage de l'inhibition des radicaux libres est calculé selon la formule suivante [69]:

$$\% I = \frac{AbsC - AbsE}{AbsC} \times 100$$

Où :

- % I : Le pourcentage d'inhibition du DPPH.
- Abs C : Absorbance du Contrôle négatif.
- Abs E : Absorbance de l'Extrait.

Les IC₅₀ ont été calculées graphiquement par régressions linéaires à partir des graphes (pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés et l'Acide Ascorbique utilisé comme référence).

3.5.2.2. Activité antibactérienne et antifongique

➤ Microorganismes testés

Le choix des microorganismes a été porté sur six souches de la collection internationale ATCC (American type culture collection) fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces sont souvent responsables de toxi-infections alimentaires constituant ainsi un problème majeur de santé publique, et dont les symptômes majeurs sont la douleur et la fièvre. Parmi les microorganismes testés :

- Deux bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 65 38 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633.
- Deux bactéries Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- Une levure : *Candida albicans* ATCC 10 231.
- Un champignon : *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

➤ Test de sensibilité aux antibiotiques et aux Antifongiques

Ce test a été réalisé pour étudier la sensibilité des germes utilisés vis-à-vis de plusieurs antibiotiques et un antifongique. Les disques d'antibiotiques et de nystatine

sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture de la souche testée.

Les antibiotiques et l'antifongique utilisés sont commercialisés sous forme de disques dont : [C 30 (Chloramphenicol 30µg), MP 10 (Imipenem 10µg), DA 2 (Clindamycin 2mg), AUG 10 (Augmentin 10), E 15 (Erythromycine 15), P 6 (Penicillin 6µg), Net 10 (Netilmicin 10), PRL 100 (Piperacillin 100µg), Ofx (Ofloxacin), FA 10 (Fusidic Acid), SR 100 Spiramicin 100, FT 300 (Nitrofurantoin 300µg), TMP 5 (Trimethoprim 5µg), AMC (Amoxicillin +Clavulanic acid 20/10µg), OX 1 (Oxacillin 1µg), DO 30 (Doxycycline 30 mg), TC 75/10 (Ticarcillin + Clavulanic acid), L 10 (Lincomycine 10 µg), CT 10 (Colistin 10µg), K 30 (Kanamycine 30µg), AX (Amoxicilline), AM (Ampicillin) et Ny 100 (Nystatine 100µg).

➤ Test de diffusion en milieu solide

Les extraits de plante (EtOH et BuOH) ont été dissout dans du DMSO à différentes concentrations (300, 600 et 900 µg /ml) puis introduits dans des puits de 8 mm de diamètre d'un milieu gélosé (gélose nutritive pour les bactéries et gélose Sabouraud pour les levures) ensemencé en surface à l'aide d'une suspension microbienne.

L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 3 à 7 jours pour les levures. L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du puit dont le diamètre est mesuré par un Pied à coulisse et exprimé en millimètre [71]. Toutes les expériences ont été réalisées en triple.

3.5.2.3. Activité antipyrétique

Elle consiste à vérifier l'action inhibitrice des extraits (Aq et BuOH) sur la fièvre provoquée chez les rats par l'injection sous cutanée d'une solution de la levure de bière à 20% [72].

Les rats ont été répartis en 08 lots de 05 rats chacun (Tab 2.8), ils ont été maintenus à jeun pendant 18 h avant le début de l'expérimentation.

Tableau 2.8: Traitement des rats de l'activité antipyrétique.

Lot	Traitement
Lot 1	Eau distillé
Lot 2	Paracétamol (150 mg/Kg de poids corporel)
Lot 3 et 4	100 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A
Lot 5 et 6	200 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A
Lot 7 et 8	300 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A

La fièvre a été induite par injection sous cutanée d'une suspension aqueuse à 20% de la levure de bière [73]. La température rectale initiale a été enregistrée. Après 18 h, les rats ayant montré une augmentation de 0,5°C de la température rectale ont été sélectionnés [74]. La température rectale a été mesurée à 1, 2, 3 et 4 h après l'administration des traitements (eau, paracétamol, et extraits de plante à différentes doses) [75].

3.5.2.4. Activité analgésique

➤ Test de torsion (Writhing test)

Il consiste à vérifier l'action inhibitrice des extraits (Aq et BuOH) sur la douleur provoquée chez les rats par l'injection intra péritonéale d'une solution d'acide acétique [76].

Les rats ont été répartis en 08 lots de 05 rats chacun (Tab 2.9), ils ont été maintenus à jeun pendant 18 h avant le début de l'expérimentation.

Tableau 2.9 : Traitement des rats de l'activité analgésique (Test de torsion).

Lot	Traitement
Lot 1	Eau distillé
Lot 2	Paracétamol (150 mg/Kg de poids corporel)
Lot 3 et 4	100 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A
Lot 5 et 6	200 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A
Lot 7 et 8	300 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A

Une demi-heure après l'administration par voie orale des traitements (eau distillée, paracétamol et extraits de plante à différentes doses), la solution d'acide acétique a été injectée par voie intrapéritonéale selon la méthode de SIEGMUND [74]. Cinq minutes (05 min) après l'injection, chaque rat a été observé individuellement et le nombre de torsions a été compté pendant une période de 20 min [78].

Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale [75].

Le pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque lot de rat selon la formule suivante [79]:

$$\%Inh = \frac{M \text{ témoin} - M \text{ traité}}{M \text{ témoin}} \times 100$$

Où :

- M : Moyenne du nombre de torsions.

➤ Test de la plaque chauffante

Ce test explore l'activité analgésique centrale des extraits de la plante et utilise un stimulus thermique chez rats [76].

Les rats ont été répartis en 08 lots de 05 rats chacun (Tab 2.10), ils ont été maintenus à jeun pendant 18 h avant le début de l'expérimentation.

Tableau 2.10: Traitement des rats de l'activité analgésique (Test de plaque chauffante).

Lot	Traitement
Lot 1	Eau distillé
Lot 2	Paracétamol (150 mg/Kg de poids corporel)
Lot 3 et 4	100 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A
Lot 5 et 6	200 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A
Lot 7 et 8	300 mg/Kg de poids corporel d'E-BuOH ou E-A

Cette technique consiste à placer le rat sur une plaque chauffante chaude à une température d'environ $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ [76], On mesure le temps de réaction grâce à un chronomètre, entre le moment où le rat est placé sur la plaque chauffante et le moment où il lèche ses pattes ou saute [78]. Le temps de réaction a été calculé 30, 60, 90 et 120 min après l'administration des différents traitements (eau distillée, paracétamol et extraits de plante à différentes doses).

4. Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été représentés sous la forme de moyenne \pm écart type et les différences ont été considérées significatives à $P \leq 0,05$.

Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GRAPH Pad d'analyse et de traitement statistique des données. Des comparaisons de groupe ont été exécutées par l'analyse de variance ANOVA. La différence significative entre le groupe contrôle et les groupes expérimentaux ont été évalués par le test de Tukey.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Choix de la plante d'étude : *Erythraea centaurium* (L.) Pers

Il ressort du dépouillement des questionnaires, qu'au-delà des affections plus ou moins banales telles que les troubles digestives ou la fièvre, les plantes de la région de M'Sila, sont également utilisées pour traiter les maladies les plus préoccupantes, telles que, le diabète, l'inflammation, l'hypertension ou la leishmaniose. Pour arriver à une meilleure interprétation des résultats relatifs à la consultation des fiches questionnaires, les plantes ont été regroupées en répertoire selon la pathologie pour laquelle elles ont été utilisées. Le facteur du consensus d'informateur (IFC) sera ensuite calculé. Le tableau 3.1 indique quelques domaines d'indication thérapeutique des plantes.

Tableau 3.1 : Quelques domaines d'indications thérapeutiques issu de la base de données PHARMACOPEE.

Pathologies	Nombre d'espèces	Nombre indication	IFC
Eczéma	25	32	0.22
Diabète	18	48	0.63
Inflammation	16	102	0.85
Hypertension	35	111	0.69
Leishmaniose	06	25	0.79

L'IFC varie généralement entre 0 et 1. Lorsque la valeur d'IFC se rapproche de 1, alors les informateurs sont en accord sur les plantes utilisées, pour soigner les maladies d'une catégorie donnée. Selon les résultats, les pathologies inflammatoires possèdent l'IFC le plus haut (IFC = 0.85). Ce répertoire a été

sélectionné par la suite, il renferme ceux qui sont susceptibles d'avoir une action contre les symptômes de l'inflammation à savoir l'œdème, la douleur et la fièvre (effets cités dans les fiches questionnaires). La liste de quelques plantes du répertoire sélectionné est établie dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Liste de quelques plantes utilisées dans le traitement de l'inflammation.

Espèces	Nombre de citation	UV
<i>Anthemis nobilis</i>	19	0,22
<i>Erythraea centaurium</i> (L.)Pers	11	0.13
<i>Thapsia garganica</i>	06	0.07
<i>Juniperus oxycedrus</i>	04	0.04
<i>Zizyphus lotus</i>	18	0.21
<i>Daphne gnidium</i> L	06	0.07
<i>Malva sylvestris</i>	04	0.04

Le calcul de la valeur d'utilisation (UV) a montré qu'aucune espèce, parmi celles choisies, n'a atteint une valeur élevée, sauf pour *Anthemis nobilis*, *Zizyphus lotus* et *Erythraea centaurium* (L.) Pers.

Malgré que les UV soient basses, la plupart des espèces citées ci dessus possèdent une activité anti-inflammatoire prouvée scientifiquement [79][80][81][82].

Au Maroc comme en Algérie, plusieurs enquêtes ethnobotaniques avec les herboristes ont indiqué l'utilisation de la petite centaurée, pour le traitement des troubles digestifs, du diabète et, de la fièvre [5][72]. D'autre part, les travaux en Algérie sont quasiment inexistantes, concernant *Erythraea centaurium* (L.) Pers en tant qu'antipyrétique et analgésique. C'est pour cette raison, qu'elle a été choisie pour vérifier la véracité de son utilisation par la population locale de la région de M'Sila.

2. Etude morphologique et anatomique de la plante

2.1. Etude morphologique

L'observation morphologique de la plante fraîche, effectuée sous loupe binoculaire, montre que :

➤ **La fleur :**

Les fleurs sont de couleur rose, en cyme. Chaque fleur est constituée de :

- 05 pétales.
- 05 Etamines de 5 mm.
- Anthères sont contournées en spirale (Fig 3.1 a).
- Le style, divisé en 2 stigmates (Fig 3.1 b).

➤ **La feuille :**

Les feuilles sont basales en rosette, simples, entières, généralement opposées-décussés, sans pétiole, 20 mm de longueur (Fig 3.1 c).

➤ **La tige :**

Les tiges plus ou moins grêles, offrant quatre angles dans leur longueur (Fig 3.1 c).

L'étude morphologique concorde avec les critères d'identification de la petite centauree selon QUEZEL et SANTA [9], puisque toutes les fleurs sont disposées dans le même plan, le calice tubuleux est à cinq angles saillants et à cinq lobes linéaires. La corolle est à tube cylindrique assez long resserré à son sommet. Les inflorescences sont en panicule corymbiforme dense. Calice à la floraison atteignant tout au plus la demi longueur du tube de la corolle. Capsule plus longue que le calice. Les feuilles sont en général en opposées et les feuilles inférieures en rosette.

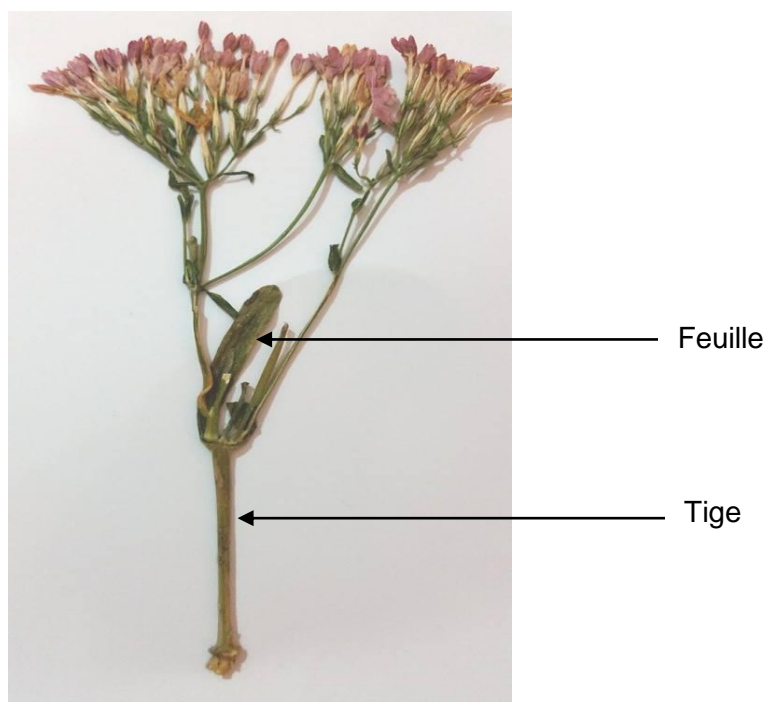
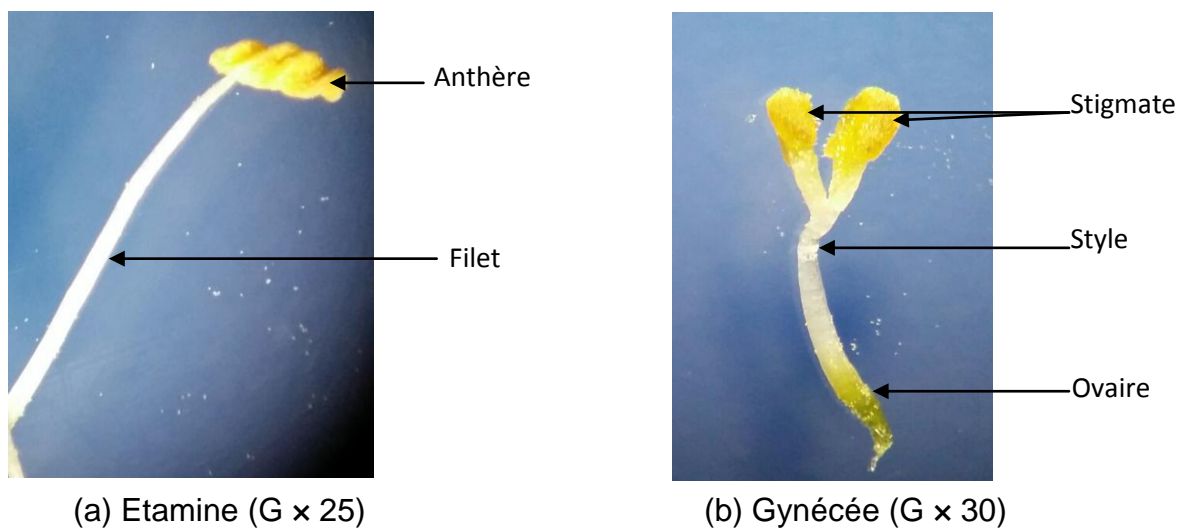


Figure 3.1 : Aspect morphologique d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers (Original 2015).

