

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLEB de Blida
Faculté des sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en biologie

Option : Phytothérapie et Santé

Thème

**Etude phytochimique et activités
biologiques des extraits d'*Artemisia herba
alba* de la région de Ghardaïa**

Présenté par :

Soutenu le : 12/ 12/ 2013

RABAHI Samia

Devant le jury composé de :

M ^{me} KHETTAR	MAA	USDB	Présidente
M ^{me} KEBBAS S.	MAB	USDB	Examinatrice
M ^{me} AYADI R.	MCA	USDB	Examinatrice
Mme BENMANSSOUR N	MAA	USDB	Promotrice
Mme BENASSEL N.	MAB	USDB	Co-promotrice

Année universitaire 2012/2013

Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donnés pour mener ce travail à terme.

Nous commençons par exprimer nos profondes reconnaissances et nos vifs remerciements à Mme BENMANSSOUR N. qui nous a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. Merci de nous avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; on ne peut, Madame, que sincèrement vous exprimer notre respect et notre gratitude.

A notre Co-promoteur M^{me} BENASSEL N Maitre assistante- chargée de cours à l'université de BLIDA,, pour sa générosité et sa grande patience

On tient à remercier Mme KHETTAR N. d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail, qu'elle trouve ici toutes nos expressions respectueuses.

On tient à remercier M^{me} KEBBAS S., d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de notre travail. On tient à vous remercier pour tout ce que vous nous avez apporté tout au long de nos études.

Nous exprimons nos profonds remerciements à Mme AYADI R, d'avoir accepté de juger ce modeste travail, trouvez ici toutes nos expressions respectueuses.

Nos remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire de pharmacologie- toxicologie du groupe SAIDAL antibiotical de Médéa .

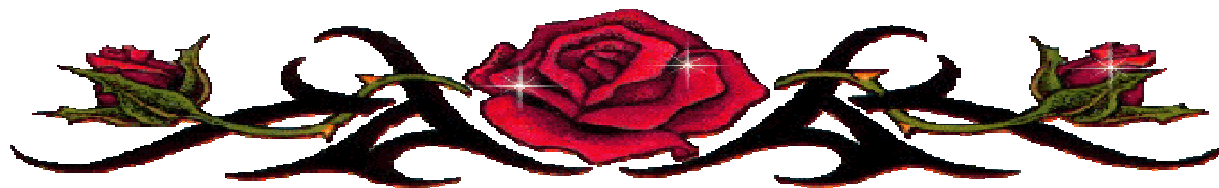
J'exprime également mes remerciements à :

Messieur Fouad Zouambia , pour l'analyse physico chimique.

M BOUKHATEME pour son aide.

Tout le personnel du laboratoire d'hygiène de Blida .

Nos sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicace

Je tiens à dédier ce travail :

À mes très chers parents, pour leur affection, leurs sacrifices, leur tendresse et pour tous les efforts qu'ils ont déployé durant toute ma vie, j'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect.

À mes sœurs : Hassiba et son mari Ismail, Souhila et son mari Karim, Souraya, qui m'ont encouragé à aller de l'avant tout au long de mes études.

À mes frères : Smain, Madjid, Aissa, Elhacen et Hocine pour leurs encouragements et leur aide précieuse.

À mes nièces : Mohammed, Abdelkader, Aida, Razen, Nadjet Fareh, Anness

À toute ma famille maternelle et paternelle.

À mes collègues et mes amis : Amina, Meriem, Zaho, Zola, Imano, Hayet, Ilhem, Ismail, pour les sympathiques moments que nous avons passé ensemble.

À ma promotion 2013/2014 sans exception.

À toutes les personnes que je n'ai pas citées mais que je porte dans mon cœur.

Samia.R



Liste des tableaux

<i>N° de tableau</i>	<i>titre</i>	<i>Page</i>
Tableau I	Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe (D'après Heim et al., 2002)	8
Tableau II	Prélèvement des germes cibles.	25
Tableau III	Identification et détermination des caractères biochimiques des Bactéries Gram- (Krieg et al., 1984 et Holt et al., 1994).	Annexe – II
Tableau IV	Identification et détermination des caractères biochimiques des Bactéries Gram+ (Krieg et al., 1984 et Holt et al ; 1994).	Annexe – II
Tableau V	Répartition des lots et leur soumission au test de l'effet antispasmodique.	32
Tableau VI	Résultats de tests phytochimiques d' <i>A herba alba</i> .	35
Tableau VII	Résultats de dosage des flavonoïdes condensés dans l'extrait aqueux d' <i>A herba alba</i> .	36
Tableau VIII	Valeurs des IC50 de l'acide ascorbique et l'extrait aqueux d' <i>A herba alba</i> .	37
Tableau IX	Pourcentages d'inhibition de l'œdème des pattes des souris en fonction du temps	Annexe V

Liste des figures

<i>Figure</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
Figure 1	Photo originale d'un buisson d' <i>Artémisia herba alba</i> .	2
Figure 2	Effets biologiques des poly-phénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).	6
Figure 3	Structure générale du noyau des flavonoïdes (D'après Heim et al., 2002)	7
Figure 4	Réaction des flavonoïdes avec les EOR (Densiov et Afanas., 2005)	10
Figure 5	Structure de base de Diclofenac (Voltarène®)	17
Figure 6	Mode d'action des extraits contre les bactéries.	21
Figure 7	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	28
Figure 8	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique et l'extrait aqueux d' <i>A herba alba</i>	36
Figure 9	Cinétique du pourcentage de réduction de l'œdème	38
Figure 10	Pourcentage de protection des spasmes de spasmodyl et de l'extrait aqueux d' <i>A herba alba</i> .	39
Figure 11	Sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait éthanolique d' <i>A herba alba</i> .	43

Liste des abréviations

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens

C.P.C : Coprocultures

C.R : Crachats

DPPH : 2.2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

ECBU : Examen cyto bactériologique des urines

ERO : Espèces réactives d'oxygène

IC50 : Concentration inhibitrice de 50 %.

INA : Institut national d'agronomie

MH : Milieu Muller Hinton

NMRI : Naval Medical Research Institute.

PA : Pus d'abcès

S.B : Sécrétions bronchiques

SOD : Système enzymatique antioxydant

RL : radicaux libres

Glossaire

Balance antioxydants/pro-oxydants : balance entre la quantité de radicaux libres produits par des mécanismes internes ou externes, et la capacité de destruction des systèmes antioxydants qu'ils soient apportés par l'alimentation ou produits par les cellules.

Apoptose : (ou la **mort cellulaire programmée**) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal.

Ischémie : C'est une insuffisance artérielle aiguë, liée à une obstruction artérielle, qui peut être soit distale par embolie à partir d'une plaque d'athérome ulcérée, soit proximale par obstruction d'un gros tronc artériel.

Reperfusion : sont les dommages de tissu causés quand l'approvisionnement de sang revient au tissu après une période d'ischémie ou manque de l'oxygène.

Protéines chélatrices : Le « *chélate* » se distingue du simple « *complexe* » par le fait que le cation métallique est fixé au chélateur par au moins deux liaisons de coordination définissant un cycle avec le métal, à la manière d'une pince, d'où le nom.

Thrombose : est un caillot de sang qui se forme dans une veine (thrombose veineuse) ou une artère (thrombose artérielle). La coagulation du sang se produit lorsque la circulation sanguine est ralentie par une immobilisation du membre (jambe) ou par un obstacle (athérome).

Alzheimer : maladie chronique du cerveau, d'origine inconnue mais probablement multifactorielle, considérée comme représentant la forme principale des démences répertoriées.

Les drogues immunosuppressives : ou les **agents immunosuppressifs** sont des drogues qui empêchent ou empêchent l'activité du système immunitaire.

La polyarthrite rhumatoïde : est un rhumatisme, la forme la plus grave de polyarthrite chronique et la plus douloureuse, qui est aussi potentiellement la plus invalidante, car elle risque de bloquer les mouvements (ankylose) et de déformer les articulations.

Résumé

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques.

Dans la présente étude nous avons tenté d'évaluer l'activité anti-oxydante, anti-inflammatoire et antispasmodique de l'extrait aqueux et de l'activité antibactérienne d'extrait alcoolique préparé à partir de la partie aérienne de l'Armoise blanche (*Artemisia herba alba*).

Le criblage préliminaire (test phytochimique) basé sur des tests spécifiques a conclu en une présence de substances ayant de grandes valeurs thérapeutiques (flavonoïdes, tanins et coumarines).

L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux (par la méthode au trichlorure d'aluminium) a montré que l'extrait aqueux est riche en ces composés.

L'évaluation quantitative du pouvoir piègeur du radical libre de DPPH confirme que l'extrait aqueux d'*A. herba alba* possède une activité anti-oxydante modérée, avec une IC50 de l'ordre de 18.59 mg/ml.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de la plante, à la dose de 200 mg/ml, est comparable à celle de Diclofénac, avec une réduction significative de l'œdème provoquée par la carraghénine.

L'extrait aqueux à la concentration de 200 mg/ml montre une activité antispasmodique importante.

L'évaluation du pouvoir antibactérien d'extrait alcoolique par la méthode de diffusion dans un milieu solide montre que l'extrait éthanolique possède une activité antibactérienne marquée sur les 15 souches bactériennes étudiées.

Mots clés : *A. herba alba*, Extraits, screening phytochimique, Flavonoïdes, DPPH.

Abstract

The natural extracts of plants contain a variety of phenolic compounds to which various biological activities are allotted.

In the present study we tried to evaluate the activity antioxydant, anti-inflammatory drug and antispasmodic of the aqueous extract and antibactérienne the alcoholic activity of extract prepared starting from the air part of Armoise white (*Artémisia bleached on grass alba*).

The preliminary sifting (test phytochimic) based on specific tests concluded in a presence from substances having great therapeutic values (flavonoïdes, tannins and coumarins).

The quantitative estimate of the total flavonoïdes (by the trichloride method of aluminum) showed that the aqueous extract is rich in these compounds.

The quantitative evaluation of the capacity trapper of the free radical of DPPH confirms that the aqueous extract of *A. herba alba* has a moderate antioxydant activity, with a IC50 of about 18.59 mg/ml.

The anti-inflammatory drug activity of the aqueous extract of the plant, with the amount of 200 mg/ml, is comparable with that of Diclofénac, with a significant reduction of the edema caused by the carraghénine.

The aqueous extract with the concentration of 200 mg/ml watch an important antispasmodic activity.

The evaluation of the alcoholic capacity antibactérien of extract by the method of diffusion in a solid medium shows that the extract ethanolic has a antibactérienne activity marked on all the studied bacterial strains.

Key words: *A. herba alba*, Extraits, screening phytochimic, Flavonoïdes, DPPH.

ملخص

المستخلصات النباتية الطبيعية تحتوي على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية التي تحتوي على مجموعة متنوعة من الأنشطة البيولوجية.

في هذه الدراسة حاولنا تقييم النشاط المضاد للأكسدة ، والمضاد للالتهابات و المضاد للتشنج للمستخلص المائي والكحولي و النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص المعد من الجزء العلوي للشيح الأبيض.

الفرز الأولي (الاختبار النباتي) يتركز على أساس اختبارات محددة ، يستنتج وجود مواد علاجية قيمة

(الفلافونويد والعفص و الكومارين)

أظهر التقدير الكمي من مجموع الفلافونويد (الأسلوب ثلاثي كلوريد الألومنيوم) أن المستخلص المائي غني بهذه المركبات.

التقييم الكمي للقدرة على كسح الجذور الحرة DPPH يؤكد أن المستخلص المائي للشيح الأبيض له نشاط المضادة للأكسدة معتدل مع IC50 حوالي 18.59 ملغ / مل.

النشاط المضاد للالتهابات للمستخلص المائي للنبات ، بجرعة 200 ملغ / مل مماثل لـ ديكلوفيناك ، مع

انخفاض كبير في الانتفاخات الناجمة عن الكاراجينان.

أظهر المستخلص المائي بتركيز 200 ملغ / مل نشاط مكافح تشنجي مهم .

تطور النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص الكحولي من خلال طريقة نشر البيكتيريا في الوسط الصلب

يدل على أن مستخلص الإيثانول لديه نشاط مضاد للجراثيم ملحوظ على جميع السلالات البكتيرية المدروسة.

الكلمات الرئيسية : الشيح الأبيض، مستخلص ، فحص الكيمائي النباتي ، الفلافونويد ، DPPH .

sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Rappels Bibliographiques	
I-1-Généralité sur l' <i>Artemisia herba alba</i>	2
I-1-1- Description botanique	2
I-1-2- Classification botanique	2
I-1-3- Caractéristiques écologiques	3
I-1-4- Utilisation d' <i>Artémisia herba alba</i>	4
I-2- Principes actifs des plantes médicinales	5
I-2-1- Composés du métabolisme primaire.....	5
I-2-2- Composés du métabolisme secondaire.....	5
I-2-2-1- Polyphénols	5
I-2-2-2- Flavonoïdes	7
I-3- Activités biologiques.....	11
I-3-1- Activité antioxydante.....	11
I-3-1-1- Radicaux libres.....	11
I-3-1-2- Antioxydant	14
A-Principaux antioxydants	14
A-1- Antioxydants endogènes.....	14
A-2- Antioxydants exogènes	14
I-3-2- Activité anti-inflammatoire.....	15
I-3-2-1- Inflammation	15
I-3-2-2-Anti-inflammatoires utilisés.....	17
I-3-3- Activité antibactérienne	18
I-3-3-1 - Entérobactéries	18
I-3-3-2--Mode d'action contre les bactéries	21
I-3-3-3-Activités antibactériennes des poly-phénols	22
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
II-1-Matériel.....	23
II-2-Méthodes.....	25
II-2-1-Préparation des extraits.....	25
II-2-2- Screening phytochimique.....	26
II-2-3- Dosage des flavonoïdes	27
II-2-4-Evaluation des activités biologiques	28
II-2-4-1- Activité anti-oxydante (<i>in vitro</i>)	28
II-2-4-2-Activité anti-inflammatoire (<i>in vivo</i>)	29
II-2-4-3- Activité antispasmodique (<i>in vivo</i>)	31

II-2-4-4-Activité antibactérienne	32
II-2-5- Etude statistique	34
Chapitre III : Résultats et Discussion	
III-1-Résultat de l'étude phytochimique	35
III-2-Dosage des flavonoïdes	35
III-3-Etude des activités biologiques.....	36
III-3-1-Activité anti-oxydante	36
III-3-2-Activité anti-inflammatoire.....	38
III-3-3-L'activité antispasmodique	39
III-3-4-L'activité antibactérienne.....	41
Conclusion	44
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

L'organisation mondiale de la santé (**OMS, 2001**) estime qu'un taux de 50% de la population mondiale fait appel à la médecine traditionnelle.

