

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida1-
Faculté des Sciences de Nature et de la Vie
Département de Biologie des Populations et des Organismes

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de
Master en Biologie
Option : Phytothérapie et Santé

Thème

*Contribution à l'étude phytochimique et
pharmacologique des extraits de feuilles et de jus du
fruit de cognassier (Cydonia oblonga Mill.)*

Présenté par

M^{elle} BOUCHENAFHA HADJER

Soutenu le :

29/10/2014

Devant le jury :

M ^{me} TAKARLI S.	M.A.A	Université Blida-1	Présidente
M ^{me} BENMANSOUR N.	M.A.A	Université Blida-1	Examinatrice
M ^{me} MAKHLOUF SH.	M.A.B	Université Blida-1	Examinatrice
M ^{me} CHERIF H.S.	M.C.B	Université Blida-1	Promotrice

Promotion: 2013/2014

Remerciements

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Je rends grâce à Dieu le tout puissant de m'avoir illuminé et ouvert les portes du savoir et donné la volonté et le courage, pour accomplir ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à ma promotrice M^{me} Cherif H. S. maitre de conférences à l'Université Blida-1 pour son soutien, sa grande disponibilité et ses conseils qui ont permis d'améliorer ce travail.

Mes sincères remerciements à M^{me} Takarli S. maitre assistant à l'Université Blida-1 de m'avoir honoré en acceptant de présider le jury.

Je tiens également à remercier mes examinateurs M^{me} Benmansour N. maitre assistant à l'Université Blida-1 et M^{me} Makhlouf CH. Maitre assistant à l'Université Blida-1 qui ont bien voulu accepté d'évaluer ce travail.

Mes sincères remerciements vont également aux chefs de services des laboratoires de physico-chimie , Microbiologie et pharmacologie du Complexe Antibiotical SAIDAL –Médéa qui m'ont permis d'accéder a cet établissement, ainsi qu'aux ingénieurs de laboratoire qui ont partagés avec nous leurs expériences.

Mes sincères remerciements vont à l'ensemble du personnel du Complexe Antibiotical SAIDAL-Médéa.

Un grand merci pour une amie Melle Hammiche S., qui m'a aidée par ces connaissances scientifiques.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma profonde reconnaissance à tous mes enseignants du département de Sciences de la Nature et de la Vie et un chaleureux merci à tous ceux qui m'ont aidés durant mon travail, certains par leurs connaissances scientifiques, d'autres par leurs soutien moral dans les moments difficiles ; afin d'accomplir ce modeste travail.

Merci pour tous

Dédicaces



Avec un grand plaisir, je dédie ce modeste travail :

*A la plus chère femme dans ce monde, le plus cher homme dans mon cœur :
Mes très chers parents, pour leur amour, qui m'ont soutenu, encouragé pour
que je puisse mener à bien mes études. Que Dieu les protèges.*

A mes chers frères : Ismail et Yassine

A ma sœur : Meriem

A mes nièces : Ikram, Yassmine et Fayrouz

A toute ma famille sans exception.

*Tous mes amis qui n'ont cessé de me réconforter tout au long de ce projet, et
tous les étudiants d'option phytothérapie et santé promotion 2013-2014*

A tous ceux qui me connaissent sans exception.

Hadjer

Résumé

La présente étude porte sur la mise en évidence de quelques activités biologiques de *Cydonia oblonga* Mill., afin de valoriser son utilisation en médecine traditionnelle.

Trois extraits ont été préparés à partir de cette espèce, en l'occurrence l'extrait aqueux des feuilles (EA), le jus brut de coing et l'extrait méthanolique des feuilles «EMF».

Le criblage phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles et le jus de fruit a permis de mettre en évidence la présence des principaux métabolites secondaires tels que les tanins, flavonoïdes, saponosides, quinones, leucoanthocyanes, coumarines et glycosides, qui pourraient être responsables des propriétés pharmacologiques.

Le dosage des phénols totaux effectué sur ces extraits et déterminé à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, a donné un rendement en polyphénols de l'EMF égale à 14.39 mg éqAG/g MS supérieur à celui de l'EA (3,81mg éqAG/g MS) et le jus de coing (0.6 mg éqAG/g MS).

L'étude de l'activité antioxydante par réduction du fer (FRAP) et du DPPH a mis en évidence le pouvoir antioxydant de l'EA, le jus et l'EMF suite à une comparaison avec l'antioxydant de synthèse (Vit C).

En ce qui concerne, le pouvoir antimicrobien des trois extraits, les résultats obtenus montrent que l'EMF possède un pouvoir antimicrobien sur la souche *Staphylococcus aureus* (12 mm) et *Staphylococcus epidermidis* (13mm) .De même, l'EA manifeste une activité antimicrobienne faible vis-à-vis de *Sarcina lutea* (11mm) , par contre le jus s'est révélé inactif sur les souches bactériennes testées.

L'effet anti-inflammatoire a révélé que l'EA à une dose de 2g/kg et le jus brut ont réduit l'œdème de la patte de la souris induit par la carraghénine de manière non significative.

En outre, l'évaluation de l'effet antispasmodique de l'EA et le jus brut chez les souris rendus spasmodiques par l'acide acétique a montré une diminution significative des spasmes.

L'étude de l'activité cicatrisante, montre que la poudre de la plante engendre une cicatrisation rapide et manifeste une activité cicatrisante équivalente à celle du Madécassol®.

Mots clés : *Cydonia oblonga* Mill., criblage phytochimique, EA, EMF, jus brut, métabolites secondaires, activités biologiques.