2.2. Etude anatomique

La double coloration (Vert de Méthyle - Rouge Congo) réalisée au niveau des coupes de la tige et la feuille a permis l'observation des différentes structures tissulaires. Cette observation est réalisée grâce au microscope (Motic Digital Microscope X400).

La coupe transversale réalisée au niveau la tige, présente une structure quadriforme, bordée de cellules collenchymateuses, qui aident pour le maintien de la plante. Elle présente deux parties nettes, à savoir, l'écorce qui représente la partie périphérique réduite comparativement à l'autre partie centrale, vaste et très développée, nommée stèle.

L'écorce, débute par une assise périphérique, munie d'une couche pelliculaire: l'épiderme. Sous l'épiderme se trouve des cellules parenchymateuses dans la région médiane.

La stèle, renferme le xylème (bois) coloré en vert. Ce qui prouve dans ce cas, l'existence des structures lipidiques, et le phloème (liber) qui est coloré en rose comme pour le parenchyme et le collenchyme (Fig 3.2). Ce qui prouve l'existence des structures cellulosiques.

Ces deux types de vaisseaux sont séparés par une couche de méristème, le cambium ou la zone génératrice libéro-ligneuse. Elle assure la structure secondaire chez les dicotylédones. La stèle est délimitée vers l'extérieur par une couche comportant des cellules à parois rigides, dures et imperméables : le péricycle, vers l'intérieur par une masse cellulaire ; le parenchyme médullaire (Fig 3.2).

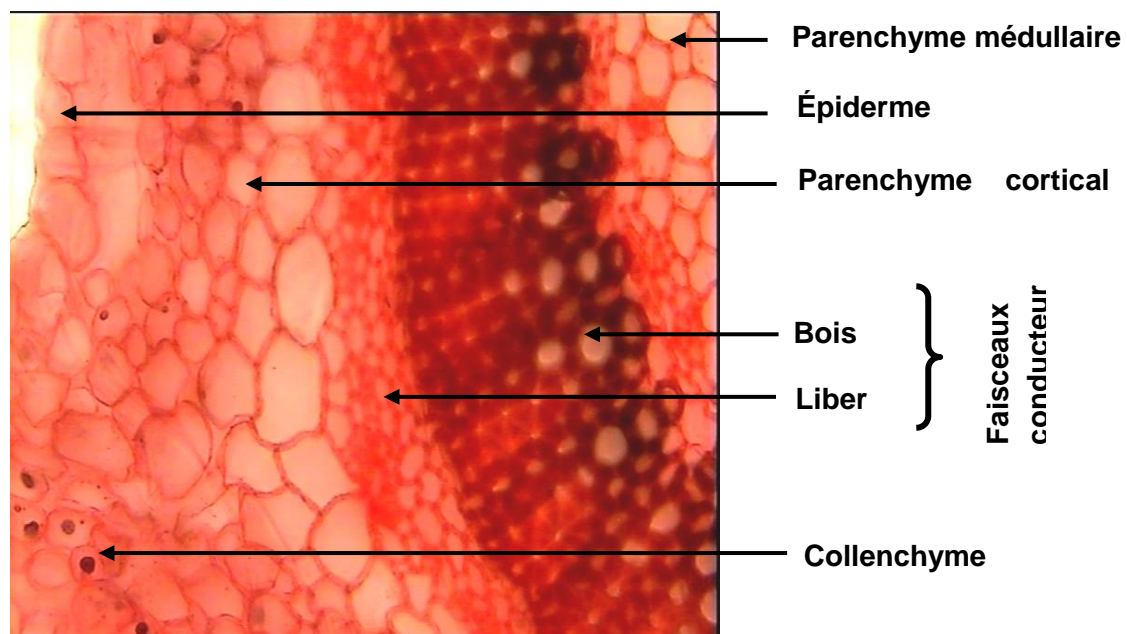


Figure 3.2: Différentes couches cellulaires de la tige : pachyte continue (G × 400)
(Original 2014).

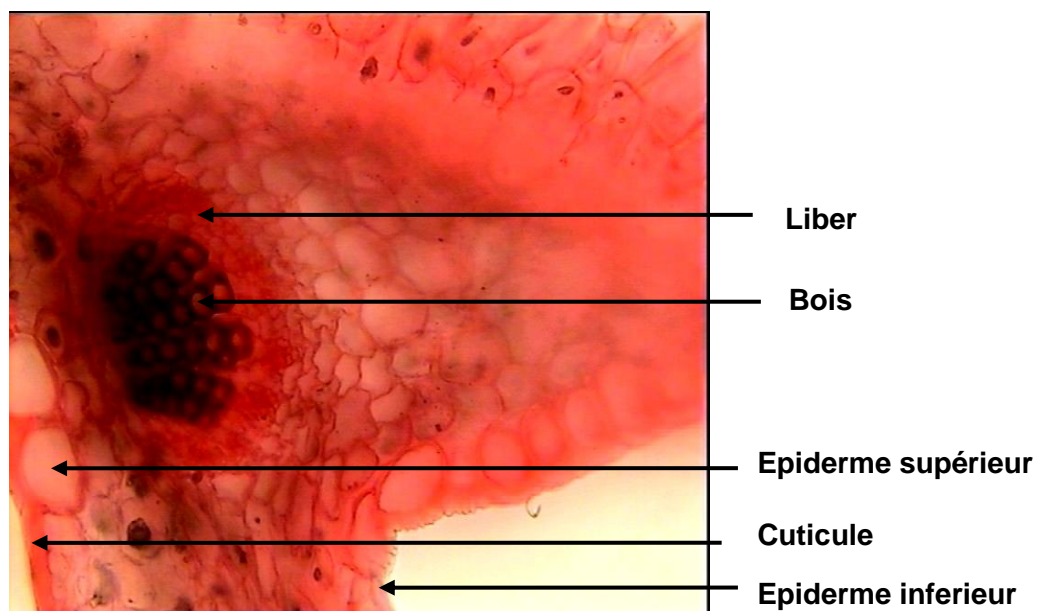


Figure 3.3 : Coupe transversale de la partie centrale de la feuille (G × 400)
(Originale 2014).

L'observation microscopique de la coupe transversale de la feuille, au niveau de la nervure principale, a montré qu'elle présente une symétrie dorsiventrale, (faces supérieure et inférieure différentes), elle a permis de mettre en relief les structures suivantes (Fig 3.3) :

- Epiderme supérieur et inférieur.
- Tissus conducteurs (Xylème et phloème).

Les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles [21]. Selon GUERINE, les Flavones et les flavonols sont principalement localisés dans l'assise palissadique ; et les flavonoïdes dans l'assise externe du parenchyme cortical (collenchyme) [83].

3. Rendements d'extractions

La préparation des extraits, à partir d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers, a été effectuée selon trois méthodes : l'hydrodistillation, l'extraction en continue par solvant et l'infusion.

L'extraction en continue a été réalisée en deux étapes, la première est une extraction par l'éthanol pur, qui permet d'obtenir un extrait brut (E-EtOH) contenant les polyphénols totaux. La deuxième étape de fractionnement a été réalisée par le n-butanol qui a permis de séparer les Flavonoïdes [62].

De ce fait, quatre extraits ont été obtenus : huile essentielle (HE), extrait brut ou extrait éthanolique (E-EtOH), extrait n-butanolique (E-BuOH) et extrait aqueux (E-Aq) obtenu par infusion. Le rendement de chaque extrait par rapport au poids de la matière sèche est présenté dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Rendements des extraits obtenus.

Extraits	Masse (g)	Rendement %
HE	0,039 ± 0,0005	0,039 ± 0,0005
EtOH	12,21 ± 00,57	25,43 ± 01,15
Aq	00,45 ± 00,02	22,50 ± 01,00
BuOH	07,68 ± 00,23	07,68 ± 00,47

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET, n=3

Un rendement de 0.039 % en HE a été obtenu. Ce résultat est plus élevé comparativement à celui obtenu avec la même plante, et le même protocole d'extraction en Croatie, qui est de 0.02 % [84].

Généralement la teneur en HE des plantes est de l'ordre de 1% [85]. Cette différence est due probablement à la variation des facteurs d'origine intrinsèque ou extrinsèque, la géographie, la période de récolte et le stade de maturation de la plante [86].

Vu le faible rendement de l'huile essentielle de la plante étudiée, et le nombre de test toxicologique et activités biologiques à réaliser, notre choix s'est basé sur les extraits EtOH, Aq et BuOH.

Les rendements des différents extraits EtOH, Aq et BuOH sont 25.43%, 22,5% et 7,68% respectivement.

Les résultats obtenus ont montré que l'E-EtOH a donné le rendement le plus élevé suivi par l'E-Aq puis l'E-BuOH. Cette différence de rendements est due aux solvants d'extraction et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre. Ce résultat indique que la majorité des constituants de la partie aérienne d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers est extraite par l'éthanol et l'eau.

La méthode utilisée (le choix du solvant), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (à chaud ou à froid) affectent le rendement d'extraction. Les solvants utilisés (éthanol, n-butanol et eau) sont des solvants polaires. L'éthanol est fréquemment employé pour l'extraction des composés

phénoliques (acides phénolique, tannins et flavonoïdes) [84], tandis que le n-butanol sépare les produits les plus polaires tels que les flavonoïdes ce qui explique la différence dans le rendement des extraits [62]. L'eau, solvant d'extraction polaire, peut être utilisé à chaud ou à froid. Le rendement de l'E-EtOH obtenu lors de notre étude est plus élevé que celui obtenu par SAAB et al., (14,5%) [88]. Le rendement de l'E-Aq (22 %) obtenu à chaud est plus important que celui rapporté par CHDA et collaborateurs (15%) [89] et TAHRAOUI et al., (12%). Les variations des rendements peuvent être liées à l'origine géographique de la plante, aux conditions et à la durée de stockage et de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées (infusion, décoction).

Le rendement de la phase n -butanolique est comparable à celui cité par BENHAMZA (6.6%) [90].

Afin d'utiliser les extraits pour l'étude toxico-pharmacologique, l'épuisement complet du solvant est nécessaire. La présence des traces de solvants dans l'extrait peut entraîner des effets secondaires indésirables [91].

4. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits

4.1. Screening phytochimique

Il s'agit d'une étude qualitative, qui mène à la recherche des principaux groupes chimiques. Les tests de caractérisation ont été basés sur des réactions de précipitation, avec formation de complexes insolubles et colorés. La coloration observée a été provoquée par l'utilisation d'un réactif approprié.

Les tests de caractérisation phytochimique réalisés sur l'extrait aqueux ont donné les résultats présentés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Résultats du screening phytochimique de l'extrait aqueux.

Constituants chimiques	E-Aq
Polyphénols	+
Flavonoïdes	++
Alcaloïdes	+
Tanins galliques	++
Tanins catéchiques	—
Saponosides	mousse persistante de 2cm
Coumarines	+
Stérols et triterpènes	+

+ : présence ; - : absence

Les résultats des tests préliminaires indiquent la présence de plusieurs composés actifs tels que flavonoïdes, tanins galliques, polyphénols, coumarines, saponosides, stérols et triterpènes et alcaloïdes avec absence des tanins catéchiques.

L'intensité de la couleur observée indique la richesse de l'extrait aqueux en flavonoïdes et tannins gallique. Ces résultats sont comparables avec d'autres qui indiquent la présence des acides phénoliques, des flavonoïdes, des triterpénoides et la présence à l'état de trace des alcaloïdes dans différents extraits de la même plante (extrait aqueux et extrait méthanolique) [89][92].

La présence de ces composés chimiques dans l'extrait aqueux donne à la plante des vertus biologiques intéressantes [93].

4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode de séparation rapide et efficace [94].

Les extraits ont été séparés en utilisant plusieurs systèmes de solvant spécifique. Les chromatogrammes résultants ont comporté une série de spots. L'identification des composés a été basée sur Markham par l'observation des couleurs sous lampe UV à 366 nm d'une part, et par la comparaison des RF des échantillons à ceux des étalons utilisés d'une autre part (Annexe 07). L'ensemble des résultats de cette analyse sont consignés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Résultats de la CCM des extraits éthanolique et n-butanolique.

Extraits	Systèmes (V/V)	Nombre de taches	RF
EtOH	CM (8/2)	Mélange complexe	
	DM (8/2)	Deux taches	0,44
			0,82
	AAE (8/1/1)	Mélange complexe	
	AME (7/1,5/1,5)	Deux taches	0,58
			0,8
	AE (2/8)	Mélange complexe	
	DA (9/1)	Mélange complexe	
	AFE (8/1/1)	Une tache	0,48
	AB (9/1)	Une tache	0,23
BuOH	CM (8/2)	Mélange complexe	
	DM (8/2)	Deux taches	0,44
			0,82
	AAE (8/1/1)	Mélange complexe	
	AME (7/1,5/1,5)	Trois taches	0,58
			0,66
			0,8
	AE (2/8)	Mélange complexe	
	DA (9/1)	Deux taches	
	AFE (8/1/1)	Une tache	0,48
AB (9/1)	Une tache	0,23	

L'observation des plaques CCM sous UV à 366 nm a présenté des taches de différentes couleurs (bleue, jaune, orange, rose, verte, rouge) qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires. Les extraits analysés semblent contenir des acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanes) [60].

La complexité (mauvaise séparation chromatographique avec des spots très rapprochés) de l'extrait éthanolique (extrait brut) n'a pas permis de trouver un bon système de séparation. La composition de la fraction n-butanolique est moins complexe et donc plus facile à séparer.

Les systèmes de migration constitués de Chloroforme/méthanol (8/2), Acétate d'éthyl/Ac acétique /Eau (8/1/1) et Acétate d'éthyl /Ether diéthylique (8/2) ont donné un mélange complexe et de ce fait n'ont pas permis une bonne séparation des différents constituants des deux extraits. De même, Le système Dichlorométhane/Acétate d'éthyl (9/1) n'a pas permis une bonne séparation de l'extrait éthanolique (mélange complexe) et n'a donné que deux taches distinctes avec la fraction n-butanolique.