Elle encourage des programmes de recherche portant sur l'identification et la culture des plantes médicinales ainsi que l'évaluation de la qualité et de l'efficacité de ces remèdes par des techniques scientifiques modernes (**OMS, 2001**).

Dans ce domaine, l'Algérie recèle d'importantes potentialités en matière de plantes aromatiques et médicinales, en raison de la diversité de son climat et de la nature de ses sols. Dans les régions du sud de l'Algérie, certaines plantes médicinales sont relativement abondantes dans les régions steppiques.

Les gains que pouvait procurer la valorisation de ces plantes sont énormes mais leur exploitation n'a pas été entreprise de façon sérieuse jusqu'à présent. Pourtant, l'industrie pharmaceutique est à la recherche des composés biologiques intéressants, extraits à partir de ces plantes et notamment les huiles essentielles, qui pouvaient compléter ou remplacer les produits chimiques déjà utilisés.

Parmi les plantes aromatiques douées de propriétés curatives potentiellement intéressantes qui occupent une grande place en Algérie, il y'a l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*) qui est utilisée contre de nombreuses pathologies (**Trabut, 1988**) aménorrhées, syndromes neurologiques, troubles hépatiques, troubles gastriques et certains empoisonnements. Toutefois, peu de travaux scientifiques en Algérie sont consacrés à l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de cette dernière (**Bielle, 1935 ; Deysson, 1967**).

La mise en évidence de la qualité, et l'efficacité des extraits d'*Artemisia herba alba* *in vitro* et *in vivo* par :

- Une identification des composants chimiques d'*Artemisia herba alba*.
- Analyse quantitative du contenu en flavonoïdes de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba*.
- Evaluation de l'activité anti-oxydante, anti-inflammatoire et antispasmodique de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba*.

Et évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique d'*Artemisia herba alba*.

Notre travail sera reparti en trois parties, initié par des rappels théoriques à partir d'une recherche bibliographique approfondie. La seconde partie rapporte les méthodes analytiques

I-1-Généralité sur l'*Artemisia herba alba*

I-1-1- Description botanique

A. herba alba Asso, est une plante ligneuse, se présentant sous forme de buissons blancs laineux de 30 à 80 cm de hauteur (Barel et Ramendo., 1980). Elle pousse généralement en touffes de tailles réduites fragmentées par le piétinement des animaux et l'action érosive du vent (Aidoud., 1983).

La tige porte des expansions latérales des rameaux et des feuilles. Les feuilles sont de taille très réduite de 3 à 5 folioles par feuille, elles sont blanches, laineuses, courtes et généralement pubescentes argentées (Quezel et Santa., 1963) (Figure 1).

Les fleurs sont jaunes groupées en capitules. Le fruit est un akène indéhiscent ne contenant qu'une seule graine.



Figure 1: Photo originale d'un buisson d'*Artémisia herba alba*.

I-1-2- Classification botanique

Le genre *Artemisia* est représenté par 4 espèces dont trois se localisent dans le Sahara: *Artemisia-compretis* L, *Artemisia herba alba* et *Artemisia judaïca* L, alors que la quatrième espèce *Artemisia arborescence* se retrouve généralement dans le Nord du pays.

D'après Deysson (1967), l'*Artemisia herba alba* est classée comme suit:

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophytes ou Phanérogames.

Sous embranchement : Angiospermes.

Classe: Dicotylédones.

Sous classe : Gamopétales.

Ordre : Astérales.

Famille : Composées ou Asteraceae.

Sous famille : Radiées.

Classe : Dicotylédone.

Genre : *Artémisia*.

Espèce : *Artemisia herba alba* Asso.

L'Armoise blanche est aussi appelée Absinthe ou Armoise (**Bielle., 1935**) et tire son nom de *Artemisia maritima galica*. Elle est connue en Algérie sous les noms de: *Chih, Ifsi, Zezzare, Izri* et *armoise* (**Quezel et Santa., 1963**).

Quezel et al (1994) ont attribué une nouvelle nomination à l'Armoise blanche: *Artémisia inculta*.

I-1-3- Caractéristiques écologiques

A.herba alba constitue en général un ourlet autour de la zone alfatière et sa colonisation commence là où s'écoulent les eaux de ruissellement dans les ravineaux de pluie (**Killian., 1948**).

Les conditions écologiques de l'Armoise sont les suivantes (**Aidoud., 1983 et Djibaïli., 1984**):

- Elle est adaptée à la sécheresse. Cette adaptation se traduit par le polymorphisme des feuilles dont la taille est très variable. De plus, une organisation spéciale lui permet de limiter au maximum la transpiration.
- Bioclimat : principalement aride frais parfois semi-aride frais.
- Pluviosité : comprise entre 100 et 300 mm, en moyenne elle est égale à 220 mm
- Altitude : comprise entre 400 et 1300 m moyenne, elle est égale à 1000
- Les sols se caractérisent par une diminution essentielle du taux de sable en corrélation avec une augmentation de limons et d'argiles.

I-1-4- Utilisation d'*Artémisia herba alba* :

Le pouvoir antiseptique, antibactérien, antifongique ou antiparasitaire d'*Artemisia herba alba* et de ses huiles essentielles leur a conféré une application dans de nombreux domaines en thérapeutique, en industrie agro-alimentaire et en cosmétologie (**Kurita et Koike., 1982, Banquour., 1984 et Lattaoui., 1989**).

I-1-4-1-Dans le domaine thérapeutique

A.herba alba est utilisée en médecine traditionnelle depuis l'antiquité. Ses propriétés emménagogues incitent les femmes à l'utiliser pour provoquer les règles en cas de retards ou d'aménorrhées, elle est donc contre indiquée chez la femme enceinte. En Chine, elle est utilisée pour régulariser le cycle menstruel et stopper leurs douleurs (**Fournier., 1977**). Elle est aussi vermifuge d'où son utilisation contre les parasitoses intestinales et les troubles digestifs (**Belaïche., 1979**)

Ses propriétés toxiques et antispasmodiques la recommande dans les syndromes neurologiques et psychiatriques: (hypotension, syncope, épilepsie, dyspepsies), dans les affections du foie et de la vésicule biliaire (**Leclec., 1983**). Elle peut être employée comme apéritif, diurétique, stimulant de la digestion car elle est douée d'une propriété stomachique. En Chine, dans plusieurs pays Européens et en Algérie, elle est employée en usage externe dans le traitement des rhumatismes, de la goutte, des aphtes, des mycoses et contre les piqûres d'insectes et de scorpions (**Baba Aïssa., 1991**).

Toutefois, elle doit être utilisée avec beaucoup de prudence et à des faibles doses car des doses trop élevées peuvent causer des intoxications très graves voir mortelles (caractérisées par une hépato-néphrite à prédominance rénale accompagnée de phénomènes convulsifs) causés par certains composés cétoniques, α -thuyone, β -thuyone et camphre (**Valnet., 1984**)

I-1-4-2 Dans le domaine alimentaire

Par ses caractères organoleptiques, *Artemisia herba alba* peut être utilisée pour aromatiser certaines boissons comme le café et le thé dans le Sud des pays du Maghreb. Toutefois, son emploi reste tout de même limité à cause de la toxicité des α et β thuyones contenus dans les huiles essentielles (**Aghaei et al., 2011, Zouari et al., 2010, Houari et Ferchichi., 2009**).

I-1-4-3- Dans le domaine cosmétique

En parfumerie, les huiles essentielles de *l'Artemisia herba alba* sont utilisées pour leur pouvoir antiseptique et aromatique. Elles servent à augmenter la durée de conservation des produits cosmétiques tout en leur assurant une odeur agréable (**Beylier-Manuel., 1976**).

Aussi, l'activité des huiles essentielles associées à celle d'autres agents antimicrobiens représente un terrain d'investigation intéressant pour la conservation des produits cosmétiques (**Bouhlal et al., 1989**).

I-2- Principes actifs des plantes médicinales

La capacité d'un remède (à base des plantes) à influencer les fonctions du corps humain est due à ses différents composants. Il s'agit pour la plupart du temps des produits du métabolisme de la plante qui d'un point de vue chimique peuvent appartenir aux groupes de substances les plus variés (**Kothe, 2007**).

I-2-1- Composés du métabolisme primaire

I-2-1-1- Polysaccharides

Les polysaccharides les plus importants sont les polysaccharides des algues (mucilage) et les polysaccharides hétérogènes (gommes) présents dans les racines, les feuilles et les grains. Utilisés pour calmer et protéger les tissus enflammés.

Certains polysaccharides, comme les glucomannanes et les pectines sont utilisés en cosmétologie (**Iserin ,2001**).

I-2-1-2- Glucosides cyanogéniques

Ces substances soient à base de cyanure, un poison très violent, prises à petites doses, elles ont un effet sédatif et relaxant sur le cœur et les muscles (**Iserin, 2001**).

I-2-1-3- Glucosinolates

Ils sont des composés hétérosidiques anionique responsables des odeurs fortes, sont présent uniquement dans les espèces de la famille des moutards et des choux. Appliqués comme cataplasme sur les articulations douloureuses, ils augmentent le flux sanguin dans la zone irritée, favorisant ainsi l'évacuation des toxines. Le radis et cresson de fontaine sont des plantes glucosinolates typiques (**Bruneton, 1993**).

I-2-2- Composés du métabolisme secondaire

I-2-2-1- Polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes (**Bahorun, 1997**), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina., 2002**).

A- Classification

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes (**Dacosta, 2003**) :

- Les flavonoïdes
- Les tanins
- Les stilbènes
- Les lignanes et les coumestanes
- Les saponines (triterpénoïdes)
- Les phytostérols et les phytostanols

B- Biosynthèse

Les poly-phénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique
- Celle issue de l'acétate

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

C-Effets biologiques

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques intervenant dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Bahorun, 1997**). (**Figure 2**)

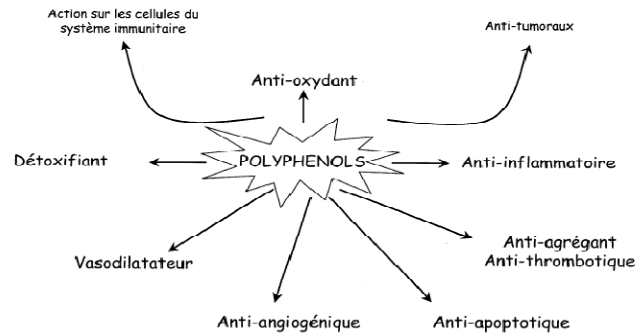


Figure2 : Effets biologiques des poly-phénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux, anti-allergènes, vasodilatateurs et antioxydants (Falleh *et al.*, 2008).

I-2-2-2- Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des poly-phénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (Pietta., 2000 ; Ghedira., 2005).

I-2-2-2-1- Structure et classification

De nos jours, plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (Figure 3) (Bruneton., 1999; Pietta., 2000).

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

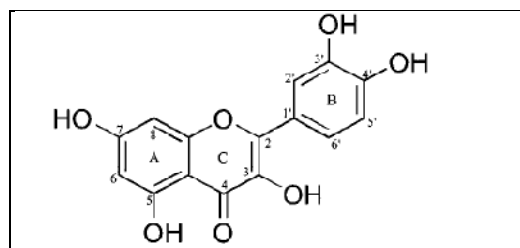


Figure 3 : Structure générale du noyau des flavonoïdes (D'après Heim et al., 2002).

Tableau I : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe (D'après Heim et al., 2002).

Classe	structure générale	flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoose 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7'-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH
Flavanone (dihydroflavon)		myricetin tamarixetin naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe 5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoose
Isoflavone		genistin genistein daidzine daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

I-2-2-2-2- Localisation, distribution et biodisponibilité

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes. Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les

fleurs, les graines et l'écorce (**Lee et al., 1994**). Les flavonoïdes sont trouvés dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants (**Schewe et Sies., 2003**).

La majorité des flavonoïdes apportés par l'alimentation sont sous forme glycosylée, ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (**Ishii et al., 2003**). La plus part des flavonoïdes aglycones sont hydrophobes et peuvent donc traverser passivement les membranes biologiques. Alors que la liaison d'un groupement glucidique à un composé phénolique diminue son hydrophobicité et limite sévèrement sa diffusion passive (**Williamson et al., 2000**). Il semblait alors que l'absorption des flavonoïdes glycosylés ne pouvait pas avoir lieu au niveau de l'intestin grêle. Cependant, Hallman et ses collaborateurs (1995 et 1997) ont montré chez l'Homme que l'absorption des formes glycosylées de la quercétine administrées oralement étaient plus importantes (52%) que celle de la quercétine aglycone (24%). Ces auteurs ont alors suggéré que la partie glucidique associée aux flavonoïdes facilite leur passage dans les entérocytes *via* le système de transport des glucides (**Hallman et al., 1997**).

I-2-2-2-3- Effets biologiques et pharmacologiques

Les flavonoïdes pourraient être à l'origine des vertus préventifs et curatifs de plusieurs plantes médicinales. La principale propriété, initialement attribuée aux flavonoïdes, est d'être vasculoprotectrices et venotoniques, car ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (**Bruneton., 1999**). Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmaco biologiques comme entre autres des effets, antivirales, antimicrobiens et anticancéreux (**Narayana et al., 2001 ; Seyoum et al., 2006**) antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépato protecteurs (**Middleton et al., 2000**). Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels.