Les deux systèmes Acétate d'éthyl/Acide formique/Eau (8/1/1) et Acétate /n-Butanol (9/1) n'ont donné qu'une seule tache (bleue claire et vert vif respectivement) spécifique à une classe de métabolites secondaires chacun, ce qui ne donne pas une bonne lecture de la composition des deux extraits.

Par le biais du système Acétate d'éthyl /Méthanol /Eau (7/1,5/1,5), nous avons pu mettre en évidence trois composés (trois taches de couleurs différentes) pour la fraction n-butanolique et deux composés pour l'extrait éthanolique brut correspondant aux acides phénoliques et flavonoïdes selon la couleur (vert, bleue jaune et vert, jaune respectivement). Grâce à ce système d'élution, nous avons mis en évidence la présence dans l'extrait n-butanolique des flavonoïdes (Fig3.4) [62]. Il est préférable d'employer des mélanges de solvants organiques appropriés avec l'eau, sachant que la majorité des polyphénols ne sont pas hydrosolubles. L'eau augmente la solubilité des flavonoïdes, et elle dépend du nombre de groupement du poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonée du squelette de base [91].

Le système de migration Acétate d'éthyl /Méthanol /Eau indique que la fraction n-butanolique renferme probablement des flavonoïdes glycosylés (flavonoïde aglycone, mono-di et tri glycosylé) [62].

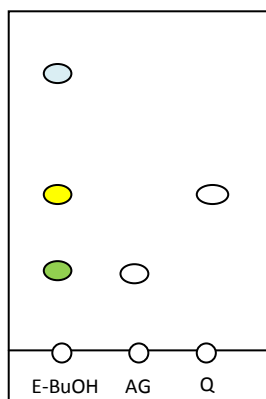


Figure 3.4 : Chromatogramme de l'extrait n-butanolique, Acide Gallique et Quercétine.

4.3. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, en Equivalent d'Acide Gallique, des extraits aqueux et n-butanolique a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Une courbe d'étalonnage a été tracée avec un extrait d'Acide Gallique à des concentrations allant de (0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 µg/ml) ; des mesures de la densité optique pour chaque extrait ont été réalisés à 760 nm [95]. Les teneurs en polyphénols correspondantes ont été rapportées en microgramme d'équivalent de l'étalon utilisé et déterminées par l'équation: $y = ax + b$ (Fig 3.5).

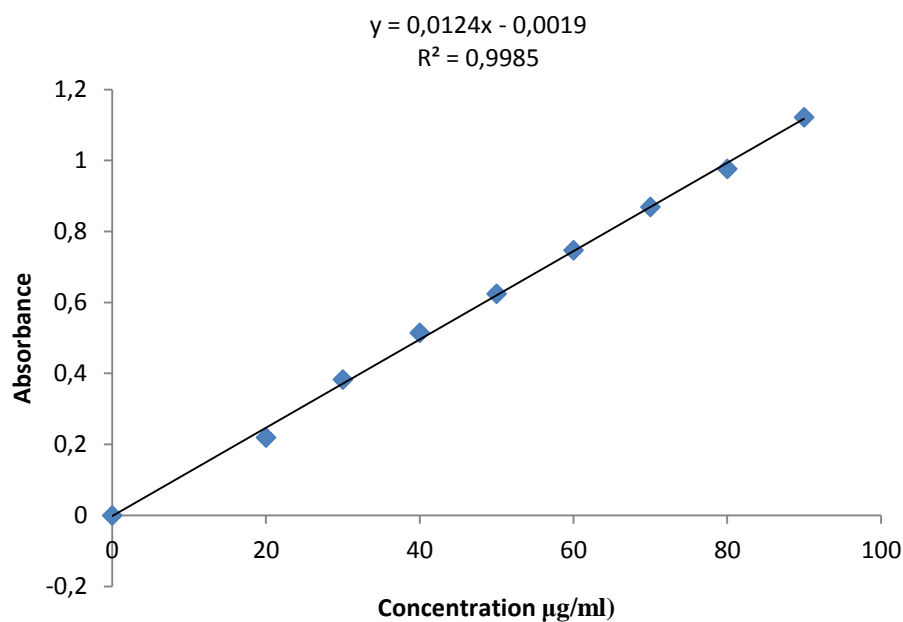


Figure 3.5 : Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique.

Pour les deux extraits aqueux et n-butanolique de la plante étudiée, nous avons constaté une variabilité des teneurs en polyphénols totaux (Tab 3.6).

Tableau 3.6 : Teneurs en phénols totaux de la petite centaurée.

Extrait	Teneur en polyphénols (µg EAG/mg E)
Aq	11,21
BuOH	142,98

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures

Les teneurs en polyphénols totaux ont montré que l'extrait brut aqueux (E-Aq) contient 11,21 µg EAG/ mg d'Extrait et une teneur de 143,98 µg EAG/ mg d'Extrait pour la fraction n-butanolique.

La teneur en polyphénols totaux de l'E-Aq de la petite centaurée est plus faible que celle de BENTAHAR et al : 49,63 µg EAG/ mg d'extrait [96]. SEFI et al., ont obtenue une teneur de 32,99 mg Equivalent d'acide caféique/ g de plante [97]

sachant que l'acide Gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-ciocalteu.

Cette différence des résultats est probablement due à l'origine de la zone de récolte, de la faible spécificité du réactif du Folin-ciocalteu qui est sensible à la réduction de tout les groupes hydroxyle non seulement des composés phénoliques mais également de certains et protéines. Le solvant d'extraction, l'eau, emporte des substances non phénoliques comme les sucres et les protéines qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique [98].

4.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon une méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium [99]. La Quercétine, utilisée comme control positif, a permis de réaliser une courbe d'étalonnage d'où les teneurs en flavonoïdes des extraits aqueux et n-butanolique de la plante d'étude exprimées en $\mu\text{g EQ/mg}$ d'Extrait sont calculées (Fig 3.6).

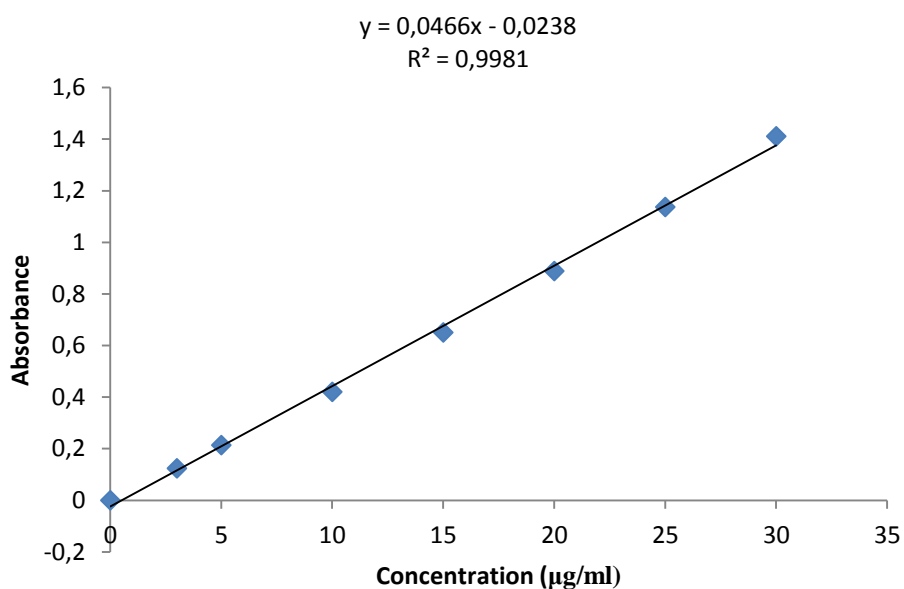


Figure 3.6: Courbe étalonnage de la Quercétine.

Le tableau 3.7 Résume les résultats obtenus du dosage des flavonoïdes dans l'E-Aq et E-BuOH.

Tableau 3.7 : Teneurs en flavonoïdes de la petite centaurée.

Extrait	Teneur en flavonoïdes $\mu\text{g EQ/ mg E}$
Aq	4,25
BuOH	42,47

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures

Le test préliminaire a indiqué la présence de flavonoïdes dans l'extrait aqueux de la plante.

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes ont révélé que l'E-Aq contient 4,25 $\mu\text{g EQ/mg}$ d'Extrait et la fraction n-butanolique contient 42,47 $\mu\text{g EQ/mg}$ d'Extrait. En tenant compte, de la sélectivité de chaque solvant utilisé, nous admettons que la fraction n-butanolique de la plante contient plus de flavonoïdes glycosides (flavonoïdes, di-O-glycosides, tri-glycosides et C-glycosides) [86]. Les teneurs rapportés par SEFI et al., [97] : 93,53 mg EQ/g de plante sont très élevé par rapport à nos résultats. Cette différence peut être liée soit aux facteurs intrinsèques (génétiques), ou extrinsèques (conditions climatiques, pratiques culturelles, maturité à la récolte et conditions de stockage) du moment que la distribution des métabolites secondaires varie durant la période de développement de la plante [86].

5. Etude toxicopharmacologique

5.1. Test de toxicité

5.1.1. Signes généraux

Après traitement des différents lots avec différentes doses de l'E-Aq, aucune mortalité n'a été enregistrée chez les rats des lots traités durant les trois jours de l'expérimentation. De même aucun changement dans le comportement général des animaux n'a été observé. Les résultats de l'observation sont consignés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8 : Evaluation de la toxicité de l'extrait aqueux d'*E. centaurium* (L.) Pers sur Les rats.

Traitemens	Dose (mg/Kg)	Nombre de rats	Mortalité					Nombre de morts	% de morts
			1h	4h	24h	48h	72h		
E-Aq	500	05	0	0	0	0	0	0	-
	1000	05	0	0	0	0	0	0	-
	1500	05	0	0	0	0	0	0	-
Eau distillée	-	05	0	0	0	0	0	0	-

La DL_{50} est supérieure à 1500 mg/kg de poids corporel. Ces résultats confirment l'innocuité de la forme traditionnelle d'utilisation (infusion) de la petite centaurée.

Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par TAHRAOUI et al., [67] où la toxicité aiguë et chronique de l'E-Aq de la petite centaurée a été évaluée chez des rats et des souris. Les doses administrées par voie orale varient de 1g à 15 g/Kg de poids corporel, aucun signe de toxicité ou de mortalité n'est observé, pour la toxicité aiguë ou chronique (14 jours et 90 jours respectivement) [67].

Trois jours après traitement, les rats expérimentés ont été sacrifiés. Un dosage biochimique du sang et des coupes histologiques des organes (foie, reins et cœur) ont été ainsi réalisés.

5.1.2. Données biochimiques

Le foie est la première cible de la toxicité et le premier organe responsable du métabolisme des substances étrangères à des composés qui peuvent être hépatotoxique. Le foie travaille en association avec les reins pour éliminer les substances toxiques du sang [100].

Une étude de la fonction rénale et hépatique est donc très importante pour évaluer les effets toxiques de notre plante d'étude. Ces tests comprennent la

détermination dans le sérum des paramètres suivants : transaminase glutamate oxaloacétate (TGO), transaminase glutamate purivate (TGP), phosphatase alcaline (PAL), bilirubine (bil), urée et créatinine (créa). Le tableau 3.9 regroupe les résultats obtenus.

Tableau 3.9 : Paramètres biochimiques après sacrifice des rats.

Paramètres	Doses mg/kg P.C			
	TS	500	1000	1500
TGO (UI/L)	92,76 ± 11,23	217,32 ± 14,27***	242,17 ± 21,97***	307,24 ± 45,45***
TGP (UI/L)	86,38 ± 07,10	99,63 ± 3,28*	59,87 ± 8,06***	69,29 ± 04,73**
PAL	103,96 ± 10,43	84,58 ± 06,95	126,96 ± 4,14*	115,65 ± 17,72
Bil	01,80 ± 00,29	02,38 ± 01,69	01,37 ± 0,15	02,04 ± 01,19
Bil direct	00,47 ± 00,63	00,64 ± 00,44	00,63 ± 0,35	00,47 ± 00,53
Bil indirect	01,32 ± 00,43	01,74 ± 01,91	00,63 ± 0,42	01,56 ± 00,91
AU	33,07 ± 03,67	45,16 ± 15,93	30,55 ± 7,99	38,36 ± 08,35
Urée (mg/dl)	00,48 ± 00,04	00,47 ± 00,04	00,45 ± 0,03	00,39 ± 00,08
Créa (mg/dl)	05,43 ± 01,25	05,12 ± 01,57	04,14 ± 0,82	04,72 ± 01,27

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET, n=5. p<0,05

L'élévation des transaminases est un indice des dommages des cellules parenchymateuses du foie et des voies biliaires. [101] L'augmentation hautement significative des taux sériques des transaminases (TGO et TGP) lors de notre étude, prouve une atteinte hépatique ; l'altération des cellules hépatiques se traduit par une libération de quantité importante de transaminases dans le sang. [102].

PAL est une enzyme qui renseigne sur l'obstruction des canaux biliaires. L'augmentation du taux de PAL indique une atteinte hépatique (cirrhoses biliaires primitives, désorganisation de l'architecture hépatique et l'obstruction des canalicules biliaires intrahépatique) [103].

Dans le présent travail, PAL augmente significativement avec la dose 1000 mg/Kg de poids corporel en comparaison avec le témoin sain. Ce résultat suggère

que l'extrait aqueux d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers provoque des effets directs sur le foie. La confirmation de ce résultat sera faite grâce à l'étude histologique de l'organe.

La bilirubine résulte de la destruction des globules rouges et particulièrement de l'hémoglobine de la rate, elle est éliminée par le foie. Son accumulation donne une couleur jaunâtre. Le taux de bilirubine (directe et indirecte) des rats traités par différentes doses de la plante ne montre aucune différence significative en comparaison avec le témoin sain.

Le bilan rénal (urée, acide urique et créatinine) est normal malgré les fortes doses administrées, ce résultat nous permet de constater que la plante n'a pas d'effet toxique notable sur le rein. L'observation microscopique des coupes histologiques, au niveau de cet organe est nécessaire pour confirmer ce résultat.