I-2-2-2-4- Activité antioxydante des flavonoïdes

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à :

a- leur capacité de piéger directement les RL,

b- de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR *via* les réactions de Fenton et Haber-Weiss,

c-d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases,

d-d'activer les enzymes antioxydantes.

e-de réduire les radicaux α - tocophéryl (Cotelle 2001; Lin et Weng., 2006 ; Heim *et al.*, 2002).

a-Piégeage direct de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires.

À cause de leur faible potentiel redox (Javanovic *et al.*, 1994), les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermo dynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ($R\bullet$) comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alkoxyde et le $OH\bullet$ par transfert d'hydrogène (Figure 4).

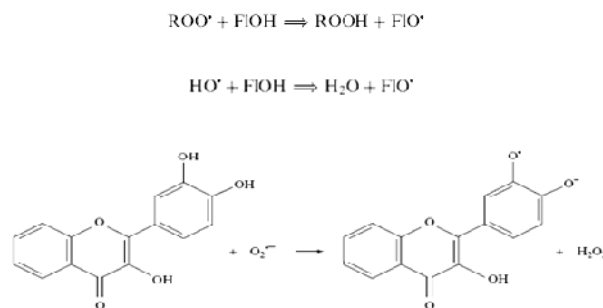


Figure 4 : Réaction des flavonoïdes avec les EOR (Densiov et Afanas., 2005)

b- Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, Cu pour la ceruloplasmine, Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon les réactions de Fenton et Haber Weiss (Cottelle., 2001). Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Morris., 1995 ; Brown., 1998).

c- Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du O_2^- et d'autres EOR, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipoxygénase, monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transferase et la NADH (Pietta., 2000 ; Densiov et Afanas., 2005).

I-3- Activités biologiques

I-3-1- Activité antioxydante

I-3-1-1- Radicaux libres

Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

A- Définition

La majeure partie de la toxicité de l'oxygène provient de la formation de radicaux libres. Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant un à une autre molécule: ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

B-Principaux radicaux libres et leurs origines

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**). Il existe des espèces radicalaires libres dérivés de l'oxygène : anion superoxyde (O_2^-), radical hydroxyle (**OH**), radical hydroperoxyde (**HO2**), radicalperoxyde (**RO2.**) , radical alcoxyde (**RO.**) , et des espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène : peroxyde d'hydrogène (**H2O2**), acide hypochloreux (**HOCl**), Ozone (**O3**), Oxygène singulet (**1O2**), peroxydinitrite (**ONOO⁻**) (**Bonnefont-rousselot et al., 2003**).

C- Rôle des radicaux libres

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre (**Favier, 2003**).

Ces radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (**Favier, 2003**), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (**Ardestani et Yazdanparast 2007**).

Dans les circonstances anormales la balance antioxydant, pro-oxydant et en déséquilibre, ceci est dû par le déficit en antioxydant ou par suite d'une super production énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant.

D- Stress oxydant

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. L'organisme peut avoir à faire face à une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée, qui sera observée dans les intoxications aux métaux lourds, les ischémies/reperfusions suivant des thromboses (**Favier, 2003**), le dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale ; l'activation de systèmes enzymatiques ; la libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules (**Pincemail, 2002**).

Les radicaux libres sont produits pendant l'irradiation, par la lumière UV, par rayons X et par les rayons γ , sont des produits des réactions métal-catalysées ; sont présent comme des polluants dans l'atmosphère ; sont produits par des neutrophiles et des macrophages pendant l'inflammation ; sont des sous-produits des réactions mitochondrie-catalysées de transport d'électron et d'autres mécanismes (**Valko et al., 2006**).

L'ingestion d'alcool est suivie par la formation de radicaux libres, également des antibiotiques, des anticancéreux. L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme (**Mohammedi, 2006**). Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant (**Pincemail, 2002**).

Généralement, le stress oxydant sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme (**Favier, 2003**).

E- Conséquences du stress oxydant

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information .

(Koechlin-Ramonatxo, 2006)

La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines. Les EOR sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine. Les EOR sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques.

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN, mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les EOR attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycane du cartilage.

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des foetus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression (**Favier, 2003**).

F- Maladies liées au stress oxydant

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies :

cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

I-3-1-2- Antioxydant

L'antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (**Diallo, 2005**).

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Diallo, 2005**).

A-Principaux antioxydants

A-1- Antioxydants endogènes

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone) et de protéines (transferrine, ferritine)

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (**Pincemail, 2002**).

A-2- Antioxydants exogènes

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes : médicament et antioxydant naturel.

A-2-1- Médicaments

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

A-2-2- Antioxydants naturels

-La vitamine C ou acide ascorbique

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

-La vitamine E ou tocophérol

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

-Le sélénium

Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

-Le β -carotène

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

-Les flavonoïdes

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

-Les tanins

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

-Les coumarines

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxydes, superoxydes et peroxydes.

-Les phénols

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (Diallo, 2005).

I-3-2- Activité anti-inflammatoire**I-3-2-1- Inflammation**

La réponse inflammatoire est une réponse adaptative engendrée en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé. Une régulation défectueuse peut engendrer des dommages irréversibles. Une réponse insuffisante conduit à une immunodéficience pouvant entraîner une infection secondaire ou même un cancer. Exacerbée, au contraire, elle augmente la morbidité et la mortalité dans des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le diabète. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme *via* la

circulation sanguine. Elle peut alors conduire à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, parfois à un choc septique entraînant dans les cas les plus graves le décès (Nathan, 2002; Barton, 2008).

La réponse inflammatoire se déroule en quatre étapes : la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (Barton, 2008). En absence d'une résolution, s'installe une inflammation chronique.

A- Inflammation aigue

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Charles *et al.*, 2010), se constitue en trois phases :

a- Phase vasculaire

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes. Elle est due à l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine.

b- Phase cellulaire (recrutement des leucocytes)

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place (environ 6 heures) sont les polynucléaires. Le plus souvent, les polynucléaires sont progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes. Parmi celles-ci, les macrophages ont pour fonction d'assurer la déterision grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (Nathan, 2002).

c- Phase de résolution

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les PMNs, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaire sont phagocytés par les macrophages.

Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire.

B-Inflammation chronique

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, et dans l'inflammation granulomateuse.

I-3-2-2-Anti-inflammatoires utilisés

I-3-2-2-1- Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont définis comme étant la classe de médicaments qui possèdent les mêmes propriétés pharmacologiques que l'acide acétylsalicylique (Aspirine®) : analgésique, antipyrétique, anti-inflammatoire.

Les AINS ont une action symptomatique rapide. Ils permettent de réduire les signes locaux d'une réaction inflammatoire : douleur, rougeur, chaleur, œdème et impotence fonctionnelle qui peuvent en résulter.

Les AINS inhibent principalement le métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclo-oxygénase. Cependant d'autres effets doivent être évoqués, en particulier la diminution, de la migration cellulaire, du métabolisme oxydatif, ainsi que des actions sur divers constituants du tissu conjonctif (protéoglycane, glycoprotéine, collagène).

➤ Structures d'AINS (Diclofenac)

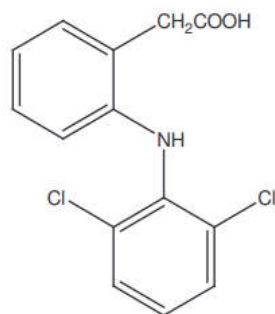


Figure 5: Structure de base de Diclofenac (Voltarène®)

I-3-2-2- Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les AIS ou glucocorticoïdes sont des médicaments utilisés contre l'inflammation, dérivés d'hormones naturelles sécrétées par le cortex surrénale ou hémisynthétisés à partir d'extraits animaux ou végétaux.

L'utilisation des glucocorticoïdes a déjà une longue histoire depuis que Hench a administré la cortisone à 21 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde en 1948.

L'on sait maintenant mieux apprécier les risques de cette thérapie et l'on possède des composés plus actifs et moins dangereux (**Coyen., 1981**).

Les glucocorticoïdes sont utilisés soit à titre substitutif pour suppléer une défense surrénalienne, soit à dose pharmacologique où les propriétés anti-inflammatoires immunosuppressives sont recherchées. Les glucocorticoïdes sont des stéroïdes et comme toutes les molécules de cette famille, ils agissent en se liant à des récepteurs ou en partie à l'albumine. La présence d'un hydroxyle en fonction 11 β est essentielle pour l'activité glucocorticoïde. Les glucocorticoïdes sont peu solubles dans l'eau. Ils inhibent fortement la réaction inflammatoire précoce et ses manifestations cliniques connues d'où leur grand succès en thérapeutique (**Neuwinger., 1996**).

I-3-3- Activité antibactérienne

I-3-3-1 - Entérobactéries

A- Généralités

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par **Rahn en 1937** qu'il dénomma *Enterobacteriaceae* et dans lequel il rassemble les genres bactériens déjà décrits tels : *Escherichia*, *Salmonelle*, *Klebsiella*, *Shigella*. (**Joly et Reynaud ; 2003**)

Le nom d'entérobactérie avait été donné à cette famille parce que beaucoup des membres qui la composent sont des hôtes du tube digestif mais cette localisation n'est pas exclusive chez l'homme et les animaux. On en isole du sol et des végétaux qui sont même le gîte habituel de certaines espèces. (**Leminor. ; 1989**)

La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs. (**Avril et al ; 1992**)

Ce sont des bacilles à gram négatif dont la plus part sont mobiles grâce à des flagelles disposés de manière péritriches, ils cultivent facilement en milieu usuel et sont aéro-anaérobies facultatifs comme toutes les bactéries à gram négatif, ils possèdent au niveau de leur paroi lipopolysaccarédique qui porte sur sa partie polysaccharidique des antigènes appelées O. les flagelles portent des antigènes appelées H. certaines espèces possèdent aussi des antigènes capsulaires de nature polysaccharidique (antigène K), tous ces antigènes ont de structure très variable. (Nauciel ; 2000)

Plusieurs processus métaboliques caractérisent cette famille bactérienne, il s'agit notamment de la capacité de réduire les nitrates en nitrites(en vue de générer de l'énergie), de fermenter le glucose, de ne pas avoir le cytochrome oxydase. (Mirabaud ; 2003).

Les entérobactéries sont responsables de deux grands types de manifestations pathologiques : pathologie spécifique telle la typhoïde avec *Salmonella typhi* ou d'une pathologie opportuniste notamment dans le cadre des infections nosocomiales (Denis et al ; 2007)

Les genres : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, font l'objet de notre étude, on les isole d'infection urinaire, le plus souvent l'infection urinaire résistante aux antibiotiques.

B- Différents types d'entérobactéries

• *Escherichia coli*

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* ou colibacille est habituellement une bactérie commensale (Nauciel ; 2000).

Escherichia coli est impliquée dans de nombreuses infections à point de départ digestif ou urinaire, suppurations localisées ou septicémies, il peut s'agir d'infections communautaires ou nosocomiales (Nauciel ; 2000)

• *Klebsiella*

Les *Klebsiella* sont des bacilles à gram négatif, toujours immobiles, de dimensions comparables à celles de *Escherichia coli* très souvent encapsulés (Leminor ; 1989)

Klebsiella pneumoniae, de loin la plus souvent rencontrée et *Klebsiella oxytoca* sont isolées principalement de broncho-pneumopathies aiguës ou subaiguës, mais aussi d'infections urinaires, hépatobiliaires ou de pus divers. (Avril et al ; 1992).

• Enterobacter

Les Entérobacter sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux, on les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses, ce sont des bactéries de l'hospitalisme (Avril et al ; 1992)

L'espèce type est *Enterobacter cloacae*, c'est aussi la plus souvent rencontrée.

Ces bactéries pathogènes opportunistes peuvent être responsables de septicémies, de méningites, d'infections urinaires, d'infections néonatales et de suppurations diverses (Avril et al ; 1992)

• Citrobacter

Les *Citrobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud (Avril et al ; 1992)

Le pouvoir entéro-pathogène des *Citrobacter* est nul sauf dans rare exceptions (infections urinaires, septicémies surinfection du tractus respiratoire).

• Staphylococcus aureus

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

• Streptococcus

Ces bactéries poussent en chainettes de cocci analogues à des colliers de perles, elles sont anaérobies, leur culture nécessite des milieux riches (gélose au sang). Les principaux streptocoques pathogènes sont α -hémolytiques, le plus important chez l'homme, est le groupe A. Les *streptocoques* de ce groupe sont responsables d'angines, et d'autres infections sévères. Ces infections peuvent être à l'origine de complications importantes, telles que le rhumatisme articulaire aigu. (Patrick et al., 1988).

II-3-3-2--Mode d'action contre les bactéries

Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles et des extraits des plantes ait son propre mécanisme d'action. Mais d'une manière générale, leur action se déroule comme suite :

- **Action membranaire**

- ✓ La nature lipophile des huiles essentielles ainsi que leur composition en molécules hydrocarbonées laissent présager une action au niveau de la membrane cellulaire des microorganismes. En effet, les molécules lipophiles sont susceptibles de traverser les parois et membranes cellulaires ; les hydrocarbures se logent préférentiellement dans les membranes biologiques et en perturbent leurs fonctions vitales (**Carson et al., 2006**)
- ✓ L'altération de la membrane cellulaire et notamment de sa perméabilité peut entraîner des pertes anormales d'ions, voire de macromolécules. Il y a des études qui supposent que les huiles essentielles ont une action au niveau de la membrane mitochondriale, elles provoquent une diminution du potentiel membranaire affectant ensuite échanges de Ca^{2+} et H^+ (d'où une modification de gradient de pH) (**Bakkali et al., 2007**) (**figure6**).

- **modification du contenu cellulaire**

- ✓ L'acidification de l'intérieure de la cellule bloque la production de l'énergie et la synthèse des composants de structure
- ✓ La destruction du matériel génétique qui conduit à la mort de la bactérie (**El-kalamouni., 2010**)

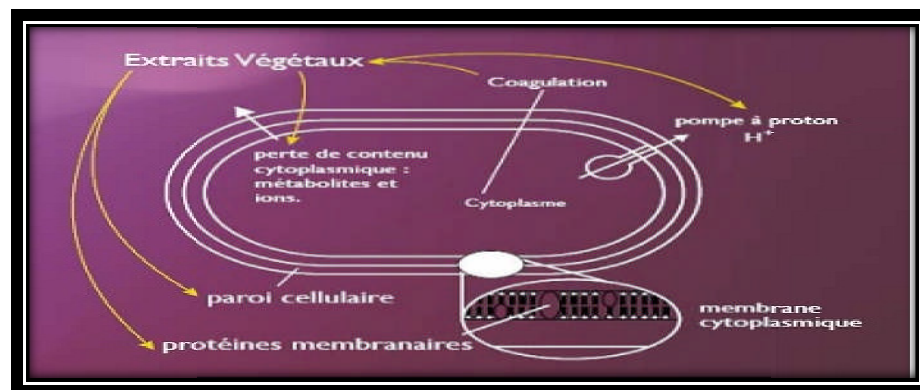


Figure 6 : Mode d'action des extraits contre les bactéries.

I-3-3-2-Activités antibactériennes des poly-phénols

Les poly-phénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel la toxicité (Cowan., 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert., 1991).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont re u plus d'attention du leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de bio-films, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu' leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia., 2011). La quercétine et la naringénine sont rapportés être des inhibiteurs de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus nervous*, *Staphylococcus epidermis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Sandhar et al., 2011). En outre, la morine-3-O-lyxoside, morine-3-O-arabinoside et la quercétine-3-O-arabinoside possèdent une action bactériostatique sur les bactéries pathogènes contaminant les denrées alimentaires y compris *Bacillus stearothermophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteric*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholera*. Les flavonones ayant un groupement de sucre ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montre aucune activité inhibitrice envers les microorganismes (Sandhar et al., 2011).

Notre stage pratique a duré 6 mois successifs. (Mois d'Avril –Mois de Septembre). Il est basé sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité biologique d'*Artemisia herba alba*.

La station choisie pour cette étude est située au niveau de la région de Ghardaïa. Le choix de cette station a été basé sur des critères écologiques (climat, sol, précipitation et altitude), ces dernières ont une influence sur le développement de la plante et sur la qualité des extraits de la plante.

L'évaluation de l'activité biologique des extraits d'*Artemisia herba alba* a été réalisée au niveau de deux laboratoires différents :

- Activité anti-oxydante, anti-inflammatoire et antispasmodique au sein de la filiale ANTIBIOTICAL de l'Entreprise de la Fabrication des Produits Pharmaceutiques SAIDAL de Médéa.
- Et l'activité antibactérienne au niveau de laboratoire d'Hygiène de Blida.

II-1-Matériel

II-1-1-Matériel non biologique (Annexe)

II-1-2-Matériel biologique

II-1-2-1-Matériel végétal

Notre étude porte sur la plante d'*Artemisia herba alba* récoltée durant le mois de Février dans la zone présaharienne (**Ghardaïa**).

L'identification des échantillons d'*Artemisia herba alba* a été réalisé au sein de l'INA d'Alger.

Nous avons procédé à un échantillonnage subjectif, en ce sens nous avons choisi les parcelles avec une prospection de la région d'étude. Puis nous avons coupé systématiquement tous les pieds d'*Artemisia herba alba* sains, bien fournis et non pâturés qui se trouvent à l'intérieur de la parcelle.

Ainsi :

Dans la station de **Ghardaïa** la distribution spatiale des pieds d'*Artemisia herba alba* est hétérogène. Le nombre des pieds à l'intérieur de 1 m² varie de 8 à 10 pieds, nous avons donc

récolté 1 échantillon correspondant à 50 pieds sur un terrain de 4x8 m². La récolte a été réalisée durant la période de floraison (mois de Février). Après la récolte, les échantillons sont mis dans des sacs bien aérés puis étalés sur des papiers à l'ombre et à l'abri de l'humidité, à la température ambiante, jusqu'à ce qu'ils deviennent complètement secs.

II-1-2-2-Animaux

Afin de réaliser notre objectif qui est la mise en évidence de l'activité biologique des extraits de notre plante *Artemisia herba alba*, notre étude *in vivo* a porté sur des souris de race Albinos NMRI. (Naval Medical Research Institute) élevées au niveau de l'Animalerie du complexe ANTIBIOTICAL, SAIDAL de Médéa.

Au total, 48 souris de sexe mâle et femelle sont utilisées. 24 souris sont servies à l'étude de l'activité anti inflammatoire et 24 souris à l'étude l'activité antispasmodique. Le poids varie entre 17-24g.

Les animaux sont maintenus dans l'animalerie de pharmacotoxicologie du complexe ANTIBIOTICAL de SAIDAL dans des cages en makrolon avec grilles en inox pour les souris, avec certaines conditions :

- Température ambiante de 20 à 24°C.
- Eclairage de 10 heures/jours.
- Taux d'humidité de 50 à 70%.

Les animaux sont maintenus à libre accès à la nourriture et à l'eau. Les aliments sont des granulés de composition équilibrée, l'eau de boisson potable est renouvelée quotidiennement.

II-1-2-3-Bactéries

Les germes-cible utilisés appartiennent à différents groupes taxonomiques microbiens. Au total, 15 souches bactériennes dont 13 Entérobactéries Gram-: *Klebsielle pneumoniae1*, *Proteus mirabilis1*, *Eshérichia coli*, *Proteus mirabilis2*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella pneumoniae2*, *Enterococcus sp*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae* et *Acinetobacter spp*. Et 2 bactéries Gram+ : *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus spp*.

Toutes ces souches ont été conservées dans des milieux de conservation au niveau de laboratoire d'hygiène de Blida, et ont été isolées de différents prélèvements. Certains de ces germes ont été isolés des urines (examen cytobactériologique des urines) (E.C.B.U) ou de coprocultures(C.P.C). D'autres proviennent de pus d'abcès (P.A), des crachats (C.R) et des sécrétions bronchiques (S.B). (Tableau 2)

Tableau II : Prélèvement des germes cibles.

Germes -cible	Prélèvement	Germes-cible	Prélèvement
<i>Staphylococcus aureus</i>	C.R	<i>Citrobacter diversus</i>	E.C.B.U
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S.B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E.C.B.U
<i>Proteus mirabilis</i>	P.A	<i>Enterococcus sp</i>	E.C.B.U
<i>Escherichia coli</i>	P.A	<i>Salmonella typhi</i>	C.P.C
<i>Proteus mirabilis</i>	E.C.B.U	<i>Streptococcus spp</i>	C.P.C
<i>Proteus vulgaris</i>	P.A	<i>Escherichia coli</i>	E.C.B.U
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P.A	<i>Acinetobacter spp</i>	E.C.B.U
<i>Citrobacter freundii</i>	P.A		

Nous avons confirmé l'identification de ces germes en utilisant la clé d'identification de (Krieg *et al.*, 1984 et Holt *et al.*, 1994) pour la caractérisation des Bactéries. Les résultats sont rapportés dans les **tableaux III** et **IV(Annexe)**.

II-2-Méthodes

II-2-1-Préparation des extraits

II-2-1-1- Extrait aqueux

La préparation de l'extrait aqueux de 10% de notre plante est réalisée en additionnant 10g de poudre de la partie aérienne de la plante à 100ml d'eau distillée bouillit, puis laissée 30 minutes en infusion avec agitation de temps en temps à l'aide d'un agitateur magnétique. L'extrait aqueux obtenu est en suite centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes pour se débarrasser des débris de plantes puis filtré sur papier filtre de type wattman N=°3. Le filtrat est ensuite mis dans des petits flacons en verre.

Le même principe est utilisé pour l'extrait aqueux de 20% (Ljubuncic *et al.*, 2005).

II-2-1-2- Extrait alcoolique

II-2-1-2-1-Extrait éthanolique

Dix grammes de poudre de la plante ont été mis à macérer dans 100 ml d'éthanol à 96° pendant 72 h sous agitation. L'extrait a été filtré sur papier filtre de type wattman N=°3 et concentré sous pression réduite à 50 °C, puis séché à poids constant. Le résidu d'extraction a été de 129,2 g. Une solution de concentration égale à 6,46 g/ml a été préparée dans 20 ml de l'éthanol 48° avec l'extrait sec obtenu (Ali-Emmanuel N et al., 2002).

II-2-2- Screening phytochimique

II-2-2-1-But : Identification des substances bioactives contenues dans la partie aérienne d'*A.herba alba* basée sur les réactions colorimétriques et de précipitation par différents réactifs.

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant une plante nous permet d'avoir une bonne idée sur ses actions pharmacologiques.

Ces tests phytochimiques sont en relation avec l'intensité du précipité et de la turbidité ou de la coloration et proportionnelle à la quantité de la substance recherchée :

Les résultats sont classés en : Réaction très positive (+++), Réaction moyennement positive (++) , Réaction louche (+), Réaction négative (-).(Ponce et al., 2003).

II-2-2-2- Flavonoïdes

Mettre 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'Hcl (la solution d'Hcl concentré à 37% est diluée à 1%) et macérer le tout pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : Prendre 10 ml du filtrat(le macérât) et ajouter 5ml du NH₄OH concentré (30%) (Le milieu devient basique)

Le résultat est positif par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure du tube à essai. (Okmu, 2005)

II-2-2-3-Tannins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 5ml d'extrait aqueux de 10%, et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ dilué à 1 %. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins (Trease et al. 1987).

II-2-2-4- Anthocyanine

Prendre 5ml d'extrait de 10% mélangé avec 4 ml d'hydroxyle d'ammoniac (NH_4OH) concentré (30%).

L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des anthocyanines. (**Gherib. 1988**).

II-2-2-5- Glucosides

Mélanger 2 grammes de poudre de plante avec quelques gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré (96%).

Le résultat est positif par l'apparition d'une couleur rouge-bleue. (**Gherib. 1988**)

II-2-2-6-Coumarines

Prendre 1gramme de poudre de plante mélangé avec 5ml d'éther éthylique puis agiter et filtrer. Mettre le filtrat sous l'UV à 365nm. L'observation d'une couleur bleue indique la présence des coumarines (**Gherib. 1988**).

II-2-2-7-Terpènes

Prendre 5ml d'extrait de 10% mélangé avec 5ml d'acide phosphomolybdique et 5ml d'acide sulfurique concentré (96%) (H_2SO_4). (**Gherib.1988**)

L'obtention d'une couleur bleue indique la présence des terpènes

II-2-2-8-Saponosides

Prendre 2ml d'extrait aqueux de 10% et ajouter 2 ml d'une solution d'acétate de plomb.

La précipitation du dépôt blanc indique la présence des Saponosides (**Gherib.1988**)

II-2-2-9- Alcaloïdes

Prendre 5ml d'extrait aqueux de 10%, ajouter 3 ml d'acide sulfurique concentré (96%) (H_2SO_4) et 5 ml de réactif de valser mayer (AnnexeI) (**Gherib, 1988**).

L'observation de trouble indique la présence des Alcaloïdes

II-2-3- Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (**Huang et al., 2004**) a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes des extraits d'échantillon .

Un millilitre (1 ml) de la solution concentrée à 2,5mg/ml obtenue par dilution de la solution de l'extrait aqueux à 10% (100mg/ml) a été ajouté à un volume égal d'une solution de 2% de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Le mélange a été vigoureusement agité par un agitateur magnétique, après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est mesuré à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage ($y=a \cdot x+b$)(annexeI) établie par la quercitrine (0-350 $\mu\text{g/ml}$), réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification

des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en gramme d'équivalent de quercétine par gramme de poudre.

II-2-4-Evaluation des activités biologiques

Les tests biologiques consistent à mettre en évidence les activités biologiques des extraits d'*Artémisia herba alba* à savoir l'activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, antispasmodique, et antibactérienne.

II-2-4-1- Activité anti-oxydante (*in vitro*)

a-Principe : Pour évaluer l'activité anti-oxydante d'*Artemisia herba-alba*, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998).

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. (**Figure 7**).

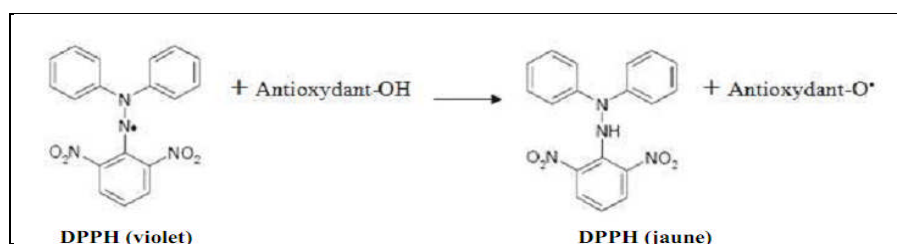


Figure 7 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Cinquante microlitres de chaque concentration de l'extrait aqueux, (40mg/ml, 20mg/ml, 10mg/ml, 8mg/ml, 6mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 mg/ml) .

En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de l'eau distillée avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

b- Calcul des pourcentages d'inhibitions

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I \% = ((Ac - At) / Ac) * 100$$

Ac : absorbance du contrôle ;

At : absorbance du test effectué

c-Calcul des IC50

IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH.

Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. (Samarth et al. 2008).

II-2-4-2-Activité anti-inflammatoire (*in vivo*)

a-Principe : L'inflammation de l'œdème de la souris est provoquée par application locale de carraghénine à 0.1%, peut être réduite par application de substances anti-inflammatoires. (Rahman et al., 2005).