5.1.3. Masse relative des organes

Après examen macroscopique des différents organes prélevés, on a observé que leurs tailles et leurs formes sont normales. Par contre, les valeurs de la masse relative du foie montrent une diminution significative par rapport aux témoins sains. Le poids relatif des reins et du cœur ne présente aucune différence significative chez les groupes traités comparés au groupe témoin (Fig 3.7). Le changement de la masse relative des organes est un signe vulnérable de la toxicité [104]. Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure suivante :

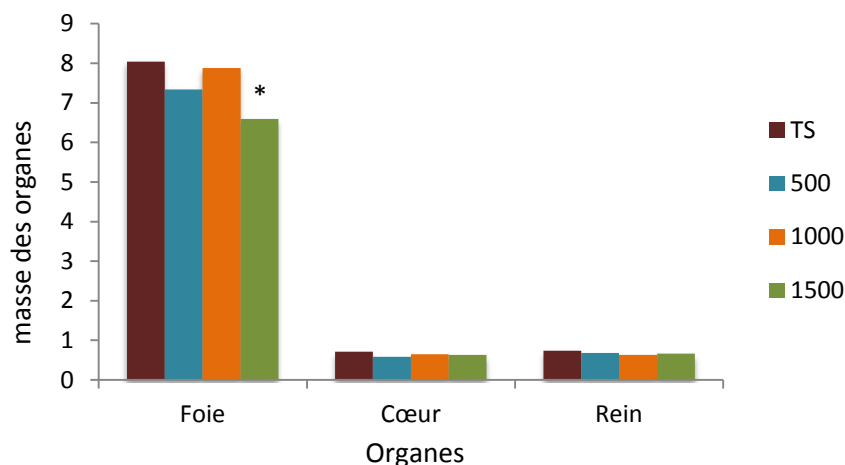


Figure 3.7 : Variation des valeurs de la masse relative des organes des rats.

Histopathologie

Un examen histopathologique est obligatoire pour prouver la nature (sévérité ou degré) des effets toxiques liés à l'administration de l'extrait aqueux de la plante. Les coupes histologiques des organes des rats traités ont été comparées à celles des rats témoins sains. Les résultats de l'examen histopathologique sont indiqués dans les figures 3.8, 3.9 et 3.10.

➤ Foie :

L'observation de la coupe histologique du tissu hépatique des rats traités avec la dose 500 mg/Kg de la plante dévoile que les principales différences, résident au niveau des capillaires sinusoïdes hépatiques (Fig3.8 b). Les observations montrent des dilatations sinusoïdales autour de l'espace porte qui témoignent d'une toxicité légère de la plante au niveau hépatique. Chez les animaux traités à la dose 1000 mg/Kg, la dilatation est localisée au niveau de la veine porte (Fig3.8 c), indiquant une toxicité peu sévère. La dose 1500 mg/Kg provoque quant à elle, une dilatation sinusoïdale, auteur de la veine Centro-lobulaire (Fig3.8 d) accompagné d'une dilatation de la veine porte avec congestion (Fig3.8 e). Ces interactions expliquent l'effet dépendant des doses.



1 : la veine porte ; 2 : vs lymphatique ;
3 : artère hépatique ; 4 : canal biliaire.

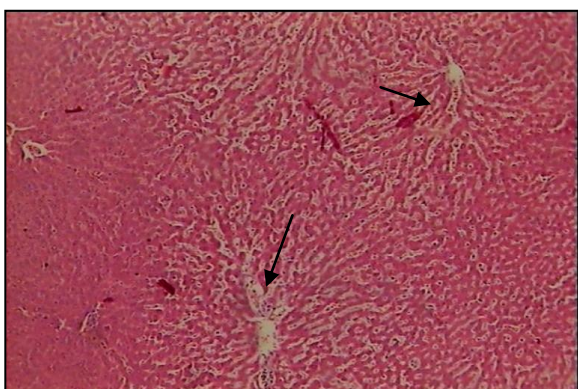
(a) Coupe histologique du tissu hépatique du rat témoin sain.



(b) Dilatation sinusoidale.



(c) Dilatation de la veine porte.



(d) : Dilatation sinusoidale de la veine
Centro-lobulaire.

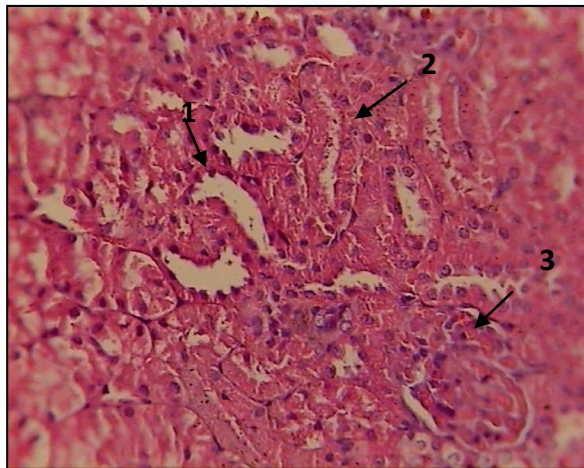


(e) : Dilatation de la veine porte
avec congestion.

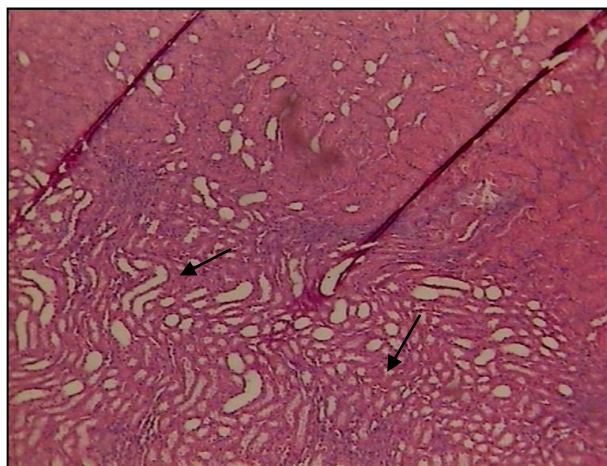
Figure 3.8 : Coupes histologiques du foie chez les rats traités à différentes doses
(Gx100) (Originale 2015).

➤ **Rein :**

L'examen du tissu rénal des rats traités par la dose 500mg/Kg montre une nécrose tubulaire (Fig3.9 b) avec perte de la bordure en brosse du tube contourné proximale comparativement aux témoins sains (Fig3.9 a). Ceci peut être expliqué par l'effet d'une molécule toxique sur les cellules de l'épithélium tubulaire.



1 : tube contourné distale. 2 : tube contourné proximale. 3 : glomérule.
(a) Coupe histologique du rein du rat témoin sain.



(b) Nécrose tubulaire.

Figure 3.9 : Coupes histologiques du rein chez les rats traités par la dose 500mg/kg de poids corporel (Gx100) (Originale 2015).

➤ **Cœur :**

La coupe histologique du cœur des rats traités par la dose 1000 mg/Kg, montre des Plages de nécrose du myocarde (Fig3.10 b), provoquant une perte de striation des fibres myocardiques avec perte de noyaux. Un aspect éosinophile homogène des fibres myocardiques avec perte des noyaux associé a une lésion congestive du cœur est aussi observé au niveau de la coupe réalisée au niveau du cœur des rats traités à la dose 1500 mg/Kg occasionnant une nécrose du myocarde (Fig3.10 c), Comparativement à celle des rats témoins présentant une structure normale (Fig3.10 a).



(a) Fibre myocardique du rat témoin sain.



(b) plage de nécrose du myocarde du rat traité.



(c) nécrose du myocarde associe avec une lésion congestive du cœur.

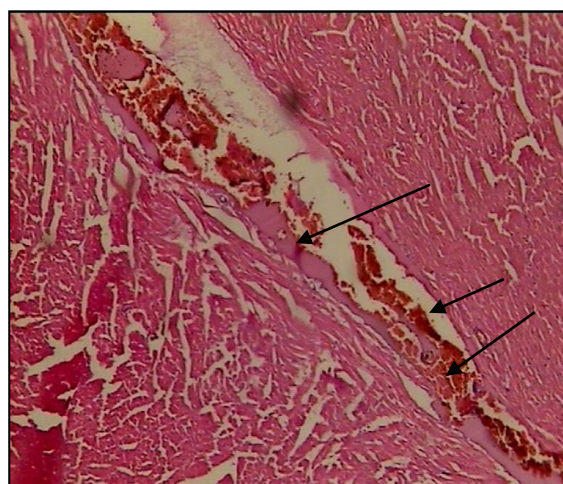


Figure 3.10 : Coupes histologiques du cœur chez les rats traités à différentes doses (Gx100) (Originale 2015).

L'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement, des données biochimiques ainsi que les résultats des examens histologiques. Aucun changement dans le comportement des rats n'a été observé après traitement avec l'extrait aqueux à différentes doses ; le résultat des données biochimiques indique une perturbation du bilan hépatique. Les résultats des coupes histologiques montre la présence d'une vasodilatation dans le foie, une nécrose au niveau du cœur et des reins, et en générale l'absence de mort cellulaires dans les différents organes.

Selon l'échelle de Hodge et Sterner chez les rats de laboratoire, notre plante peut être considéré comme non toxique. Nos résultats correspondent a ceux obtenus avec TAHRAOUI et al, Où différentes doses de l'extrait aqueux par voie orale et intrapéritoniale (1-15 g/Kg de poids corporel et 1-14 g/Kg de poids corporel respectivement) ont été testés sur des souris.

La faible toxicité d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers paraît dose-dépendante et pourrait être due à la présence des alcaloïdes [105].

Les études de la toxicité d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers sont très limitées. Une seule étude a été trouvée discutant la toxicité aigue et subaigüe de l'extrait aqueux de la plante et une autre sur la toxicité aigue de quelques composants isolés de la plante sans aucune étude histopathologique [67][96].

5.2. Activité antioxydante

La mesure de l'absorbance effectuée par spectrophotométrie à 515 nm a permis le calcul du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH selon la formule donnée au paravent. Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 3.10. Une faible valeur d'IC₅₀ indique une forte activité antioxydante [106].

Tableau 3.10 : Activité antioxydante des extraits de la plante d'étude.

Extrait	IC ₅₀ (mg/ml)
EtOH	0,517
BuOH	7,276
Ac Ascorbique	0,093

Les valeurs exprimées en moyenne de 3 mesures

Selon les résultats, l'E-EtOH est doté d'un pouvoir antioxydant significativement plus important que l'E-BuOH ($P < 0,05$), leurs IC₅₀ respectives sont : 0,517 et 7,276 mg/ml. Ce pouvoir est relativement faible par rapport à celui de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,093 mg/ml.

Il est prouvé que les molécules antioxydantes telles que : l'acide ascorbique, les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le radical DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène [91].

Les composés phénoliques ont de bons potentiels antioxydants selon des mécanismes d'actions différents : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxyde, alkoxydes et peroxydes soit par l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres [107]. Les travaux menés par SEFI et al., [97] sur l'extrait aqueux lyophilisé indiquent un pouvoir antioxydant de l'extrait avec une capacité de piégeage de radical superoxyde grâce aux enzymes : superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase. Une autre étude sur deux iridoïdes isolés et purifiés : Swertiamarin et Swiroside (terpènes) montre un pouvoir antioxydant très intéressant [108].

L'effet scavenger augmente avec l'augmentation de la concentration des polyphénols dans l'extrait ce qui suggère une relation entre l'effet antioxydant d'un extrait et la qualité et la quantité des polyphénols qui y sont présents [102][104]. Ceci explique le faible pouvoir anti radicalaire de la fraction n-butanolique, et suggère un synergisme entre les polyphénols et d'autres composants dans l'extrait éthanolique.

5.3. Activité antimicrobienne

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien, les extraits éthanolique et n-butanolique sont testés contre quatre souches bactériennes (gramme positif et négatif) et deux champignons.

La sensibilité des microorganismes aux extraits est déterminée selon le diamètre de la zone d'inhibition par la méthode de la diffusion sur gélose. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 3.11.

Tableau 3.11 : Activité antimicrobienne des extraits.

Extrait	Concentration (mg/ml)	Souches					
		<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A.brasiliensis</i>
		Zones mm					
	300	15,66±0,57	14,66±0,57	13,66±0,57	14,0±0,00	NA	NA
EtOH	600	20,66±2,30	16,66±0,57	14,33±1,52	14,66±1,15	NA	NA
	900	19,66±0,57	18,00±0,00	13,00±0,00	15,66±0,57	NA	NA
	300	09,66±0,57	15,66±0,57	14,33±0,57	15,00±1,00	NA	NA
BuOH	600	13,33±3,05	18,66±1,15	14,66±0,57	15,66±1,52	NA	NA
	900	14,00±4,58	19,66±1,52	14,66±1,52	16,66±1,15	NA	NA
DMSO		00	00	00	00	00	00

NA : Non Active. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET, n=3

Aucune zone d'inhibition n'est observée vis-à-vis de *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Ce phénomène microbiologique peut être expliqué pour certains microorganismes, en particulier les champignons, par leurs aptitudes à dégrader les composés phénoliques, et qui leurs servent de substrats carbonés. Ces derniers favorisent leurs croissances [109].

L'activité antimicrobienne de l'E-EtOH, la plus élevée a été enregistrée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 20,66 mm à la concentration 600mg/ml (Fig 3.8); suivi par l'*Escherichia coli* avec un diamètre 18,00 mm.

L'E-EtOH est faiblement actif vis-à-vis *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition respectivement de 15,66 mm et 14,33 mm.

Dans le cas de l'E-BuOH (Fig 3.9) ; la meilleure zone d'inhibition, a été notée avec l'*Escherichia coli*. La concentration de 900mg/ml a donné une zone d'inhibition de 19,66mm, après *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* et dernièrement *Staphylococcus aureus*.

Généralement les diamètres des zones d'inhibition obtenues avec les bactéries gram positifs sont plus importants que ceux obtenus avec les bactéries gram négatifs, ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (+) et Gram (-) (les bactéries Gram (-) possèdent une couche additionnelle qui se compose de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides) [75].

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne influe sur les résultats. La méthode de diffusion à partir des puits sur la gélose est la mieux adaptée pour étudier l'activité de l'extrait que la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé [110].

Nos résultats ont montré que l'E-EtOH et E-BuOH, possèdent une activité face à ces deux souches *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et à des concentrations différentes (300,600 et 900 mg/ml). Plusieurs travaux scientifiques ont confirmé l'absence de l'activité antibactérienne de la petite centaurée contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* en appliquant des concentrations plus faibles [10]. Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en composés polyphénoliques. Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs. Selon CHABOT et al.,[111] l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle.

D'autre part, MORI et al., [112] ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne. Les travaux antérieurs de SARKER et al., [113], montrent également que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement.

L'activité des principes actifs serait liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante. D'autre part, Il semble également que le broyage est à l'origine de la génération de la chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles [114].