Cette inflammation est la conséquence de l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui est à l'origine de l'œdème suite à une diffusion liquidienne dans les tissus voisins. Le rôle du produit anti-inflammatoire est la limitation de la perméabilité vasculaire.

La mise en évidence de l'effet anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode de (Levy., 1969). Certaines étapes ont été complétées afin d'avoir le maximum de détails, en l'occurrence

- Effet pro-inflammatoire de la carraghénine en comparaison avec l'eau physiologique.
- Effet anti-inflammatoire des produits testés par rapport aux témoins (Eau physiologique)
- Comparaison avec un anti-inflammatoire officinal: Diclofenac de sodium.

b-Mode opératoire

La veille de l'expérimentation les souris ont été mises à jeun pendant 16 heures.

Les souris sont répartis en 4 lots contenant chacun 6 souris de différents poids (17-24g) :

- **Lot 1:** reçoit l'eau physiologique.
- **Lot 2:** reçoit le Diclofinac de sodium (0,4mg/ml).
- **Lot 3 :** reçoit l'extrait aqueux d'*Artemisia herba- Alba* à 10%.
- **Lot 4 :** reçoit l'extrait aqueux d'*Artemisia herba- Alba* à 20%.

Au temps t = 0 : les 4 solutions sont administrées par voie orale (gavage).

- Lot 1 : chaque souris reçoit 0.5ml d'eau physiologique (témoin négatif).
- Lot 2 : chaque souris reçoit 0.5ml de solution de Diclofénac (témoin positif).
- Lot 3 : chaque souris reçoit 0.5ml d'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* à 10%
- Lot 4 : chaque souris reçoit 0.5ml d'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* à 20%.

Après 30 minutes, nous avons injecté 0.02 ml de la carraghénine à (0.1%), en solution dans l'eau physiologique, sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de la souris.

Les souris sont gardées dans les conditions de stabulation habituelles au cours de l'expérience.

La mesure du volume de la patte, avant, pendant et à l'issue de l'inflammation locale se fait à l'aide du pied à coulisse précis au 1/50^{ème} de millimètre. (**AnnexeIII**)

Les mesures sont faites au niveau de l'articulation tarso-métatarsienne des pattes postérieures des souris, dans le sens antéropostérieur. Elles sont faites dans l'ordre suivant:

- Epaisseur initiale des pattes.
- Une mesure immédiatement après injection de la carraghénine, pour tenir compte de l'enflamment.
- Des mesures toutes les 30 minutes pour suivre l'évolution de l'inflammation jusqu'à 210 minutes.

L'importance de l'œdème a été appréciée par la détermination du pourcentage d'augmentation du volume de la patte (% AUG) de la souris.

$$AUG\% = \frac{\text{volume de la patte au temps } T - \text{volume Initial } (V_0)}{\text{volume Initial } (V_0)} \times 100$$

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée grâce au calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH).

$$INH\% = \frac{AUG\% \text{ témoin négatif} - AUG\% \text{ traité}}{AUG\% \text{ témoin négatif}} \times 100$$

II-2-4-3- Activité antispasmodique (*in vivo*)

Principe: L'injection d'acide acétique à 1 % par voie intra-péritonéale provoque chez les souris une réaction douloureuse, cette douleur se manifeste par des spasmes sous forme de mouvements de torsion de l'abdomen avec étirement des pattes postérieures. Cette réaction peut être réduite par une substance antispasmodique à la dose active (**Rahman et al., 2005**).

La mise en évidence de l'effet antispasmodique sur les souris a été réalisée selon la méthode de (**Rahman et al., 2005**).

Certaines étapes ont été complétées afin d'avoir le maximum de détails, en l'occurrence:

Les témoins ont été choisis afin de montrer :

- L'effet neutre de l'eau physiologique sur la réduction des spasmes chez les souris.
- L'effet d'un antispasmodique officinal de référence « Le spasmodyl 80mg » et l'effet de l'extrait aqueux sur la réduction de spasmes chez les souris.
- Etablir une comparaison entre notre extrait et l'antispasmodique de référence.

La solution antispasmodique a été administrée par voie orale (gavage), à raison de 0,5ml/souris, suivie par l'administration de 0,2 ml d'acide acétique par injection en intra-péritonéale 30 minutes après.

Cinq minutes après l'injection de l'acide acétique, le nombre de spasmes a été comptabilisé durant 10 minutes (**Rahman et al., 2005**).

La répartition des lots est faite selon (**tableauV**).

Tableau V: Répartition des lots et leur soumission au test de l'effet antispasmodique.

	N° lot	Essais	Objectifs
Témoins	1	Solution physiologique : 0,5 ml puis 0,2 ml acide acétique.	Vérification de l'activité spasmodique de l'acide acétique. Vérification de l'effet antispasmodique de référence.
	2	Solution de spasmodyl (80mg) :0,5 ml puis 0,2ml d'acide acétique.	
Essais de l'extrait Aqueux	3	Extrait aqueux à 200 mg/ml puis0, 2 ml d'acide acétique.	Mise en évidence de l'activité antispasmodique et de la relation entre la dose et l'effet.
	4	Extrait aqueux à 100 mg/ml puis0, 2 ml d'acide acétique	

L'effet antispasmodique de l'extrait aqueux d'*Artémisia herba alba* est évalué par le calcul du pourcentage de protection selon la formule suivante (Alaoui et al., 1998).

$$\% \text{de protection} = \frac{\text{moy des spasmes du lot T} - \text{moy des spasmes du lot E}}{\text{moy des spasmes du lot T}} \times 100$$

Lot T: lot témoin

Lot E: lot essai

II-2-4-4-Activité antibactérienne

Nous avons étudié la sensibilité des 15 germes-cible vis-à-vis de l'extrait éthanolique, en utilisant la technique d'antibiogramme :

a-Préparation de l'inoculum

Il est indispensable d'utiliser des cultures jeunes, leur réactivation se fait comme suit :

Un Prélèvement de la souche à partir du milieu de conservation à l'aide d'une anse de platine stérile, on l'a ensemencé dans la Gélose Mueller Hinton, La durée de l'incubation est de 24 heures à une température de 37°C.

Nous préparons la suspension de chaque souche séparément en prélevant à l'aide d'une anse de platine stérile 2 colonies. La densité optique de chaque suspension est ajustée à 0,5Mc Farland; Cette opacité, équivalente à une densité optique de 0.08 – 0.1 à 625 nm, peut être diminuée (ou augmentée) en ajoutant plus de culture afin d'ajuster la densité optique (DO). Elles sont déposées dans un tube contenant une solution physiologique stérile.

b-Ensemencement

Les suspensions bactériennes sont ensemencées sur des boites contenant le milieu Muller Hinton (MH) pour les suspensions bactériennes.

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension qui nous avons préparé.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de la boite de Pétri, en stries serrées, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

c-Méthode Antibiose

c-1- Principe

Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien (produits à tester) en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur les microorganismes est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche microbienne sera qualifiée d'être sensible ou résistance au produit testé (**Broadasky et al., 1976 ; cité par Bougandoura, 2011**).

c-2- Dépôt des disques

On dépose 2.5 µl de chaque extrait sur un disque de papier filtre de 9mm de diamètre. Le disque est déposé à l'aide d'une pince stérile sur la surface d'une boite ensemencée, les différentes boites sont étiquetées et mises à incuber à 37°C pendant 24H.

- Expression des résultats

L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, déterminé par les différents extraits testés autour des disques.

Selon **Chifundera et al. (1990)**, les résultats sont exprimés comme suivant :

- Fortement inhibitrice : diamètre ≥ 28 mm
- Modérément inhibitrice : $16 \text{ mm} \leq \text{diamètre} < 28$ mm

- Légèrement inhibitrice : $10 \text{ mm} \leq \text{diamètre} < 16 \text{ mm}$
- Non inhibitrice : diamètre $< 10 \text{ mm}$

II-2-5- Etude statistique

Une étude statistique a été appliquée pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antispasmodique.

Un test ANOVA suivie par un test de comparaison par pairs (Tukey) a été réalisée par le logiciel XLSTAT (2012, Addinsoft, France).

P value ≤ 0.05 est considéré comme une différence significative.

III-1-Résultat de l'étude phytochimique

Tableau VI : Résultats de tests phytochimiques d'*A.herba alba*.

Métabolites secondaires	Couleur	Résultat
Flavonoïdes	couleur jaune	+++
tanin	bleu-vert	++
Glucosides	Couleur rouge	+++
Terpènes	couleur bleue	+++
Anthocyanines	coloration rouge	-
Coumarines	couleur bleue	++
Saponosides	un précipité blanc	++
Alcaloïdes	trouble.	++

+++ : Très riche

++ : moyennement riche

-: absence

Les tests colorimétriques nous ont révélé que notre plante est très riche en substances bioactives suivantes : flavonoïdes, glucosides et terpènes, et moyennement riche en : tanins, coumarines, saponosides et alcaloïdes et une absence totale des anthocyanines (Tableau VI).

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses tels que : les activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques gastro-intestinales et anti oxydantes (**Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999**).

III-2-Dosage des flavonoïdes

L'étude quantitative de l'extrait brut de la partie aérienne d'*A herba alba* au moyen de dosage spectrophotométrique avait pour objectif la détermination de la teneur des flavonoïdes.

La quantité des flavonoïdes correspondante a été rapportée en gramme de flavonoïdes d'équivalents de quercétine utilisé par gramme de poudre (**g EQ/g de poudre**) et déterminés par l'équation de type : $y = a x + b$ (Annexe I), et les résultats sont représentés dans le

tableau VII :

Tableau VII : Résultats de dosage des flavonoïdes condensés dans l'extrait aqueux d'*A herba alba*.

Teneur en g EQ/g de poudre	Flavonoïdes
Extrait aqueux	0.1276

Selon le tableau la teneur en flavonoïde est de 0,1276 g EQ/g de poudre dans l'extrait aqueux d'*A herba alba*.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques (Flavonoïdes). des études ont montrés que les facteurs extrinsèques (facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante, et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en poly-phénols (Aganga., 2001, Pedneault et al., 2001).

III-3-Etude des activités biologiques

III-3-1-Activité anti-oxydante

Nous avons réalisé la méthode de DPPH pour l'évaluation de cette activité sur l'extrait aqueux d'*A herba alba* et les résultats sont exprimés dans la figure 8 :

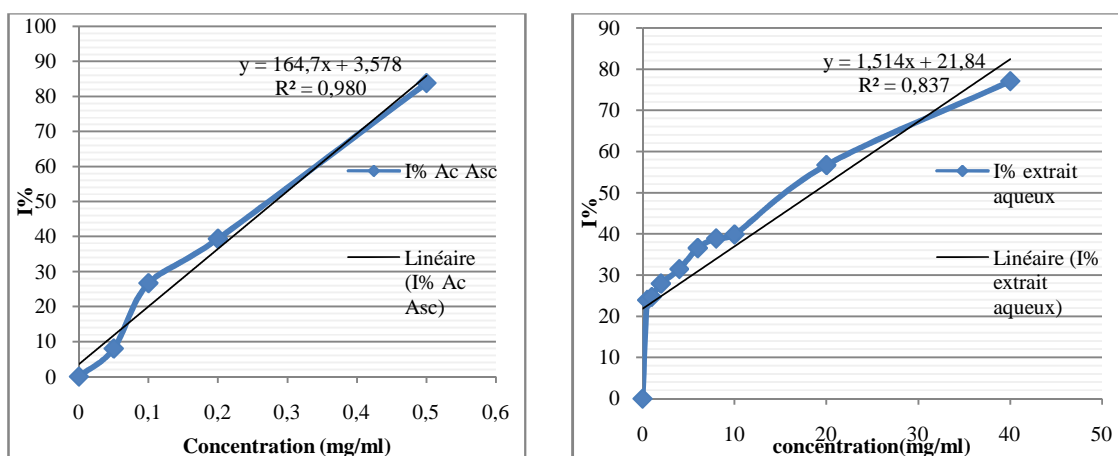


Figure 8 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique et l'extrait aqueux d'*A herba alba*.

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine C ou pour l'extrait aqueux d'*A.herba alba*.

Nous avons remarqué que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'extrait aqueux est très inférieur à celui de la vitamine C pour toutes les concentrations utilisées.

Pour une concentration de 0,5mg/ml, l'extrait aqueux a révélé un pourcentage d'inhibition égale à 23,94% loin de celui de la vitamine C qui est de 83,86%.

La capacité anti-oxydante de l'extrait aqueux a été déterminée à partir de l'IC50, qui est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH.

Le résultat de l'IC50 de l'extrait aqueux et l'acide ascorbique sont calculés graphiquement (Figure 7) et représentés dans le tableau VIII:

Tableau VIII : Valeurs des IC50 de l'acide ascorbique et l'extrait aqueux d'*A herba alba*.

Témoin positif et échantillon	IC50 (mg/ml)
Extrait aqueux	18.59
Acide ascorbique	0.28

Les résultats expérimentaux obtenus montrent que l'extrait aqueux d'*A herba alba* présente une activité anti-oxydante moyenne avec une IC₅₀ de 18.59 mg/ml. Cette activité est inférieure à celle de l'acide ascorbique qui présente une IC₅₀ = 0.28 mg/ml.

Selon **Hertog et al(1993)** **Djeridane et al, (2006)**, l'activité antioxydant de l'extrait de la plante est essentiellement attribuée aux composés phénoliques en particulier aux flavonoïdes.

Donc cette activité peut s'expliquer par la présence des tanins, et des flavonoïdes qui sont détectés dans les extraits de notre étude (tests de screening phytochimique), et le dosage qui montre une teneur importante en flavonoïdes. En effet les flavonoïdes et les tanins sont des piègeurs de radicaux libres (**Diallo., 2005**). Par ailleurs, (**Uchida et ses collaborateurs**) suggèrent que les tanins ont une action de piégeage radicalaire sur le radical DPPH (**De Bruyne et al., 1999**).

Selon **De Pooter et Schamp (1986)**, il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène.

III-3-2-Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est réalisée par la technique de l'œdème de la patte de la souris provoqué par la carraghénine (Winter et al., 1962), et exprimée par le pourcentage de la réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au témoin négatif (non traité).

Les résultats de pourcentages d'inhibition de l'œdème des pattes des souris en fonction du temps sont mentionnés dans le tableau IX (annexeV) et la Figure 9.

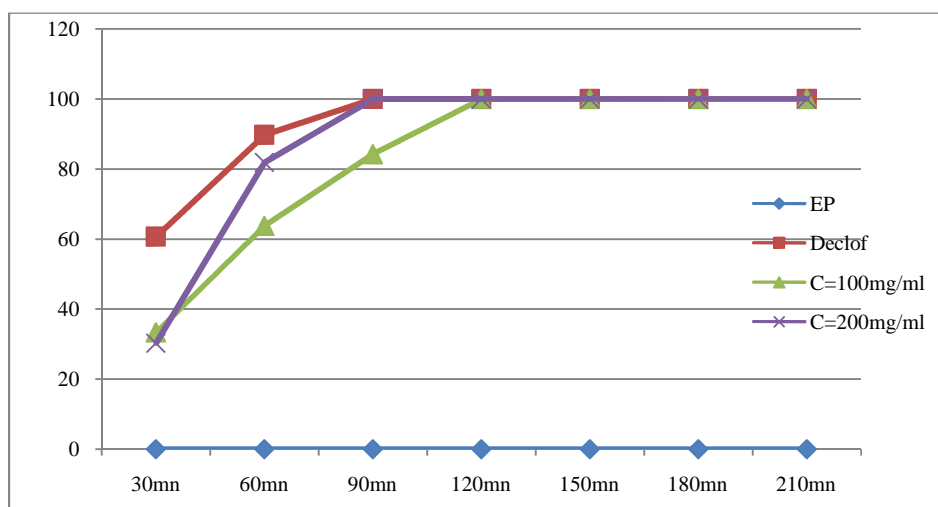


Figure 9 : Cinétique du pourcentage de réduction de l'œdème.

L'administration préventive de Diclofénac et de notre extrait aqueux d'*A herba alba* à deux concentrations différentes se traduit par une réduction de l'œdème d'une façon progressive.

Le Diclofénac réduit l'inflammation à partir de la 1^{ère} heure et atteint son maximum à la 90^{ème} minute avec un pourcentage d'inhibition de 100%.

Egalement notre extrait aqueux à la concentration de 200 mg/ml réagit de la même façon que le Diclofénac.

Donc à 60 mn, il existe une différence significative ($P \leq 0.05$) entre le témoin positif (Diclofénac) et notre échantillon à 200mg/ml. Ceci démontre que notre extrait aqueux a une activité anti-inflammatoire importante.

Et à la concentration de 100 mg/ml qui inhibe l'inflammation à partir de la 1^{ère} heure et qui n'atteint son maximum qu'à partir de la 2^{ème} heure.

En revanche et à 210mn, aucun changement dans la réduction de l'inflammation n'a été noté pour tous les lots. Ceci a été vérifié avec l'étude statistique (ANOVA suivie par Tukey de comparaison par paires) où aucune différence significative ($P \leq 0.05$) n'est à mentionner.

Selon (Saleh et al., 1985, Saleh et al., 1987) les flavonoïdes peuvent être à l'origine de l'effet anti-inflammatoire. Et d'après l'étude phytochimique et dosage de flavonoïdes de notre extrait aqueux qui montre une teneur importante en ces composés.

Selon Da Silva et al., 1994 ; Galati et al., 1994 ; Middleton, 1996 ; De nombreux travaux indiquent que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Notre extrait aqueux d'*A herba alba* contient une teneur importante en flavonoïdes donc on peut expliquer l'effet anti-inflammatoire de notre extrait par la présence de ces métabolites secondaires.

III-3-3-L'activité antispasmodique

L'effet antispasmodique est expliqué par le pourcentage de protection après administration de l'eau physiologique et les différentes doses de l'extrait aqueux à des souris à lesquelles la douleur est provoquée par l'injection d'acide acétique à 1% par voie intrapéritonéale.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans la figure 10 :

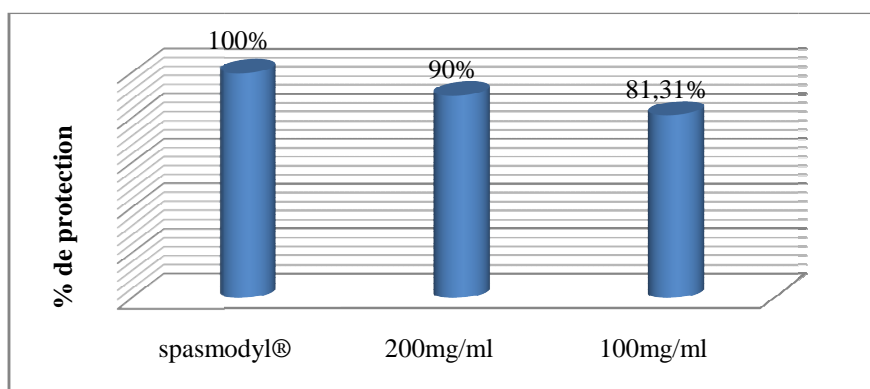


Figure 10: Pourcentage de protection des spasmes de spasmodyl et de l'extrait aqueux d'*A herba alba*.

Le lot traité par spasmodyl® (80mg) a réduit le nombre de spasme à 100%, tant dis que pour l'*Artemisia herba alba*, le pourcentage de diminution des spasmes par rapport au lot témoin est de 81,31% et 90%, pour la dose de 100mg/ml et 200mg/ml respectivement.

Une étude statistique a été appliquée pour apprécier l'activité antispasmodique de l'extrait aqueux en comparaison avec le produit de référence (Spasmodyl).

Aucune différence significative ($P > 0.05$) n'a été notée entre le médicament et le lot de souris traité avec 200 mg/ml d'extrait aqueux (**Annexe V**).

Par conséquent, notre échantillon pourra être référencié comme un analgésique de même efficacité que le médicament de référence.

L'effet antispasmodique de l'*A. herba alba* a été mis en évidence par de nombreux travaux tels que ceux de (**Yashphe et al., 1987**) qui ont démontré son effet relaxant sur les troubles intestinaux des lapins isolés.

L'efficacité de l'*Artemisia herba alba* contre les contractions serait lié à sa teneur en composés phénoliques tels que le carvacrol et les flavonoïdes. Ceci a été apprécié par le dosage de la teneur totale en Flavonoïdes qui montre que notre extrait est très riche en ces composés. Ils agissent en bloquant les canaux de calcium. Les flavonoïdes agissent également en inhibant la réponse des récepteurs membranaires spécifiques à l'action des stimulants (acétylcholine et noradrénaline) (**Saleh et al., 1985 ; Saleh et al., 1987**).

D'autres composés peuvent être à l'origine de cette activité antispasmodique remarquable et qui font partie de la composition de la plante étudiée. Ce sont l'acide caféique, le bornéol, l'apigénine, limonène, linalool, pinène et terpène-4-ol (**Gharabi et al., 2008**).

III-3-4-L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne d'extrait éthanolique d'*A. herba alba* a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, et la sensibilité des bactéries se mesure par rapport aux diamètres d'inhibition observés.

Les résultats relatifs à l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique d'*A. herba alba* sont mentionnés dans les **figure11** et les photos (**photo :1,2,3 et 4**) .



Photo 1 : Diamètre d'inhibition en (mm) de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis de l'extrait éthanolique d'*Artémisia herba alba*

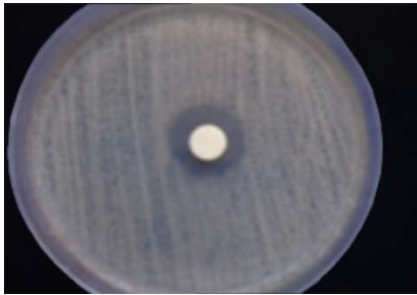


Photo 2 : Diamètre d'inhibition en (mm) de *Acinetobacter spp* vis-à-vis de l'extrait éthanolique d'*Artémisia herba alba*

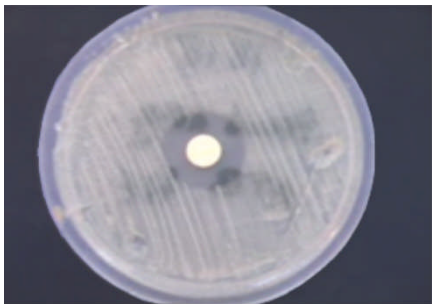


Photo 3 : Diamètre d'inhibition en (mm) d'*E.coli* vis-à-vis de l'extrait éthanolique d'*Artémisia herba alba*

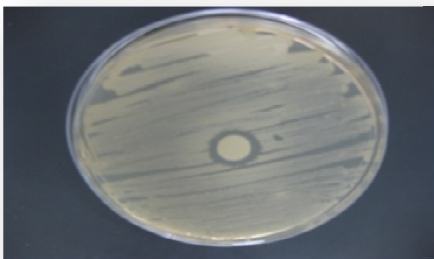


Photo 4 : Diamètre d'inhibition en (mm) d' *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de l'extrait éthanolique d'*Artémisia herba alba*

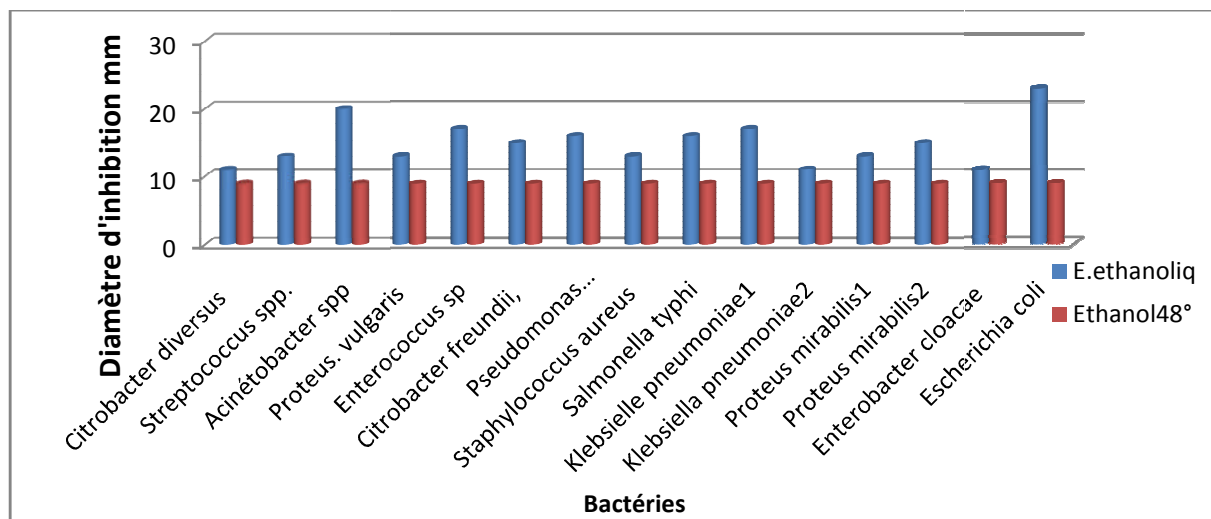


Figure11 : Sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait éthanolique et l'éthanol à 48° d'*A herba alba*.

Les résultats de cette étude montrent que le solvant utilisé pour dissoudre les résidus secs de ces extraits alcooliques (alcool à 48°) n'a donné aucune zone d'inhibition.

Alors que l'extrait éthanolique s'est révélé actif vis-à-vis des 4 souches bactériennes Gram- : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter ssp* et *Enterococcus sp* avec des diamètres d'inhibition variant de 15 à 23 mm, les autres souches bactériennes étudiées se montrent avec une faible sensibilité selon les diamètres d'inhibition variant de 10 à 13 mm.

Les résultats de (Mohsen & Ammar, 2009) ont prouvé que l'éthanol était le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques, suivi du méthanol et finalement par l'eau ce qui pourrait expliquer le résultat déjà mentionné.

Cette observation est soutenue par plusieurs travaux dont ceux de Moroh et al. (2008) et de Bagré et al. (2011) qui ont montré que l'éthanol permet une meilleure concentration des principes actifs comparativement à l'extrait aqueux.

L'effet inhibiteur de l'extrait éthanolique peut s'expliquer par les différents constituants chimiques. L'alcool permettant une meilleure extraction de composés moins polaires comme des dérivés terpéniques, tels que ceux identifiés dans *A herba alba*. (Verma et al., 1997).

Les poly-phénols, tels que les tannins et les flavonoïdes, comme la catéchine, la myricétine, et la quercétine, (**Shan et al., 2007**) et lutéoline (**Askun et al., 2009**) sont des substances antibactériennes importantes.

Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes sont produits en réponse à l'infection microbienne par les plantes. Par conséquent l'efficacité de ces substances évaluée *in vitro* a montré une action inhibitrice sur la majorité des souches bactériennes étudiées. De nombreuses études ont montré une relation contradictoire entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir antimicrobien.

Chabot et al., (1992) rapporte que les composés les moins polaires comme les flavonoïdes manquant le groupement hydroxyle sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des microorganismes que ceux portant le groupe OH. D'autre part, **Mori et al., (1987)** ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3', 4' et 5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

Conclusion et perspectives

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place de choix en thérapeutique. En effet, les plantes médicinales constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux effets biologiques des extraits organiques et de l'extrait aqueux de l'Armoise blanche (*Artemisia herba alba*), il nous paraît intéressant de dégager les principaux résultats auxquels nous avons abouti.