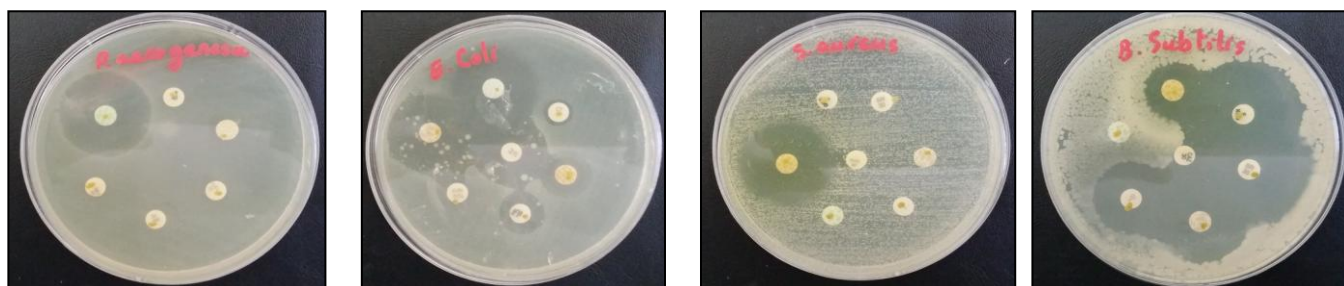
***P. aeruginosa******E. coli******S. aureus******B. subtilis***

Figure 3.11: AntibioGramme (Original 2015).

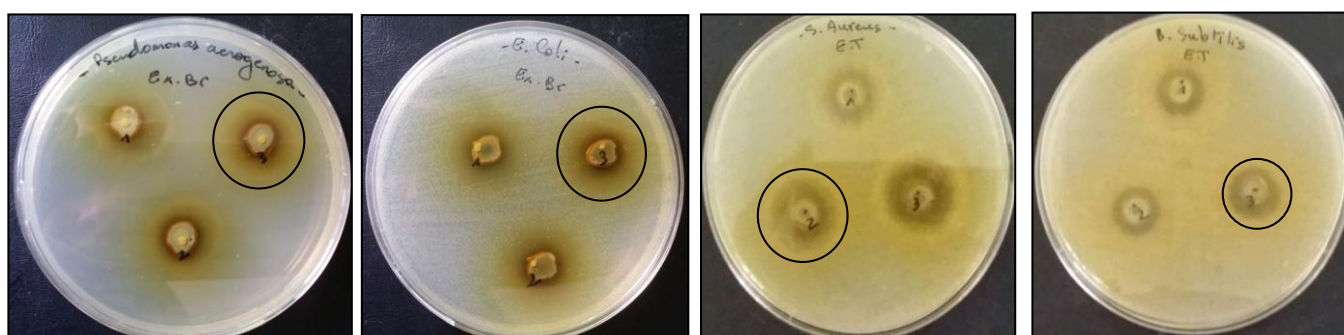
***P. aeruginosa******E. coli******S. aureus******B. subtilis***

Figure 3.12: Activité antibactérienne de l'E-EtOH (Original 2015).

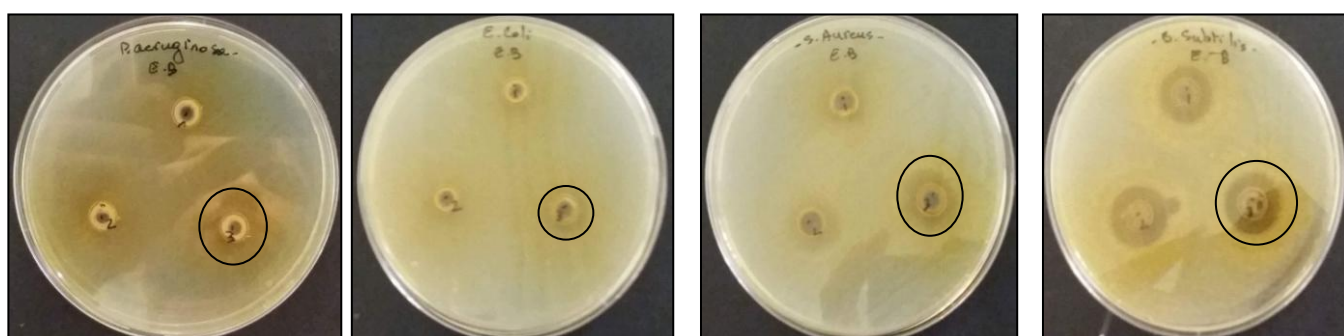
***P. aeruginosa******E. coli******S. aureus******B. subtilis***

Figure 3.13 : Activité antibactérienne de l'E-BuOH (Original 2015).

5.4. Activité antipyrétique

L'hyperthermie a été induite chez les rats par l'administration sous cutanée de la levure de bière à 20%. Le tableau 3.12 regroupe les résultats de l'activité antipyrétique.

Tableau 3.12 : Effet des différents traitements sur la fièvre induite par la levure de bière.

Groupe	Température (°C)					
	T ₀	T ₁₈	T ₁₉	T ₂₀	T ₂₁	T ₂₂
Non traité	37,45±0,10	38,15±0,46	38,22±0,41	38,42±0,30	38,55±0,37	38,57±0,33
Paracétamol 150	37,22±0,83	38,35±0,42	38,00±0,45	37,90±0,36	37,86±0,30	37,52±0,61
100	37,60±0,53	38,32±0,55	38,57±0,62	38,25±0,60	38,17±0,58	38,90±0,41
E-Aq 200	37,45±0,81	38,30±0,16	38,27±0,50	38,20±1,25	37,82±0,73	37,70±0,59
300	37,87±0,76	39,00±0,37	39,20±0,35	38,95±0,80	38,35±0,81	38,80±0,60
100	37,12±0,62	37,85±0,17	38,35±0,49	38,20±0,21	38,05±0,50	37,90±0,45
E-BuOH 200	37,80±0,35	38,72±0,59	38,87±0,45	38,82±0,83	38,50±0,48	38,80±0,94
300	37,60±0,61	38,45±0,64	38,37±0,60	38,12±0,61	38,00±0,76	37,77±0,73

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET, n=5

Le traitement à l'aide du paracétamol à la dose 150mg/Kg de poids corporel conduit à une diminution de la fièvre par rapport au groupe témoin non traité. L'administration de l'E-Aq à la dose 200 mg/Kg et de l'E-BuOH à la dose 300 mg/Kg de poids corporel provoquent un déficit de la fièvre, comparable à celle du médicament de référence. Cet effet est prolongé dans le temps.

L'étude statistique n'a révélée aucune différence significative dans la comparaison des différents groupes. Sachant que dans ce test, une élévation de 0,5°C est suffisante pour débiter l'activité, la diminution de la température ne sera pas au delà de 01°C c'est pour cette raison qu'aucune différence significative n'a été obtenue. En comparaison avec le lot de rats traité par le paracétamol, on constate comme même qu'il existe une diminution de la fièvre avec les lots traités par les extraits.

Très peu d'études existent pour ce type d'activité. La seule citée est celle de BERKAN et al., [115] où une forte activité antipyrétique de la plante a été constaté.

5.5. Activité analgésique

5.5.1 Test de torsion (Writhing test)

L'injection intra-péritonéale d'acide acétique chez les rats provoque un syndrome douloureux qui, se traduit par des contorsions caractéristiques de type de mouvement d'étirement des pattes postérieures et de la musculature dorso-ventrale. Le nombre d'étirements est comptabilisé pendant 20 minutes à partir de la première contorsion qui fait suite à l'injection d'acide acétique. Les résultats obtenus sont cités dans le tableau 3.13.

Tableau 3.13 : Effet des différents traitements sur la douleur induite par l'acide acétique.

Groupes	Dose (mg/Kg)	Nombre de torsion	% d'inhibition
Témoin sain	—	307,20 ± 15,10	—
Paracétamol	150	167,80 ± 06,94 ^a	45,37
	100	172,00 ± 02,12 ^a	11,45
E-Aq	200	173,80 ± 03,63 ^a	43,42
	300	149,80 ± 09,88 ^a	51,23
E-BuOH	100	155,20 ± 12,07 ^a	49,47
	200	103,60 ± 12,93 ^{a, b}	66,27
	300	081,25 ± 16,75 ^{a, b}	73,55

Les valeurs représentent la moyenne ± ET ; n=5 ; ^a p < 0,001 Lorsque les groupes traités sont comparés au groupe non traité. ^b p < 0,001 Lorsque les différents groupes traités sont comparés au groupe Paracétamol.

L'E-BuOH aux doses 200 et 300 mg/Kg réduit significativement le nombre de torsions induites par l'acide acétique, chez les rats, en comparaison avec les rats du lot non traité et ceux du lot traité par le paracétamol. Le nombre de crampes est de $307,2 \pm 15,10$ pour les rats du lot non traité. Il est de $103,6 \pm 12,93$ ($P < 0,001$) et de $81,25 \pm 16,75$ ($P < 0,001$) pour l'E-BuOH aux doses respectives de 200 et 300 mg/kg et de $167,8 \pm 6,94$ pour le paracétamol.

Le meilleur pourcentage d'inhibition est obtenu avec l'E-BuOH à la dose 300 mg/Kg, il est bien plus important que celui obtenu avec le paracétamol, médicament de référence. L'E-Aq à la dose 300 mg/Kg a donné un pourcentage d'inhibition de 51,23 en comparaison avec les deux autres doses testées, à savoir 100 et 200 mg/Kg de poids corporel.

Le traitement avec l'E-BuOH, provoque une diminution importante des torsions abdominales induites par l'acide acétique, chez les rats testés. Cet effet peut être induit par les flavonoïdes présents dans notre extrait, jouant par conséquent, un rôle analgésique. Cette analgésie périphérique est supérieure à celle du paracétamol, surtout pour la dose 300 mg/Kg de poids corporel.

Les résultats obtenus, ne concordent pas avec ceux obtenus par BERKAN et al [115], ou aucune activité analgésique n'est obtenue, en utilisant l'extrait aqueux de la même plante, sur plusieurs animaux de laboratoire.

Le mécanisme d'action au niveau périphérique pourrait s'apparenter à celui du paracétamol, en bloquant la transmission des messages douloureux aux centres supérieurs du contrôle de la douleur. L'activité antalgique est importante avec l'E-BuOH qui est riche en flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des inhibiteurs de la 5-lypo oxygénase, donc de la production des prostaglandines et des leucotriènes, qui sont médiateurs de l'inflammation et des manifestations allergiques [116]. L'activité antalgique pourrait aussi être due en partie, à la présence de flavonoïdes, dans l'extrait de la partie aérienne, de la petite centaurée.

5.5.2. Test de la plaque chauffante

L'activité antalgique centrale des E-Aq et E-BuOH de la petite centaurée est évaluée, en testant leurs effets sur la douleur induite, par un stimulus thermique (la plaque chauffante) chez les rats. Pour ce type de test, seuls les analgésiques centraux tels que l'aspirine ou le paracétamol augmentent le temps de latence [117]. Les résultats découlant de cette étude figurent dans le tableau 3.14.

Tableau 3.14: Effet des différents traitements sur la douleur induite par la plaque chauffante.

Groupes	Temps (S)			
	0	30	60	90
Non traité	5,00±0,00	5,00±1,00	5,33±0,57	6,00±1,00
Paracétamol 150	6,33±3,21	7,00±1,00	10,00±4,35	11,33±4,61
E-Aq				
100	5,66±0,57	6,66±2,08	6,33±1,52	6,66±0,57
200	5,66±1,00	6,00±1,00	9,33±1,52	11,00±2,00
300	6,66±2,88	9,66±3,51	12,33±2,51*	12,66±4,72
E-BuOH				
100	5,66±1,52	6,00±1,00	8,00±4,35	9,00±2,64
200	5,33±1,15	5,66±1,15	6,66±0,57	9,33±2,08
300	6,66±1,52	7,00±1,00	11,33±3,51	15,33±5,5*

Les valeurs représentent la moyenne ± ET ; n=5 ; p < 0,05.

En comparant les différents groupes des rats traités (paracétamol, E-Aq et E-BuOH) au groupe témoin non traité, nous remarquons, qu'au delà de 60 minutes et après administration des produits, les temps de latence des animaux recevant l'E-Aq et E-BuOH à différentes concentrations, ainsi que celui des sujets recevant le paracétamol à 150 mg/Kg de poids corporel, sont significativement supérieurs ($p < 0,05$) au temps de latence dans le groupe témoin.

Les travaux de SAYYAH et al [118] démontrent que les stimuli thermiques sont sélectivement inhibés par les analgésiques centraux, et non pas aux analgésiques périphériques chez les rats. Nous avons utilisé le paracétamol, dont l'action centrale est prouvée selon l'Institut UPSA de la douleur (2010), dans notre étude pour vérifier cette hypothèse. L'E-Aq à la dose 300 mg/Kg de poids corporel ainsi que l'E-BuOH à la même dose, ont augmenté significativement le temps de latence sur la plaque chauffante ; révélant une activité analgésique centrale. Cette activité est légèrement supérieure à celle obtenue avec le médicament de référence.

Les résultats obtenus ne concordent pas avec ceux obtenus par BERKAN et al [115]. Ces derniers ne signalent aucune activité analgésique obtenue en utilisant l'E-Aq de la même plante sur plusieurs animaux.

Discussion générale

La recherche ethnobotanique de plantes médicinales basée sur la consultation d'une base de données PHARMACOPEE. Les plantes médicinales de la région de M'Sila sont classé dans un répertoire selon la pathologie. L'IFC le plus haut est noté avec l'inflammation. Parmi les plantes anti-inflammatoires qui ont un UV élevé : *Erythraea centaurium* (L.) Pers.

La plante a été récolté en Mai 2014, dans la région de M'Sila. L'identification botanique a été faite au niveau du département des sciences de la nature et de la vie, université de M'Sila. Une partie de la plante fraîche a subi une étude macroscopique sur une loupe binoculaire pour une éventuelle description des différentes parties de la plante, et une étude microscopique sur un microscope adapté à une caméra pour la mise en évidence des différentes couches cellulaires de la tige et la feuille. Le résultat de cette étude nous montre que la petite centaurée constitue de plusieurs couches cellulaires qui servent comme cites de réserve des substances.

Après séchage, la partie aérienne a subi deux types d'extractions : une hydrodistillation et extraction par différents solvants. L'hydrodistillation au cleverger donne un rendement en huile essentielle (HE) : 0,03%. Vu ce faible rendement et le nombre des activités à réaliser, les HE ont été négligé de notre recherche.

L'extrait éthanolique (E-EtOH) est obtenu par soxhlet en utilisant l'éthanol comme solvant. L'extrait butanolique (BuOH) est une fraction de l'E-EtOH en utilisant le n-butanol comme solvant d'extraction. L'extrait aqueux (Aq) est obtenu par la méthode traditionnelle : infusion.

Le rendement le plus important est le rendement de l'E-EtOH : 25,43%, Aq : 22,50% et ButOH : 07,68%, cette différence due au solvant et la méthode d'extraction qui était à chaud.

L'analyse qualitative et quantitative des extraits nous donne une idée générale sur la composition de la petite centaurée. Le screening phytochimique de l'E-Aq montre la présence de différents constituants à savoir : Polyphénols, Flavonoïdes, Alcaloïdes, Tanins galliques, Saponosides, Coumarines, Stérols et triterpènes et

l'absence des tannins cathéchique. L'analyse chromatographique sur couche mince a été effectuée sur une série des systèmes solvant. Le système Acétate d'éthyl /Méthanol /Eau (A /M/E) donne deux taches avec l'E-EtOH et trois taches avec l'E-BuOH. cette différence est expliqué par la complexité de l'E-EtOH qui est un extrait brut difficilement à séparer lors de la migration.

Le taux des phénols totaux a été déterminé à l'aide de réactif Folin Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme standard. Les teneurs en polyphénols totaux ont montré que l'extrait brut aqueux (E-Aq) contient 11,21 µg EAG/ mg d'Extrait et une teneur de 143,98 µg EAG/ mg d'Extrait pour la fraction n-butanolique. Cette différence est par le maintien que l'extrait brut de la plante contient tout les composant de la plante par contre la fraction est riche d'une classe de polyphénols.

La quantification du contenu flavonoïque a été estimée par la méthode de trichloride d'aluminium, en utilisant la Quécétine comme standard. Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes ont révélé que l'E-Aq contient 4,25 µg EQ/mg d'Extrait et la fraction n-butanolique contient 42,47 µg EQ/mg d'Extrait. Cette différence confirme que le n-butanol capte la majorité des flavonoïdes, donc la fraction n-butanolique est très riche en flavonoïdes.

La toxicité a été effectuée sur des rats wistar. Les rats ont été traité avec l'E-Aq a différentes concentrations : 500, 1000, 1500 mg/Kg de poids corporel. Après les trois jours de traitement, aucun changement morphologique ni mortalité ont été enregistré. Selon ce résultat on constate que la DL₅₀ de la petite centaurée est inférieur à 1500mg/Kg de poids corporel. Ces résultats confirment l'innocuité de la forme traditionnelle d'utilisation (infusion) de la petite centaurée.

Le quatrième jour après traitement, les rats expérimentés ont été sacrifiés. Le sang a été récupéré dans des tube héparine pour le dosage biochimique du et les organes (foie, reins et cœur) ont été pesés et conservé dans le formol à 10% pour les coupes histologiques. L'analyse biochimique du sang a montre un déséquilibre au niveau du bilan hépatique. Ce résultat suggère que l'extrait aqueux d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers provoque des effets directs sur le foie. La confirmation de ce résultat sera faite grâce à l'étude histologique de foie. Le bila rénal ne présente aucune différence significative comparativement avec le lot sain.

Les résultats des coupes histologiques montre la présence d'une vasodilatation dans le foie, une nécrose au niveau du cœur et des reins, et en générale l'absence de mort cellulaires dans les différents organes. La faible toxicité d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers paraît dose-dépendante et pourrait être due à la présence des alcaloïdes.

L'activité antioxydante a été effectuée par le test de DPPH. L'E-EtOH est doté d'un pouvoir antioxydant significativement plus important que l'E-BuOH, leurs IC₅₀ respectives sont : 0,517 et 7,276 mg/ml. L'effet scavenger augmente avec l'augmentation de la concentration des polyphénols dans l'extrait ce qui suggère une relation entre l'effet antioxydant d'un extrait et la qualité et la quantité des polyphénols qui y sont présents. Ceci explique le faible pouvoir anti radicalaire de la fraction n-butanolique, et suggère un synergisme entre les polyphénols et d'autres composants dans l'extrait éthanolique.

L'activité antimicrobienne a été testée sur six souches de la collection internationale ATCC. Deux bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Deux bactéries Gram négatif : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Une levure : *Candida albicans* et un champignon : *Aspergillus brasiliensis*. La sensibilité de ces souches a été testée contre plusieurs antibiotiques et un antifongique. Les extraits EtOH et BuOH ont été testés par la méthode de puits et le diamètre d'inhibition a été calculé à l'aide d'un pied à coulisse après 24h pour les bactéries et 3 à 7 jours pour les levures. Aucune zone d'inhibition a été observée vis-à-vis les champignons. Ce phénomène microbiologique peut être expliqué pour certains microorganismes, en particulier les champignons, par leurs aptitudes à dégrader les composés phénoliques, et qui leur servent de substrats carbonés. Ces derniers favorisent leurs croissances. L'E-EtOH donne résultat mieux que l'E-BuOH cette différence est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens.

L'activité antipyrétique consiste à vérifier l'action inhibitrice des extraits (Aq et BuOH) sur la fièvre provoquée chez les rats par l'injection sous cutanée d'une solution de la levure de bière à 20% sur les rats. Après le traitement avec l'E-Aq et BuOH par différentes concentrations (100, 200, 300mg/Kg p.c), aucune différence

significative a été enregistré comparativement au témoin traité par le médicament de référence (paracétamol).

Deux types d'activité analgésique ont été testés :

Activité analgésique périphérique (test de torsion) consiste à vérifier l'action inhibitrice des extrait Aq et BuOH par l'injection intrapéritoniale de l'acide acétique sur les rats après 30 min du traitement avec les différentes doses (100, 200, 300mg/Kg p.c), des deux extraits Aq et BuOH, le nombre de torsion a été calculé pendant 20 min. Le traitement avec l'E-BuOH, provoque une diminution importante des torsions abdominale. Cette analgésie périphérique est supérieure à celle du paracétamol, surtout pour la dose 300 mg/Kg de poids corporel. L'activité antalgique pourrait aussi être due en partie, à la présence de flavonoïdes, dans l'extrait de la partie aérienne, de la petite centaurée.

Activité analgésique centrale (test de plaque chauffante) en utilisant un stimulus thermique et on calcule le temps ou le rat soute ou lèche ces pieds après 30, 60, 90 et 120 min du traitement. . L'E-Aq à la dose 300 mg/Kg de poids corporel ainsi que l'E-BuOH à la même dose, ont augmenté significativement le temps de latence sur la plaque chauffante ; révélant une activité analgésique centrale. Cette activité est légèrement supérieure à celle obtenue avec le médicament de référence.

CONCLUSION

La phytothérapie peut être considérée comme médecine alternative, ou au moins comme complément à la pharmacie classique. La nécessité de trouver de nouveaux traitements demeure une priorité pour la santé publique.

Actuellement, l'Algérie est un pays riche en termes de biodiversité. L'usage des pharmacopées traditionnelles reste toujours une pratique utilisée par une partie de la population. Ces usages représentent des remèdes pour soigner plusieurs pathologies. Les plantes locales sont à l'origine de nouvelles molécules, qui servent pour plusieurs traitements.

L'objectif de notre étude porte sur la valorisation d'une plante médicinale issue de la biodiversité végétale de la région du Hodna. Le choix de la plante s'est fait grâce à la consultation d'une banque de données issues d'enquêtes ethnobotanique menées dans la Wilaya de M'Sila de 2008 à 2012. L'évaluation pharmacologique s'est faite selon le résultat des enquêtes ethnobotanique.

Dans le but d'une confirmation botanique, La plante étudiée *Erythraea centurium* (L.) Pers a subi une identification morphologique et anatomique.

La petite centaurée a été soumise à une extraction par solvants et un fractionnement par le n-butanol pour la condensation de la fraction flavonoïdique.

L'analyse phytochimique qualitative s'est faite par les tests préliminaires et la chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits. Les résultats obtenus ont confirmés la présence de plusieurs molécules ayant un rôle cruciale dans l'activité biologique tels que : les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins.

L'évaluation quantitative du contenu en polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de la plante par la méthode Folin Ciocalteu respectivement indique la présence de teneurs variables en ces composés.

Les résultats sur l'ensemble des tests toxicopharmacologiques des extraits montrent que :

Les données expérimentales de la toxicité chez les rats Albinos Wistar suggèrent de classer *Erythraea centaurium* (L.) Pers dans la catégorie des plantes légèrement toxique par voie orale. L'extrait aqueux de la petite centaurée n'a entraîné aucune modification dans le comportement des animaux traités. Certains paramètres biochimiques liés à la fonction hépatique ont été perturbé. L'observation histologique s'est caractérisée par de légères altérations structurales du foie, des reins et du cœur.

L'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers a été évaluée par l'étude de leurs pouvoir à piéger 50% du radical DPPH (IC₅₀). Les résultats indiquent que l'extrait éthanolique de la plante présente la plus grande activité antioxydante, ce qui suggère que cette activité est en relation avec la quantité de polyphénols présent dans l'extrait.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers par la méthode de diffusion en milieu solide a révélé que les extraits sont non actif sur les champignons. Les extraits éthanolique et n-butnolique possèdent un pouvoir antibactérien dose dépendant sur les souches testées.

Nos résultats indiquent que les extraits de la plante possèdent une faible activité antipyrétique en utilisant la levure de bière comme pyrogène exogène.

Cette étude a permet de démontrer une activité analgésique très significative de la fraction n-butanolique de la petite centaurée par rapport à l'extrait aqueux en utilisant les modèles des douleurs induites par des stimuli chimique et thermique.

L'ensemble des résultats obtenus in vitro et in vivo nous ont permet d'avoir une idée sur la toxicité et les activités biologiques d'*Erythraea centaurium* (L.) Pers, mais d'autres études sont souhaitables.

En perspectives,

Nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- Une identification phytochimique complète des extraits de la plante testée par LC-MS pour identifier les molécules actives.
- Une étude toxicologique complète (toxicité aigue et chronique) sur *Erythraea centaurium* (L.) Pers, afin de déterminer les effets à long terme.
- Une étude relation structure-activité permettra de corrélérer les résultats des tests biologiques avec des structures bien précises responsables de l'activité testés

REFERENCES

1. Quideau, S., «Plant polyphenols», Citable Reviews in the Life Sciences, France, (2013).
2. Macheix, J., Fleuriot, A. et Jay-allemant, C., «Les composés phénoliques des végétaux», Presses Polytechnique et Universitaires Romandes, Lausanne, (2005), p 6.
3. Sari, M., Hendel, N., Boudjelal, B. et Sarri, D., «Inventory of medicinal plants used for traditional treatment of eczema in the region of hodna (M'SILA - ALGERIA)», GJRMI, Volume 1, Issue 4, (April 2012), p 97 – 100.
4. Hendel, H., Larous, L., Sari, M., Boudjelal, A. et Sarri, D., «Place Of Labiates In Folk Medicine Of The Area Of M'sila (Algeria).», GJRMI, (2012), p 315–322.
5. Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A. et Ruberto, G., «Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey», Journal of Ethnopharmacology, (2013), p 395–402.
6. Schawenberg, P. et Paris, F., «Guide des plantes médicinales. Delachaux et Niestlé», (1977).
7. Baba Aissa, F., «Encyclopédie des plantes utiles Flore d'Algérie et du Maghreb», EDAS Librairie moderne Rouiba, (2000), p 368.
8. Waymel, J., Dufay, J. et Zambettakis, C., «plan de conservation de la petite centauree vivace (*Centaureum portense* (Brot.) Butcher) en basse-normandie», ANDRA, Villers-Bocage, conservation botanique nationale de Brest, (2015), p 4-8.
9. Quezel, P. et Santa, S., «Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales», Ed. CNRS, Tom 1, Paris, (1963), p 741-743.
10. Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P.J., Jaspars, M. et Sarker, S.D., «Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaureum erythraea*», Phytomedicine, 10, (2003), p 344–347.
11. Mahmoudi, Y., «La therapeutique par les plantes en Algérie», Palais du livre-Blida, (2011).
12. Dellile, L., «Les plantes médicinales d'Algérie», BERIT édition, Algerie, (2007), p 191-192.

13. Mansar-Benhamza, L., Djerrou, Z. et Hamdi Pacha, Y., «Evaluation of anti-hyperglycemic activity and side effects of *Erythraea centaurium* (L.) Pers. in rats», *Academic Journals*, 12;50, (2013), p 6980-6985.
14. Lorrain, M., «Je reconnais les fleurs. Plaines et collines», Ed. Lesson, (1978), p 195.
15. Bonnie, G. et Douinla, R., «GRANDE FLORE EN COULEURS DE GASTON BONNIER», 3^{ème} éditions Belin, Paris, (1990), p 753-754.
16. Aberham, A., Pieri, V., Croom, Jr.E., Ellmerer, E. et Stuppner, H., «Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC–MS and RP-HPLC», *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2011), p 517–525.
17. Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J. et Younos, C., «Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea», *Journal of Ethnopharmacology*, (1991), p123–143.
18. Berkan, T., Ustunes, L., Lermiogla, F. et Ozer, A., «Antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects of aqueous extract of *Erythraea centaurium*», *Planta Med*, (1991), p 34- 7.
19. Hamdi Pacha, Y., Belkheiri, A., Kerrour, M., Moulahoum, T. et Benchouala, C., «Effet biologique et pharmacologique de *Centaurium erythraea* et *Inula viscosa* sur l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial. Abstract», *Recueil des résumés, Symposium International sur le médicament de Phytothérapie et plantes médicinales Constantine, Algérie*, (2007).
20. Mansar-Benhamza, L., Djerrou, Z. et Hamdi Pacha, Y., «Evaluation of anti hyperglycemic activity and side effects of *Erythraea centaurium* (L.) Pers. in rats», *African Journal of Biotechnology*, (2013), p 6980-6985.
21. Hopkings, W., «PHYSIOLOGIE VEGETALE», 2^{ème} édition, de Boeck, Paris, (2003), p 268.
22. Martin, S. et Andriantsitohaina, R., «Mécanismes de la protection cardiaque vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium», *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, (2002), p 304-315.
23. Li, H. B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., chen, F. et Tian, Y., «Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae», *Food Chimestry*, (2007), p 771-776.