- Pour l'obtention de différents extraits, nous avons réalisé une extraction aqueuse par infusion à l'eau et une extraction organique par macération.
- Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins, les glucosides, les terpènes, les coumarines, les saponosides et les alcaloïdes. Ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.
- L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux condensés montre que l'extrait aqueux est riche en ces métabolites.
- L'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* possède un pouvoir piègeur du radical libre DPPH important avec une IC50 de 18.59 mg/ml.
- L'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* possède un effet anti-inflammatoire et antispasmodique importants d'où la large utilisation de cette plante dans les pays d'Afrique du Nord, du Moyen Orient et en médecine traditionnelle.
- L'extrait alcoolique d'*Artemisia herba alba* a exercé une importante activité antibactérienne sur l'ensemble des souches testées.

A l'issue de ce modeste travail, nous pouvons conclure que les extraits d'*A. herba alba* (extrait aqueux, éthanolique) semblent être appropriés comme traitement de nombreuses pathologies en phytothérapie et comme principe actif dans la composition chimique de véritables préparations pharmaceutiques.

Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur cette plante en se focalisant sur plusieurs extraits, à savoir fractionnement des extraits voire même isolement de substances qui sous tendent les diverses activités détectées.

De plus, des études approfondies concernant l'identification des composés par des méthodes plus performantes seront nécessaires.

Pour mieux évaluer l'activité anti-oxydante, d'autres études *in vitro* et *in vivo* seraient intéressantes, et il serait souhaitable de faire une étude dans le domaine toxicologique afin de mettre à la disposition des populations une plante active avec des posologies précises.

Il serait intéressant de continuer ces travaux notamment sur d'autres bactéries pathogènes, levures, champignons et virus afin de confirmer l'efficacité ou non des extraits organiques et l'extrait aqueux d'*A.herba alba*, et analyser les composants bioactifs de cette plante vivace des autres régions du pays.

Références bibliographiques

- 📖 **Aganga AA, Julish W.D, Kusunick C, Lindesquist U, 2001.** Screening of yamani medicinal plant and cytotoxic activites. *Journal of enthenopharmacology*, 74: 173-179.
- 📖 **Aidoud A, 1983.** Contribution à l'étude des écosystèmes Steppiques du Sud Oranais (Phytomasse), productivité primaire et application pastorale). Thèse du Doctorat 3 ème Cycle. Université de Houari Boumédiène. Alger : 116-200.
- 📖 **Alaoui J.F, Lagorce Y, Cherrah M, Amarouche H et Roquehert M., 1998.,** Annales pharmaceutiques Françaises. 220-228.
- 📖 **Ali-Emmanuel N, Moudachirou M, Akakpo A. J et Quetin-Leclercq J., 2002.** Activités antibactériennes in vitro de Cassia alata, Lantana Camara et Mitracarpus Scaber sur dermatophilus congolensis isolé au Bénin. *Revue Elev-Méd-Vét. Pays trop*, 55(3) : 183-187.
- 📖 **Avril J.L, Dabernat H ; Montiel: Bactériologie clinique, édition ELLIPES 1992 : p149-183-185-187-188.**
- 📖 **Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2007** Antioxidant and free radical scavenging potential
- 📖 **Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M. 2009.** *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem.*,116: 289-294.
- 📖 **Bagré I, Bahi C, Ouattara K, Zirihi GN, Djaman AJ, Coulibaly A, N'guessan JD, 2011.** Étude botanique et exploration de l'activité antifongique de Morinda morindoides (Baker) Milne-Redh. sur la croissance in vitro de *Cryptococcus neoformans*. *Phytothérapie* 9: 136–141.
- 📖 **Bahorun, T. 1997.** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritius.* 83-94.
- 📖 **Banquour N., 1984.** Etude de l'effet de *Thym* (décoction) et son huile essentielle sur l'évolution de la flore microbienne et quelques paramètres chimiques du Smen, au cours de son évolution. Thèse de Doctorat 3ème cycle en Microbiologie. Univer. Cadi Ayed, Faculté des sciences, Marrakech..
- 📖 **Baba Aïssa F., 1991.** Les plantes Médicinales d'Algérie. *Ed. Bouchène et Ad. Diwan* : 56-70. Alger.

☞ **Barel A., Ramendo J, 1980.** Sciences Naturelles 1ère AS; *édition Institut Nationale Pédagogiques.* Alger : 47-49

☞ **Barton G M ,2008.** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 118, 413-420.

☞ **Belaïche P., 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, "l'Aromtogramme". *L Maloine; Tome I:* 100-123. Paris.

☞ **Beylier-Manuel.M.F, 1976.** Activités bactériostatiques des matières premières de parfumerie. *Rivista. Italiana, E.P.P.O.S;* **58** :283-286.

☞ **Bielle L, 1935.** Précie de Botanique Pharmaceutique, 2ème édition, *Editions médicales Norbet Maloine* : 123-146. Paris.

☞ **Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Delattre, J. 2003.** Radicaux libres et anti-oxydants In : Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-sciences. Flammarion. Paris, pp 59-81.

☞ **Bougandoura N. 2011.** Pouvoir antioxydant et antimicrobienne des extraits des espèces végétales *Saturejacalamintha sspnepta* (Nabta) et *Ajugaiva L.* de l'Ouest d'Algérie. Thèse de Magister en Biologie, *Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen.* P 34.

☞ **Bouhlal K., Meynadier J., Pyron J.L., Mynadir J, 1989.** The effets of the common concrts and absolutes used in th parfum industry. *J.Ess Res;* **1:** 169-170.

☞ **Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C. 1998.** Structural dependence of flavonoïdes interactions with Cu²⁺ ions : implication for their antioxidant properties. *The Biochemical journal.* **330:** 1173-1178.

☞ **Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. 2 ème édition.TEC&DOC. Pp : 235, 363- 364.

☞ **Brunneton J., 1999.** Flavonoïdes. In : *Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinale,* 3ème édition, *Technique et Documentation* (Paris), pp: 310-353.

☞ **Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R., Piché Y. ; 1992.** Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of

structurally specific flavonoid compounds under CO₂- enriched conditions. *New Phytol.*, **122**, 461-467.

📖 **Charles N Serhan, Peter A Ward and Derek W Gilroy.,2010.** Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press*, 2-3.

📖 **Chifundera K., Bury W. M et Kizungub., 1990.** Screening phytochimique et test antibactérienne des extraits de *Ficus sycomorus*. *Short communication phytothérapie* pp 535-539.

📖 **Chryssavgi, G; Vassiliki, P; Athanasios, M; Kibouri, T; Michael, K., 2008.** Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chemistry*, 107: 1120–1130.

📖 **Cotelle, N. , 2001.** Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*. **1**: 569-590.

📖 **Cowan M M ., 1999.** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** (4), 564-582.

📖 **Coyen Y. , 1981.** Abrégés de pharmacologie. Ed 4, Masson, Paris, 355 P.

📖 **Da Silva E.J.A., Oliveira, A. B., Lapa, A.J., 1994.** Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and hesperidin, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(2) : 118-22.

📖 **Dacosta, E. , 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta . Paris, 317p.

📖 **Daglia M ., 2011.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **3**, 1-8.

📖 **De Bruyne T.,Pieters ., Deelstra H., Vlietink A.,1999.** Condensed vegetable tannins :Biodiversity and biological activities .*Biochemical Systematics and Ecology*,**27** :445-459.

📖 **De Pooter H.L. et Schamp N. (1986).** Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In : Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. 139-150p.

📖 **Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. , 2005.** IN: *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Taylor & Francis Group (U.S.A), Pp: 703-861.

📖 **Deysson G., 1967.** Organisation et Classification des plantes vasculaires, *Ed SEDES ; Tome 2*, 116, Paris.

📖 **Denis François et al** : Bactériologie médicale : techniques usuelles, édition Elsevier Masson SAS, 2007 : p11-135-136-140-197.

📖 **Diallo A., 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat. Mali.

📖 **Djebaili, S., 1984.** Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie. OPU, Ben-Aknoun, Alger, p177.

📖 **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds *Food Chemistry* **97**, 654–660.

📖 **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. **331**: 372-379.

📖 **Favier, A., 2003.** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.

📖 **Fournier P., 1977.** Plantes Médicinales et Vénémeuses de France. Modes d'action des plantes selon leurs principes actifs. *Paul le Chevalier; tome I*: 63-90

📖 **Galati E. M., Monforte M. T., Kirjavainen S., Forestieri A. M., Trovato A., Tripodo M., 1994.** Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco* 40(11) : 709-12.

📖 **Ghedira, K., 2005.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. **4**: 162-169.

📖 **Gherib A., 1988.** Travaux pratiques de chimie thérapeutique », P40-50.

📖 **Ghrabi Z Sand RL., 2008.** *Artemisia herba alba* Asso. *A Guide to Medicinal Plants in North Africa* : 49 - 49.

📖 **Hallman, P.C.H., Trijp, L.M.P., Buysman, M.N.C.P., Gaag, M.S., Mengelers, J.B.,**

📖 **De vries, J.H.M., Katan, M.B., 1997.** Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*. **418**: 152-156.

📖 **Hans.W . Kothe, 2007.** « 1000 plantes aromatiques et médicinales », Toulouse, P79 :978-984.

- 📖 **Harborne, J.B. ,1998.** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).
- 📖 **Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002)** Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* **13**:572-584.
- 📖 **Hendrich, A.B. ,2006.** Flavonoid-membrane interactions : possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica.* **27**: 27-40.
- 📖 **Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., and Van de Putte, B., 1993.**Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41,. 1242-6.
- 📖 **Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 1994.** Bergy's Manual of determination Bacteriology, *Ninth Edition*: 836,
- 📖 **Huang, D; Ou, B; Prior, R.L. ,2004.** "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.
- 📖 **Iserin P., 2001.** Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins Larousse. Pp : 15-16, 68.
- 📖 **Ishii, K., Furuta, T., Kasuya, Y. , 2003.** High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography.* **749**: 49-56.
- 📖 **Javanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.J. , 1994.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society.* **116**: 4846-4851.
- 📖 **Killian C H., 1948.** Conditions édaphiques et réactions des plantes indicatrices de la région Alfatière. *Annal Agro ; I*: 56-74
- 📖 **Koehlin-Ramonatxo, C. ,2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.* **20**: 165-177.
- 📖 **Krieg N.R., Holt J.G., 1984.** Bergy's Manual systematic Bactériology. *Édition Barbara.Tansil ; 1*: 941.
- 📖 **Kurita N. et Koike S., 1982.** Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agric. Chem ; 46*: 159-165.

📖 **Lattaoui N., 1989.** Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de trois espèces de Thym à profils chimiques différents. Thèse de Doctorat, 3ème cycle. Option Microbiologie. Ecole Normale Supérieure; Rabat. Maroc.

📖 **Leclerc H., 1983.** Précis de phytothérapie. *Ed Masson*: 14-18: Paris

📖 **Lee, Y.J., Erdos, G., Hou, Z., Kim, S.H., Kim, J.H., Cho, J.M., Corry, P.M. , 1994.** Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. **137**: 141-154.

📖 **Leminor Michel Veron : Bactériologie médicale, 2eme édition 1989 : p389-429-444.**

📖 **Leuselle P et Ludmila M.2004.** « dictionnaire médical manua.10^{ème} Ed .Masson.Paris.

📖 **Levy L., 1969.** Carragenan paw edema in the mouse. *life Sci*.8. 601-606.

📖 **Lin, J.K., Weng, M.S.,2006.** Flavonoids as Nutraceuticals. In : *The science of flavonoids*. Grotewold, *Springer*, Pp: 217.

📖 **Ljubuncic P, Song H, Cogan U, et Azaizeh Hamd Bomzon A., 2005.** The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 198-204.

📖 **Martin S., Andriantsitohaina R. ,2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51**:304-315.

📖 **Merghem R, Jay M, Virial M.R, Bayet C et Voirin B., 1995** Five8-C benzylated flavonoïds from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*, 38(3): 637-640.

📖 **Middleton, E. J., 1996.** Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J.Pharmacol.* 34(5): 344-348.

📖 **Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharidies, T.C. , 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*. **52**: 673-751.

📖 **MIRABAUD Madeleine Irène:** «Entérobactéries à bêta- lactamases à spectre élargi en pédiatrie» thèse de doctorat en Médecine ; 1996 : université de Genève : p2-5- 7-8.

- 📖 **Mohammedi, Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister Tlemcen.
- 📖 **Mohsen, S.M., Ammar, A.S.M., 2009.** Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem.*, 112: 595-598.
- 📖 **Mori A., Vishino C., Enoki N., Twata S., 1987.** Antibacterial activity and mode of action of plant Flavonoids against *Proteus Vulgaris* and *Staphylococcus Aureus*. **26**:2231-2234.
- 📖 **Moroh JLA, Bahi C, Djè K, Loukou YG, Guédé-Guina F., 2008.** Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. Bull de la SR des Scien de Liège, 77 : 44 – 61
- 📖 **Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W., Blake, D.R., 1995.** Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **27**: 109-122.
- 📖 **Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishina, D.R., 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. **33**: 2-16.
- 📖 **Nathan C., 2002.** Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-852.
- 📖 **Neuwinger H.D., 1996.** African Ethnobotany : Poisons and Drugs. Chemistry, pharmacology, Toxicology. Chapman & Hall, Weinheim, 360-364 ; 606-607.
of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem*. **104**: 21-29.
- 📖 **Nauciel Charle** : Bactériologie médicale ; édition Masson, Paris ; 2000 : p69-71-72.
- 📖 **Okmu, D.E., 2005,** “Phytochemical, Vitamine and minerals contents of two Nigerian medicinal plants” *Int-J MolAdvSci*: 1(4) p375-381.
- 📖 **Patrick B., Jean L., and Michel S., 1988.** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274.
- 📖 **Pendneault K. Leonharts, Angenol, Gosselin A, Ramputh A, Arnason J.T, 2001.** Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux. Texte de conférence, Canada, 1-5

- 📖 **Pietta, P.G., 2000.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. **63**: 1035-1042.
- 📖 **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. , 2002.** Mécanismes physiologiques e la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et étabolisme*. **16**: 233-239.
- 📖 **Pokorny, J; Yanishlieva, N; Gordon, M.,2001.** Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.
- 📖 **Ponce A.G, Fritz R, Del Valle C et Roura S.I., 2003.** Antimicrobial activitynof essential oils in the native microflora of organic swiss chad. *Lebensmittel. Wissenschaft und technologic*, **36**, 679-684.
- 📖 **Quezel P. et Santa S., 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *C.N.R.S; Tome II*. Paris 7 ème. 17-22.
- 📖 **Quezel P., Barbero M., Benabid A., Rivas-Martinez S., 1994.** Le Passage de la végétation méditerranéenne Saharienne sur les revers méridionales du haut Atlas Oriental (Maroc). *Phytoenologia* ; **22(4)** : 537-582.
- 📖 **Rahman M.E., Soharb M.H., Hassan C.M., Rashid M.A., 2005.** « Antibacterial activity of *Claussena heotaphylla* » . *Fitoterapia*. **72**: 547-549.
- 📖 **Romani, A ; Pinelli, P ; Galardi, N ; Mulinacci, N ; & Tattini, M., 2002.** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L, *Phytochemical Analysis*, **13**: 79 86.
- 📖 **Saleh N A M, El- Negoumy S I, Abd-Alla, M F, Abou- Zaid M M, Dellamonica G,Chopin J., 1985.** Flavonoid glycosides of *Artemisia monosperma* and *A. herba alba*. *Phytochemistry*, **24** : 201 - 203.
- 📖 **Saleh NAM, El-Negoumy SI, Abou-Zaid MM.,1987.** Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, **26** : 3059 - 3064.
- 📖 **Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A., 2008.** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant Extract Food Chemistry, **106**, 868-873.
- 📖 **Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-calixto F. , 1998.**A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.*Journal Sci. Technology International*, **8**, 121-137.