24. Milane, H., «La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques», Thèse de doctorat, Strasbourg, (2004), p 29.
25. Boizot, N. et Charpentier, J.P., «Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier», Cahier des Techniques de l'INRA, (2006), p 79-82.
26. Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen, B.G. et Mathé, G., «Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies», Biomed.Pharmacother, 56, (2002) , p 200-207.
27. Pandey, K.B. et Rizvi, S.I., «Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease», Oxidative Medicine and Cellular Longevity, (2009), p 270-278.
28. Erlund, I., «Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology», Nutr Res, (2004), p 851-874.
29. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A. et Capasso, F., «Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs», Life Sci, (1999), p 337-53.
30. Ghedira, K., «Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique», Phytothérapie, (2005), p 162-169.
31. Ong, K.C. et Khoo, H.E., «Links Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats», Life Sci, (2000), p 1695-1705.
32. Bouclé, S., «Synthèse d'analogues d'alkaloïdes marins à potentiel anti-tumoral», Thèse de doctorat, Université François – Rabelais De Tours, (2010), p 35-45.
33. Kabouche, A., «Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae», Thèse de doctorat, université mentouri constantine, Algérie, (2005), p 40-49.
34. Lhuillier, A., «Contribution A L'étude Phytochimique De Quatre Plantes Malgaches :*Agauria salicifolia* Hook.F Ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa Trichophylla* Baker (Monimiaceae) Et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae)», Thèse de doctorat, l'institut national polytechnique de Toulouse, France, (2007), p 49.
35. Diallo, A., «Etude De La Phytochimie Et Des Activitees Biologiques De *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE)», Thèse de doctorat de Bamako

- Faculté de Médecine de Pharmacie Et d'Odonto-Stomatologie , Mali , (2005), p 55-56.
36. Halliwell, B., «How to characterize a biological antioxydant», *Free RadicRes Commun*, (1999), p 1-32.
 37. Gunstone, F.O. et Norris, F.A., «Lipids in Food-Chemistry, Biochemistry and Technology», Pergamon Press, Toronto, Canada, (1983), p 170.
 38. Hamma, A., «Astudy of Photo-Oxidation of Polypropylenes Composites With Diffrent Cellulosic Reinforcements», Thèse de doctorat, Université Abderrahmane MIRA, Bejaia, (2013), p 50.
 39. Dorman, H. J. D. et Deans, S. G., « Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils », *Journal of Applied Microbiology*, 88, (2000), p 308-316.
 40. Hervé, G., «Physiologie humaine», édition Pradel, 3^{eme} édition, Paris, (2001), p165-167.
 41. Tombo, B., «Etude Phytochimique Et Des Activites Biologiques De *Trichilia emetica* VAHL (MELIACEAE)», Thèse de doctorat de l'université de Bamako Faculté de Médecine et de Pharmacie Et d'Odonto-Stomatologie , Mali, (2003), p 30-57.
 42. Chiolero, A., Würzner, G. et Burnier, M., «Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2: moins d'effets rénaux que les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques?», *Néphrologie*, (2000), p 425-430.
 43. Station météorologique de M'Sila (2014).
 44. <http://www.msila-dz.org>. Site officiel de la wilaya de M'Sila
 45. Emberger, L., « Une classification bioécologique des climats », *Rev. Tra. Géol. Bot. Zool. Fac. Sci . Montpellier*, (1955), p 1-34.
 46. Seghiri, K., « Wilaya de M'Sila par les chiffres », Edition la Plume, (Mars 2015, p 15.
 47. Daget, P., Adhali, L., David, P. et Taillot, F. « Le bioclimat méditerranéen et ses modalités dans les pays arabes », *Biocénoses*, (1988), p 73-93.
 48. Chantal Shalukoma, Ch., Bogaert, J., Duez, P., Stévigny, C., Pongombo, C. et Visser, M., «Les plantes médicinales de la région montagneuse de Kahuzi-Biega en République démocratique du Congo : utilisation, accessibilité et consensus des tradipraticiens», *Bois et foret des tropiques*, 326, (2015).
 49. Prat, R., «Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations», Edition QUAE, Herman éditeurs, Paris, (2007), p 56.

50. Bruneton, J., «Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales», Techniques et documentations, 3^{ème} édition, Paris, (1999), p 227-310-312-313-314.494.
51. Clevenger, J.F., «Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type», American Perfumer & Essential Oil Review, (1928), p 467-503.
52. Anonyme., «Pharmacopée européenne», 4^{ème} édition, Strasbourg, (2002).
53. Afnor., «Recueil de normes : les huiles essentielles», Tome 1, Echantillonnage et méthodes d'analyse, AFNOR, Paris, (2000), p 440.
54. Bimakr, M., Abdul Rahman, R., Taip, F., Ganjloo, A., Salleh, L., Selamat, J., Hamid, A. et Zaidu, I., «Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves», Food and Bioproducts processing, (2011), p 67–72.
55. Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Jay, M., Tillequin, F. et Seguin, E., «A new flavone glycoside from *Centaurea furfuracea*», Fitoterapia, (1999), p 368-370.
56. Boudjelal, A., Siracusa, L., Henchiri, Ch., Sarri, M., Abderrahim, B., Baali, F. et Ruberto, G., «Antidiabetic Effects of Aqueous Infusions of *Artemisia herba-alba* and *Ajuga iva* in Alloxan-Induced Diabetic Rats», Planta Medica, (Mai 2015).
57. Houghton, P. J. et Raman, A., «Laboratory hand book for fractionation of natural extracts», Chapman et Hall, Londres, (1998), p 29-31.
58. Paris, R. et Moyse, H., «Précis de matière médicinale», Paris, Masson, (1969).
59. Trease, E., Evans, W.C., «Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO, 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pomme)», Journal of Medicine and scientific, Nigeria, ISSN, (1987), p 179-182.
60. Diallo, A., «Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineens* Willd. (Myrtaceae)», Thèse de doctorat, (2005), p 60.
61. Seghiri, R., «Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*», Thèse de doctorat de l'université mentouri, Constantine, Algérie, (2009), p 28-48.

62. Markham, K.R., «Techniques of flavonoid identification», Academic Press, London, (1982).
63. Djabou, N., Dib, M., Allali, H., Benderb, A., Kamal, M., Ghalem, S. et Tabti, B., «Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the phenolic composition of Algerian *Arbutus unedo* L. roots», *Pharmacognosy Journal*, (2013), p 275-280.
64. Kumaran, A. et Karunakaran, R.J., «In vitro antioxidant activities of methanol extracts of *Phyllanthus* species from India», *Lebens-Wiss technologie*, 40, (2007), p 344–352.
65. Oduola, T., Adeniyi, F., Ogunyemi, E., Bello, I.S., Idowu, T. et Subair, H., «Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in wistar albino rats», *Medicinal Plants Res*, (2007), p 001-004.
66. Frank, C.L.U., «Toxicologie, Données générales procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque», Paris, (1992), p 73- 202.
67. Tahraoui, A., Israili, Z. et Lyoussi, B., «Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaureum erythraea* in rodents», *Journal of Ethnopharmacology*, (2010), p 48–55.
68. Marque, V., «Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologique», Elsevier Masson, (2010).
69. Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z. et Boucherit, K., «Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie», *Phytothérapie*, (2014).
70. Matkowski, A., Tasarz, P. et Szypuła, E., «Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. », *Journal of Medicinal Plants Research*, (2008), p 321-330.
71. Biyiti, L.F., Meko, D.J.L., Tamez, V. et Amvam Zollo, P.H., «Recherche de l'activité antibactérienne de Quatre plantes médicinales Camérounaise», *Pharm. Med. Trad*, (2004), p 11-20.
72. Abena, A., Kiborl, D. et Bioka, D., «Propriétés Antalgiques Et Antipyrétiques De L'huile Essentielle D'*Ageratum conyzoides*», *IPharm. Méd. trad. Afro*, (1995), p 67-72.
73. Agbonon, A., Aklikokou, K., Akpagana, K. et Gbeassor, M., «Etude Des Propriétés Anti-Inflammatoires De La Racine De *Pluchea Ovals* (Pers.) Dc. (Asteraceae) Chez Le Rat», *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 1, (2001), p 1-11.

74. Sengar, N., Joshi, A., KPrasad, S. et Hemalatha, S., «Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*», *Ethnopharmacology*, (2015), p140–148.
75. Abena, A., Bioka, D., Badila samba, C., Hondi-assah, Th. et Djatewa, M., «Propriété Tranquillisante Et Antalgique Du *Lippia multiflora*», *Pharm. Méd. Trad. Afr*, (1997), p 94-107.
76. Yaya Soro, T., Traore, F. et Sakande, J., «Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae)», *C. R. Biologies*, (2009), p 371–377.
77. Yadav, S., Kulshreshtha, M., Goswami, M., Rao, C. et Sharma, V., «Elucidation of Analgesic and Antipyretic activities of *Ficus bengalensis* linn. Leaves in rats», *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (2011), p 8-41.
78. Hunashal, R.D., Ronad, P.M., Maddi, V.S., Satyanarayana, D. et Kamadod, M. A., «Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity of 2-[4-(substituted benzylideneamino)-5-(substituted phenoxyethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl thio] acetic acid derivatives», *Arabian Journal of Chemistry*, (2014), p 1070–1078.
79. Ali, R., Shah, H., Ullah, I., Anwar, J., Numan, M., Humaira, K., Awan, A. et Sohail, S., «Analgesic, Anti-inflammatory and Antipyretic Activities of Stem Extract of *Zizyphus oxyphylla* Edgew», *World Journal of Zoology*, 10 ;2, (2015), p 107-111.
80. Gardiner, P., «Chamomile (*Matricaria recutita*, *Anthemis nobilis*)», *Longwood Herbal Task Force*, (1999), p1 -20.
81. Habtemariam, S., «Targeting the production of monocytes/macrophages-derived cytokines by anti-inflammatory herbal drugs», *Phytopharmacology*, 4;1, (2013), p 131-148.
82. Orhan, N., Akkol, E. et Ergun, F., «Evaluation of antiinflammatory and antinociceptive effects of some Juniperus species growing in Turkey», *Tübitak*, 36, (2012), p 719-726.
83. Guerin, H.P., Delaveau, P.G. et Paris, R.R., «Localisation histochimique. II : procédés simple de localisation de pigments flavonique. Application a quelques Phanérogames», *Bulltin de la Société Botanique de France*, 118, (1971), p 29-36.
84. Jerković, I., Gašo-Sokač, D., Pavlović, H., Marijanović, Z., Gugić, M., Petrović, I. et Kovač, S., «Volatile Organic Compounds from *Centaureum erythraea* Rafn

- (Croatia) and the Antimicrobial Potential of Its Essential Oil», *Molecules*, 17, (2012), p 2058-2072.
85. Guignard., «Abrégé de botanique», Edition Masson, (1995), p 285.
 86. Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. et Khebri, S., «Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L.», *Lebanese Science Journal*, 11 ;1, (2010), p 69-81.
 87. Boudjelal, A., «Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie.», Thèse de doctorat, université de Badji Mokhtar Annaba, (2013), p 70.
 88. Saab, A. M., Lamprantie, I., Finotti, A., Borgatti, M., Gambari, R., Esseily, F., Safi, S., Diab-assaf, M., Rabenau, H., Cinatl, J. et Doerr., W., «In vitro évaluation of the biological activity of lebanese medicinal plants extracts against herpest simplex virus type 1», *Minerva Biotec*, (2012), p 117-21.
 89. Chda, A., El Kabbaoui, M., Chokri, A., El Abida, K., Tazi, A. et Ben Cheikh, R., «Spasmolytic Action of *Centaurium erythraea* on Rabbit Jejunum is through Calcium Channel Blockade and NO Release», *European Journal of Medicinal Plants*, 11;2, (2016), p 1-13 .
 90. Benhamza, L., «Effets biologiques de la petite centaurée *Erythraea centaurium* (L.) Pers», Thèse de doctorat université mentouri de Constantine, Algerie , (2008), p 87.
 91. Halmi, S., «Etude botanique et phytochimique : approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus indica*», Thèse de doctorat, université Mentouri de Constantine, Algérie, (2015), p 70-80.
 92. Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, B., Seabra, S. et Bastos, L., «Antioxidant Activity of *Centaurium erythraea* Infusion Evidenced by Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity», *Agric Food Chem*, (2001).
 93. Kerief, S., «Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en ouganda activités biologiques et étude chimique

de plantes consommées», Thèse de doctorat, Muséum national d'histoire naturelle, Paris, (2004), p 75-80.

94. Kolai, N., Berkani, A. et Lotmani, B., «Analyse chromatographique (CCM) des flavonoides des feuilles des Citrus en relation avec le taux de contamination de phyllocnistis citrella Staint (Lepidoptera, Gracillariidae)», Thèse de doctorat, (2006), p 82-89.
95. Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R. et Krishna, D.R., «Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential», Indian Journal of Pharmacology, (2001), p 2-16.
96. Bentahar, A., Khenouf, S., Bouaziz, A., Baghiani, A., Dahamna, S., Amira, S. et Arrar, L., «Polyphenols Content and Antioxidant Activities of Selected Algerian Plants Used for Gastro-duodenal Ulcers», Der Pharma Chemica, 8;12, (2016), p 88-99.
97. Sefi, M., Fetouia, H., Lachkara, N., Tahraouib, A., Lyoussib, B., Boudawarac, T. et Najiba Zeghala, N., «*Centaurium erythraea* (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas», Journal of Ethnopharmacology, (2011), p 243-350.
98. Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. et Vidal, N., «Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds», Food Chem, (2006), p 654-660.
99. Medic-Saric, M., Jasprica, I., SmolicBubalo, A. et Momar, A., «Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids», Croatica Chemica Acta , (2013), p 61-366.
100. Rhiouani, H., El-Hilaly, J., Israili, Z.H. et Badiaa Lyoussi, B., «Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents», Journal of Ethnopharmacology, (2008), p 378–386.
101. Wolf, P.L., Williams, D., Tsudaka, T. et Acosta, L., «Methods et Techniques in Clinical Chemistry», John Wiley & Sons, USA, (1972), p 132–196, 375–383.
102. Wang, X., Wei, Z., Yulian, W., Dapeng, P., Awais, I., Xianju, H., Lingli, H., Zhenli, L., Menghong, D., Wen, Z. et Zong-Hui, Y., «Acute and sub-chronic oral toxicological evaluations of quinocetone in Wistar rats», Regul. Toxicol. Pharmacol, (2010), p 421–427.

103. Sacher, R.A. et McPherson, R.A., «Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Test», Pennsylvania, USA, (1991), p 416–443.
104. Raza, M., Al-Shabanah, O.A., El-Hadiyah, T.M. et Al-Majed, A.A., «Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss *albino* mice», *Scientia Pharmaceutica*, (2002), p 135–145.
105. Peyrin-Biroulet, L., Barraud, H., Petit-Laurent, F., Ancel, D., Watelel, J., Chone, L., Hudziak, H., Bigard, M.A. et Bronowicki, J.P., «Hépatotoxicité de la phytothérapie: données cliniques, biologiques, histologiques et mécanismes en cause pour quelques exemples caractéristiques», *Gastroenterol Clin Biol*, (2004), p 540-550.
106. Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. et Kefalas, P., «Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile», *Food Chemistry*, (2005), p 27-36.
107. Hodek, P., Trefil, P. et Stiborova, M., «Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes», *Chem. Biol. Interact*, (2002), p 1-21.
108. Kumarasamy, Y., Nahar, L. et Sarker, S., «Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*», *Fitoterapia*, 74, (2003), p 151–154.
109. Straney, D., Khan, R., Tan, R. et Bagga, S., «Host recognition by pathogenic fungi through plant flavonoids. In: Buselig B, Manthey J, editors. *Flavonoids in cell function*», New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, (2002), p 9-22.
110. Fazeli, M.R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H. et Samadi, N., «Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria», *Food Control*, (2007), p 646-649.
111. Chabot, S., Bel-Rhlid, R., Chênevert, R. et Piché, Y., «Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavono d compounds under CO₂-enriched conditions. », *New Phytologist*, 122, (1992), p 461-467.
112. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. et Tawata, S., «Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. », *Phytochemistry*, 26, (1987), p 2231-2234.

113. Sarker, S.D., Latif, Z. et Gray, A.I., «Natural products isolation.», Humana Press, Totowa, (2005), p 1-23.
114. Jones, W.P. et Kinghorn, A.D., «Extraction of plant secondary metabolites. Natural products isolation. », Humana Press, Totowa, (2005), p 323-411.
115. Berkan, T., Üstünes, L., Lermioglu, F. et Özer, A., «Antiinflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centaurium*», *Planta Med*, 57, (1991), p 3437.
116. Kouakou, S., Kouakou, J., Dally Laba, I. et Brou, J., «Evaluation de l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiacees), une plante médicinale de Côte d'Ivoire», *International Journal of Biological and Chemical Science*, 4;2, (April2010), p 456-463.
117. Paola, S., Mauro, B., Manfredi, B. et Panerai, A.E., «Effects of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in mice», *Pain*, (1997), p 325-330.
118. Sayyah, M.A., Hadidi, N.B. et Kamalinejad, M.B., «Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lacuca sativa* seed extract in rats», *Journal of Ethnopharmacol*, 92, (2014), p 325-329.

Annexe 01

Appareillage, verrerie et consommables

▪ **Appareillage**

- Autoclave
- Ampoule à décanté
- Balance de précision
- Balance de paillasse
- Bec bunsen
- Chambre noire d'une CCM HPTLC (Camag)
- Chauffe ballon 1 L, 2L
- Cryostat
- Cuve CCM
- Etuve isotherme
- Hotte à flux laminaire avec lampe UV
- Hydrodistillateur type Clevenger
- Incubateur bactériologique (25°C, 35°C, 42°C)
- Lampe UV
- Loupe binoculaire
- Micropipettes 10µl, 100µl, 1000µl
- Microscope associé à une caméra (Motic Digital Microscope)
- Microtome
- Pied à coulisse
- Plaque chauffante
- Rotavapor (Buchi461)
- Soxhlet
- Spectrophotomètre UV-1601
- Spectrophotomètre COBA INTEGRA400 Plus
- Vortex

- **Verrerie et consommable**

- Ballon à fond rond 2L, 1L
- Bêchers : 100 ml, 250 ml, 500 ml
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Cartouche en cellulose
- Disques d'antibiotiques
- Écouvillons Stériles
- Eprouvettes
- Erlenmeyer 100 ml, 250 ml
- Fioles
- Flacons avec bouchon
- Papier filtre (Wattman N°3)
- Plaque de silice 60F 254 Merck
- Pincés
- Pipettes Pasteurs
- Seringues
- Spatule inox
- Tubes en verre 5ml, 25ml
- Tubes éparinés
- Verres de montre

Annexe 03

Composition alimentaire des croquettes

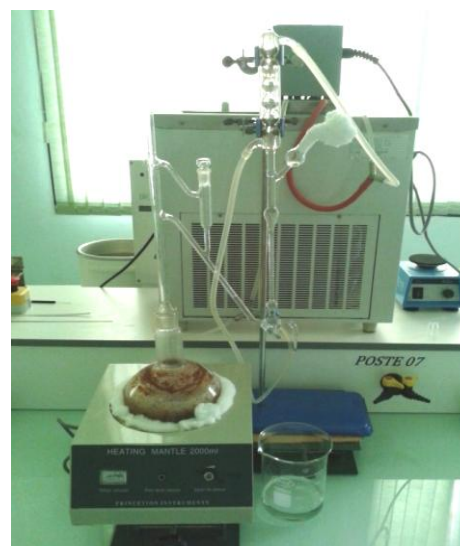
Composants	%
Mais	52,80
Son	10,80
Soja	32,10
Calcaire	01,50
Phosphate	00,80
Compléments vitaminiques	02,00

Annexe 04

Appareils d'extraction



Dispositif soxhlet



Dispositif clevenger

Annexe 05

Tests préliminaires

1. Les Polyphénols

La mise en évidence des polyphénols a été faite grâce à la réaction au chlorhydrique. Quelques gouttes de solution alcoolique de chlorhydrique est ajoutée à 2 ml de l'extrait aqueux de la petite centaurée. Le chlorhydrique provoque en présence des dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration rouge.

2. Les Flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique de la petite centaurée avec 1 ml d'HCl concentré et 0,5 g de copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose orangé se développe après 3 minutes

3. Les Alcaloïdes

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale de la petite centaurée dans 50 ml de H₂SO₄ dilué au 1/10. Après filtration sur un papier filtre, 1 ml du macéré est introduit dans deux tubes à essai puis 5 gouttes de réactif de Mayer ont été ajouté dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner ont été ajouté dans le deuxième. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes.

4. Les Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait éthanolique de la petite centaurée, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. Un test révélé par l'apparition d'une coloration bleu- noire (tanins galliques), bleu-verte (tanins cathéchiques).

5. Les Saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait Aqueux de la petite centaurée, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif

6. Les Coumarines

1 g d'échantillon de la poudre végétal est placé dans un tube à essai en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain marie pendant quelques minutes. Puis on ajoute 0,5 ml de NH₄OH dilué (10%) et on va mettre deux taches sur un papier filtre qui sont examinées sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.

7. Les Stéroïls et Triterpènes

Elle se fait sur une macération de 24 h à 5 % dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec de l'anhydride acétique puis du chloroforme. Déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante était verte ou violette.

Annexe 06

Dosage biochimique

Dosage de l'urée

Echantillon: Sérum

Les réactifs utilisés:

Réactifs	Composition	Concentration
R 1	TRIS pH 7.8	80 m mol/L
Tampon	a-cétoglutarate	6 m mol/L
Etalon	Uréase	750 U/L
	Glutamate déshydrogénase	6000 U/L
	GLDH	0.32 m mol/L
	NADH	
Réactif optionnel	Urée	50 mg/ dl

Préparation des réactifs de travail (RT):

- Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole du réactif R1.
- Mélanger bien jusqu' à la dissolution complète. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8° C ou une semaine à 15-25°C.

Mode Opérateur:

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT(ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (Λ)	-	10	-
Echantillon (Λ)	-	-	10

- Agiter bien les tubes et lire l'absorbance après 30 secondes (A1) et après 90s (A2) à la longueur d'onde 340 nm.

Calcul:

$$[\text{Urée plasmatique}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ étalon}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

Dosage de la créatinine

Echantillon: Sérum

Les réactifs utilisés:

Réactifs	Composition	Concentration
R1	Acide picrique	17.5 m mol/L
R2	Hydroxyde de sodium	0.29 m mol/L
Etalon	Créatinine	02 mg/ dl

Préparation du réactif de travail (RT):

- Mélanger des volumes égaux des réactifs R1 et R2. Ce réactif de travail est stable 10 jours à 15-25° C.

Mode Opérateur:

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (Λ)	-	100	-
Echantillon (Λ)	-	-	100

- Mélanger bien puis lire l'absorbance après 30 sec (A1) et après 90 sec (A2) à la longueur d'onde 492 nm.

Calcul:

$$[\text{Créatinine}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(\Delta A) \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}}{(\Delta A) \text{ étalon} - \Delta A \text{ blanc}} \times 2 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

Dosage des transaminases TGO/TGP

Echantillon: Sérum

Les réactifs utilisés:

Réactifs	Composition	Concentration
R1 a	D-L Aspartate	100 m mol/L
Substrat du TGO	α - cétooglutarate pH 7.4	2 m mol/L
R1 b	D-L Alanine	200 m mol/L
Substrat du TGP	α - cétooglutarate pH 7.4	2 m mol/L
R2 (Révélateur)	2.4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH)	1 m mol/L
Etalon TGO/ TGP	Etalon du pyruvate	1.2 m mol/L
Réactif optionnel	Hydroxyde du sodium (NaOH)	0.4 N

Mode Opérateur:

	TGO	TGP
R1 a (ml)	0.5	-
R1 b (ml)	-	0.5

- Mélanger et incuber les tubes pendant 05 min à 37°C puis ajouter.

Echantillon (μ l)	100	100
------------------------	-----	-----

- Mélanger les tubes et les revenez au bain maire pendant 30min puis ajouter:

R2 (ml)	0.5	0.5
---------	-----	-----

- Agiter et laisser à la température ambiante maire pendante 20 min.

NaOH (ml)	5	5
-----------	---	---

- Mélanger bien et laisser les tubes à la température ambiante pendant 5 min.
- En fin, lire l'absorbance initiale (A) contre l'eau distillé à 505 nm.

Annexe 07

Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Systèmes	Taches	UV à 366nm	Rf
CM	6 taches (EB, ET)	<ul style="list-style-type: none"> • bande bleues pale • bande bleu pale • Tache bleu blanc fluorescent (avec Q) • Jaune (avec Q) • orange • rose (ET) (avec AG) 	0,25 0,31 0,51 0,66 0,77 0,9
DM	3 taches (EB et ET)	<ul style="list-style-type: none"> • bleues claires (avec AG) • bleu pale (Q) • bleu blanc fluorescent (avec Q) 	0,44 0,70 0,82
AAE	5 taches (EB, ET)	<ul style="list-style-type: none"> • bleu blanc fluorescent • verte • jaune (avec Q) • orange (avec AG et Q) 	0,33 0,47 0,6 0,75
AME	3 taches (EB, ET)	<ul style="list-style-type: none"> • Verte • Jaune (avec Q) • bleu Claire (AG et Q) 	-0,58 0,66 0,8
AE	4 taches (EB, ET)	<ul style="list-style-type: none"> • Bleu claire • Bleu pale • Rouge (ET), • rose claire (EB) 	0,37 0,5 0,91 0,73
DA	7 taches (ET) 3 taches (EB)	<p style="text-align: center;">ET :</p> <ul style="list-style-type: none"> • claire • Bleu (avec Q) • Jaune • Claire • Rose • Claire • Rouge <p style="text-align: center;">EB :</p> <ul style="list-style-type: none"> • claire • Bleu pale (avec Q) • Rose claire 	0,23 0,47 0,70 0,68 0,75 0,8 0,87 0,23 0,47 0,81
AFE	Une tache	Bleu claire	0,48
AB	Une tache	Vert vif	0,23

Annexe 08

Dosage des phénols totaux

[E-Aq] mg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO ₁	0,159	0,287	0,433	0,547	0,653	0,790	0,900	1,025	1,134	1,283
DO ₂	0,158	0,296	0,427	0,561	0,664	0,792	0,907	1,027	1,124	1,247
DO ₃	0,158	0,299	0,424	0,556	0,660	0,780	0,915	1,030	1,151	1,260
Moy	0,158	0,294	0,428	0,554	0,659	0,787	0,907	1,027	1,136	1,263

[E-BuOH] mg/ml	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
DO ₁	0,206	0,371	0,534	0,685	0,847	0,959	1,115	1,216	1,361	1,470
DO ₂	0,207	0,388	0,534	0,673	0,820	0,941	1,118	1,274	1,385	1,463
DO ₃	0,218	0,376	0,523	0,678	0,000	0,973	1,101	1,243	/	/
Moy	0,210	0,378	0,530	0,678	0,833	0,957	1,111	1,244	1,373	1,466

Dosage des Flavonoïdes

[E-Aq] mg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO ₁	0,274	0,427	0,598	0,715	0,855	1,073	1,130	1,266	1,384	1,481
DO ₂	0,264	0,436	0,550	0,725	0,839	1,004	1,129	1,266	1,374	1,481
DO ₃	0,294	0,442	0,566	0,749	0,864	1,003	1,129	1,259	1,374	1,493
Moy	0,277	0,435	0,571	0,729	0,852	1,026	1,129	1,263	1,377	1,485

[E-BuOH] mg/ml	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
DO ₁	0,117	0,363	0,557	0,740	0,950	1,120	1,279	1,490	1,679	1,837
DO ₂	0,182	0,381	0,584	0,782	0,967	1,136	1,334	1,510	\	\
MOY	0,149	0,372	0,570	0,761	0,958	1,128	1,306	1,5	1,679	1,837

Annexe 09

Activité antioxydante

[E-BuOH] mg/μl	1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000	9000	10000
DO ₁	0,758	0,693	0,644	0,561	0,536	0,463	0,445	0,356	0,308	0,299
DO ₂	0,775	0,713	0,651	0,587	0,535	0,504	0,443	0,351	0,312	0,342
DO ₃	0,780	0,714	0,656	0,583	0,526	0,489	0,440	0,367	0,325	0,286
Moy	0,771	0,706	0,650	0,577	0,532	0,485	0,442	0,358	0,315	0,309
%	5,74	13,69	20,53	29,46	34,96	40,70	45,96	56,23	61,49	62,22

[E-Aq] mg/μl	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000
DO ₁	0,584	0,404	0,302	0,238	0,166	0,087	0,068	0,064	0,060	0,063
DO ₂	0,588	0,434	0,320	0,217	0,157	0,071	0,070	0,065	0,063	0,060
DO ₃	0,587	0,400	0,309	0,236	0,153	0,089	0,076	0,066	0,062	0,062
Moy	0,586	0,412	0,310	0,230	0,158	0,082	0,071	0,065	0,061	0,061
%	23,42	46,07	59,42	69,89	79,31	89,26	90,70	91,49	92,01	92,01

Annexe 10

Test des antibiotiques sur les souches bactériennes

Souches	Antibiotiques						
	L	TMP	SR	OFX	IN	OX	AUG
Staphylococcus aureus	–	–	–	–	30	–	–
	DA	DO	CRY	P	FT	K	AUG
	–	–	–	–	–	–	–
E. coli	TMP	TCC	PRL	FT	CT	C	AX
	27	–	13	15	8	2	2,4
	CAZ	IPM	AUG	AMC	NET	IN	CS
	–	4	1	–	7	2	1
Bacillus subtilus	IN	OFX	SR	TMP	L	OX	CAZ
	18	30	30	26	22	–	–
	FT	K	DO	DA	ERY	P	FT
	15	10	26	22	30	–	16
Pseudomonas aerogerosa	C	CT	AX	TCC	PRL	TMP	/
	–	–	–	–	–	–	/
	IPM	K	CS	AUG	AM	NET	/
	28	–	–	–	–	–	/