- 📖 Sandhar H K, Kumar B , Prasher S, Tiwari P, Salhan M and Sharma P., 2011. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1** (1), 25-41.
- 📖 Scalbert A ., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**, 3875-3883.
- 📖Schewe, T., Sies, H ., 2003.Flavonoids as protectants against prooxidant enzymes. *Biologie médicale*. **34**: 243-253.
- 📖 Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids . *Journal of phytochemistr* .**67**: 2058-2070.
- 📖 Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H., 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J. Food Microbiology*, **117**: 112-119.
- 📖 Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J.,2004. Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. pp71-132
- 📖 Trease E., Evans W.C.,1987. Pharmacognosy Billiaire. Ed Tindall London 13, 61-62.
- 📖Umadevi, I ; Daniel, M ; Sabnis, S. D.,1988. Chemotaxonomic studies on some members of Anardiaceae. In Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Plant sciences, **98**(3), p.205–208.
- 📖 Valko, M., Rhodes, C.J.b, Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.,2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. **160**: 1-40.
- 📖 Valnet J., 1984. Aromathérapie: traitement des maladies par les essences des plantes. *Maloine S.A*; N°10: 23-178.
- 📖 Verma d.k., singh s.k., tripathi v., 1997. A rare antibacterial flavone glucoside from *Lantana camara*. *Indian Drugs*, **34**: 332-335.
- 📖 Volak J et Stodola J.,1983. « plantes médicinales », Gruint, Paris, P428
- 📖 Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W., Couteau, D., 2000. Human metabolic pathways dietary flavonoïds and cinnamatates. *Biochemical Society Transactions*. **28**: 16-22.
- 📖 Winter CA., Risley FA., Nuss GW.,1962. Carrageenin induced oedema in hand paw of the rat as assays anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* ; **111** : 544-547.

Annexe - I

Verreries et autres matériels :

- ✓ Boit de pétrie.
- ✓ Bécher gradué.
- ✓ Eprouvettes graduées
- ✓ Entonnoirs.
- ✓ Erlenmeyers.
- ✓ Papier filtre.
- ✓ Fiole conique stérile.
- ✓ Pipetes gradués à 5ml et à 10ml stériles.
- ✓ Pipettes pasteur stériles.
- ✓ Spatules métalliques.
- ✓ Bec bunsen.
- ✓ Boite de pétri.
- ✓ Disque bactérienne stérile.
- ✓ Gant.
- ✓ Papier aluminium.
- ✓ Pissette.
- ✓ Pince.

Appareillage:

- ✓ Balance pour animaux de laboratoire (GIBERTINI).
- ✓ Cages en makrolon avec grilles en inox et des biberons spéciaux pour les souris.
- ✓ Balance de précision.
- ✓ Plaque chauffante.
- ✓ Etuve et autoclave pour stérilisation.
- ✓ Incubateurs à 37 ° C.
- ✓ Agitateur magnétique.
- ✓ Centrifugeuse.
- ✓ Reflux.
- ✓ Haute.
- ✓ pied à coulisse manuel.
- **Réactifs et solutions**
 - ✓ Eau distillée
 - ✓ Méthanol
 - ✓ Iode (I₂).
 - ✓ Ethanol absolu
 - ✓ Acide sulfurique concentré (96%) (H₂SO₄).
 - ✓ Acide phosphomolybdique.
 - ✓ Alcool éthylique.
 - ✓ la solution alcoolique de KOH à 10%.
 - ✓ HCL concentré à 37%.
 - ✓ Hydroxyle d'ammoniac concentré à 30%.
 - ✓ Acétate de plomb.
 - ✓ solution de FeCl₃ à 1%.
 - ✓ Réactif de valser Mayer.
 - ✓ solution DPPH.
 - ✓ AlCl₃.

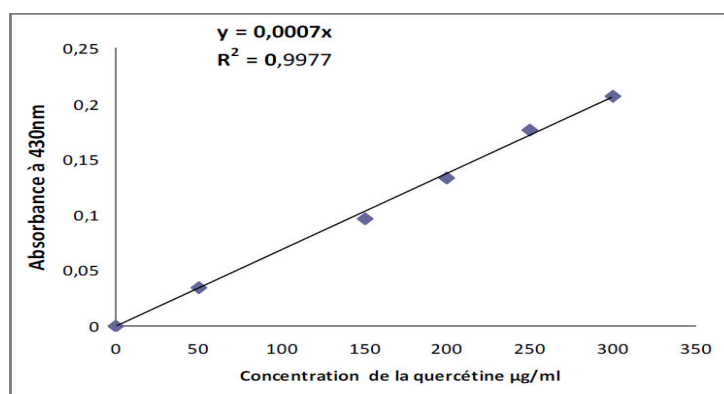
Annexe - II

✓ **Composition de Valsler Mayer :**

Chlorure mercurique.....	1,35gr
Iodure potassium	5gr
Eau distillé.....	30ml

Préparation :

Agiter jusqu'à dissolution puis ajuster jusqu'à 100ml d'eau distillé.



✓ La courbe d'étalonnage de la quercétine.

Annexe - III

Composé	Photo	Composé	photo
Les Anthocyanes		Les Coumarines	
Les Flavonoïdes		Les Alcaloïdes	
Les Tanins		Les glucosides	
Les Terpènes		Les Saponosides	

Annexe – IV

Tableau III : Identification et détermination des caractères biochimiques des Bactéries Gram- (Krieg *et al.*, 1984 et Holt *et al.*, 1994).

Bactéries Gram-	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>S.sonnei</i>	<i>S.enteridis.</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Caractères cultureux Sur gélose nutritive	Colonies ; bombées, moyennes, lisses et transparentes, 2 à 3 mm de diamètre	Colonies, rondes muqueuses, bombées, lisses et transparentes, 3 à 4mm de diamètre	Colonies rondes légèrement irisées ou plates, bombées et muqueuses	Colonies lisses, à bords réguliers, 3 à 4 mm de long et 0.6 um de large	Colonies assez grandes plus au moins opaques, de 1.5 à 3 mm de diamètre	Colonies moyennes, légèrement bombées opaques, brillantes et pigmentées en vert de 1.5 à 3 um de long et de 0.5 à 0.8 um de large
Examen microscopique	- Cocobacilles droits isolés ou en amas - Gram-	- Gros bacilles, droits entourées d'une capsule - Gram-	- Bacilles - Gram-	- Petites bacilles - Gram-	- Bacilles - Gram-	- Bacilles droits - Gram-
Respiration	- Aerobie-anaérobie facultatif	- Aérobie-anaérobie Facultatif	- Aérobie-anaérobie facultatif	- Aérobie-anaérobie facultatif	-Aérobie-anaérobie facultatif	- Aérobie strict
Oxydase	-	-	-	-	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	-	-
ADH	-	-	+	+	+	+
LDC	+	+	-	-	+	-
ODC	+	-	+	+	+	-
Indole	+	-	-	-	-	-
Citrate	-	+	+	-	+	+
Urée	-	+	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	+	-
TDA	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	+	-	-	-
Nitrates	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	-	+	-
Saccharose	+	+	+	-	-	-

Lactose		+	+	+	-	-	-
MEVAG	Aérobie	+	+	+	+	+	+
	Anaérobie	+	+	+	+	+	-
Mannitol		+	+	+	+	-	+
Mobilité		+	-	+	-	+	+
Gaz		+	+	+	-	+	-
King A et King B							+
Croissance à -4°C							-
Croissance à 41°C							+

Annexe - V

Tableau IV : Identification et détermination des caractères biochimiques des Bactéries Gram+ (Krieg *et al.*, 1994 et Holt *et al.* ; 1994).

Bactéries Gram+	<i>B.cereus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.faecium</i>
Caractères culturels sur gélose nutritive	Colonies rondes à contour irrégulier plat opaque, surface rugueuse et de couleur blanc jaunâtre de 3 à 5um de long sur 1 à 1.2 um de large	Colonies rondes à contour irrégulier plat opaque,	Colonies opaques arrondies bombées brillantes et à teinte blanche en jaune doré de 1 à 2 um de diamètre	Colonies petites lisses et opaques
Caractérisation de la spore	Elliptique, centrale et non déformante	Ovale centrale et non déformante		
Examen microscopique	- Bâtonnet droit (gros bacilles isolés ou en groupes sous forme de chaînettes) - Gram+	- Bâtonnet droit (gros bacilles isolés ou en groupes sous forme de chaînettes) - Gram+	- Coccis regroupés en diplocoques ou en amas (grappes de raisins) - Gram+	- Coccis libres en paires ou en chaînettes - Gram+
Respiration	- Aerobie-anaérobie facultatif	- Aérobie strict	- Aéro-anaérobie facultatif	- Aérobie-anaérobie Facultatif
Oxydase	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	-
ONPG	-	NF	NF	NF
ADH	+	NF	NF	NF
LDC	-	NF	NF	NF
ODC	-	NF	NF	NF
Indole	-	-	-	NF
Citrate	-	-	NF	NF
Urée	-	-	+	NF
H2S	-	NF	NF	NF
TDA	NF	NF	NF	NF
VP	+	+	NF	NF
Nitrates	+	+	NF	NF
Glucose	+	+	+	NF
Saccharose	+		+	+
Lactose	NF	NF	+	NF
coagulase	NF	NF	+	+

MEVAG	Aérobie	+	+	+	+
	Anaérobie	+	-	+	+
Mannitol		-	+	+	NF
Mobilité		+	+	-	NF
Xylose		-	+	-	NF
Hydrolysed'amidon		+	+		NF
Lécitinase		-	+		NF
Gélatinase		+	+		NF
Hémolyse sur gélose nutritive		NF	NF	Bêta	Bêta

Tableau IX : Pourcentages d'inhibition de l'œdème des pattes des souris en fonction du temps

	30mn	60mn	90mn	120mn	150mn	180mn	210mn
EP	-	-	-	-	-	-	-
Declof	60,6774669	89,7727273	100	100	100	100	100
C=100mg/ml	33,3333333	63,7829912	84,228474	100	100	100	100
C=200mg/ml	30,29	81,89	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tableau X: résultats statistique de l'activité anti-inflammatoire.

DOSE / Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr >Diff	Significatif
Essai 2 vs Témoin -	-0,633	-9,590	2,799	< 0.0001	Oui
Essai 2 vs Témoin+	-0,217	-3,281	2,799	0,018	Oui
1Essai 2 vs Essai	-0,100	-1,514	2,799	0,448	Non
Essai 1 vs Témoin -	-0,533	-8,076	2,799	< 0.0001	Oui
Essai 1 vs Témoin+	-0,117	-1,767	2,799	0,318	Non
Témoin+ vs Témoin -	-0,417	-6,309	2,799	< 0.0001	Oui

Tableau XI: Résultats statistique de l'activité antispasmodique.

Dose / Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr >Diff	Significatif
spasmodyl® vs Témoin -	-15,333	-28,258	2,799	< 0.0001	Oui
spasmodyl® vs Dose 10%	-2,833	-5,222	2,799	0,000	Oui
spasmodyl® vs Dose 20%	-1,500	-2,764	2,799	0,054	Non
Dose 20% vs Témoin -	-13,833	-25,493	2,799	< 0.0001	Oui
Dose 20% vs Dose 10%	-1,333	-2,457	2,799	0,098	Non
Dose 10% vs Témoin -	-12,500	-23,036	2,799	< 0.0001	Oui

Annexe – VI



pied à coulisse manuel (originale 2013)



Balance pour les petits animaux (originale 2013)



Gavage des souris (originale 2013)



Gonflement de la patte après
injection (originale 2013)



Filtration de l'infusé de (originale 2013)



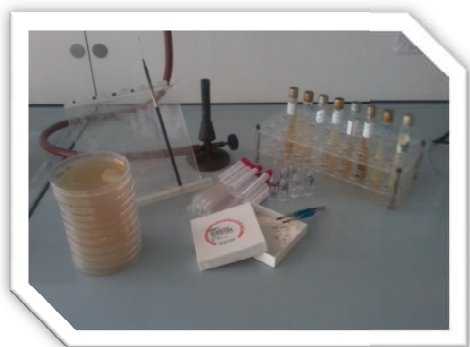
Centrifugeuse (originale 2013)



Balance analytique (originale 2013)



Un agitateur magnétique (originale 2013).



Matériel utilisé en microbiologie (originale 2013) .