Abstract

The present study focuses on highlighting some biological activities of *Cydonia oblonga* Mill., in order to promote its use in traditional medicine.

Three extracts were prepared starting from this species, namely the aqueous extract of leaves (EA) , the raw quince juice and the methanolic extract of leaves “EMF”.

The phytochemical screening of the aqueous extract of leaves and the fruit juice allowed to show the presence of the principal secondary metabolites such as tannins, flavonoids, saponosids, quinones, leucoanthocyanes, coumarins and glycosides, which might be behind the pharmacological properties.

In addition, the proportioning of total phenols carried out on these extracts and determined starting from the calibration curve of the gallic acid, gave a polyphenol yield of the EMF equal to 14.39 Mg eqGA/g higher than that of the aqueous extract (3,81mg eqGA/g) and the quince juice (0.6 Mg eqGA/g dry matter).

The study of the antioxydant activity by iron reduction (FRAP) and the DPPH highlighted the antioxydant capacity of the aqueous extract, the juice and the EMF following a comparison with antioxydant of synthesis (Vit C).

About the antimicrobial property of the three extracts, the results show that the EMF has an antibacterial action on the strain *Staphylococcus aureus* (12 mm) and *Staphylococcus épidermidis* (13mm). In the same way, the EA expresses a weak antimicrobial activity towards *Sarcina lutea*, In contrast, the juice appeared inactive on the bacterial strains tested.

The anti-inflammatory test revealed that the aqueous extract of leaves, at a dose of 2g/kg and the raw quince juice reduced the paw edema of the mouse induced by carrageenan in a non significant way.

Moreover, the antispasmodic evaluation of the effect of EA and the raw juice in the mice made spasmodic by the acetic acid showed a significant reduction of spasms.

The study of the healing activity, show that the powder of the plant generates a fast cicatrization and exhibits a healing activity equivalent to that of Madécassol®.

Keywords: *Cydonia oblonga* Mill., phytochimic sifting ,EA , EMF, raw juice, secondary metabolites, biological activity.

ملخص

تحاول هذه الدراسة تسليط الضوء على بعض الانشطة البيولوجية للنبتة *Cydonia oblonga* Mill لتعزيز استخدامها في الطب التقليدي .

هذه الدراسة تمت على ثلاث مستخلصات المائي EA عصير السفرجل الخام و المستخلص الميثانولي EMF عن طريق الفرز الكيميائي للمادة الخام تم تسليط الضوء على وجود نواتج الايض الثانوية الرئيسية مثل العفص، الفلافونيدات، الكينونات، السينوزيد، الكومارينات و الكليكوزيدات التي من الممكن ان تكون مسؤولة عن بعض الخصائص العلاجية .

كما امكن اجراء تحليل كمية الفينولات للمستخلصات الثلاث بواسطة المنحنى البياني لحمض الغاليك الذي اعطى مردود الفينولات للمستخلص الميثانولي EMF يساوي 14.39 mg éqAG/g مرتفع مقارنة بالمستخلص المائي (3,81mg éqAG/g) و عصير السفرجل (0.6 mg éqAG/g).

كما كشفت دراسة النشاط المضاد للاكسدة عن طريق ارجاع الحديد FRAP و DPPH ان للمستخلصات الثلاث (المستخلص المائي، عصير السفرجل، و المستخلص الميثانولي) القدرة المضادة للاكسدة مقارنة مع الفيتامين C.

فيما يخص القدرة النشاط المضاد للمكروبات للمستخلصات الثلاث فقد بينت النتائج ان المستخلص الميثانولي EMF للنبات يتميز بنشاط مضاد للبكتيريا بالخصوص على سلالة *Staphylococcus aureus* (12 mm) و *Staphylococcus* (13mm) (*épidermidis*) ، كما ان المستخلص المائي اعطى نشاط ضعيف ضد سلالة (*Sarcina lutea* 11mm). بالمقابل عصير السفرجل لم يعطي أي نشاط ضد المكروبات المدروسة.

اعطت نتائج الاختبار الخاصية المضادة للالتهاب ان المستخلص المائي بجرعة 2غ/كغ و عصير السفرجل خفضا بنسبة غير معتبرة التهاب كف الفارة الناجم عن حقن الكراجينين.

في هذا السياق الدراسة ضد التشنجية عند فئران مصابة بالتشنج عمدا اثبتت بان المستخلص المائي EA و عصير السفرجل يخفض بنسبة كبيرة التشنجات.

كما ان دراسة النشاط الضماد للجراح اثبتت ان لبودرة *Cydonia oblonga* Mill. قدرة عالية على تضميد الجراح مثل المرهم Madécassol.

الكلمات الرئيسية :

Cydonia oblonga Mill، الفرز الكيميائي، المستخلص المائي EA، المستخلص الميثانولي EMF، العصير الخام، المركبات الثانوية، الانشطة البيولوجية.

Liste des abréviations

Abs : Absorbance

ANOVA : Analysis of variance.

ATCC : American Type Culture Collection

CHCl₃ : Chloroforme (trichlorométhane).

EA : Extrait aqueux

EMF : Extrait méthanolique des feuilles

éq : équivalent

FeCl₃ : Chlorure de fer.

HCl : Acide Chlorhydrique

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

KOH : Hydroxyle de potassium.

MeOH : Méthanol

Mg : Magnesium.

UV : Ultra-violet

[C] : Concentration

Liste des Tableaux

Tableau I : Structure chimique des acides organiques des feuilles de <i>Cydonia Oblonga</i> Mill.	(Annexe I)
Tableau II: Composition chimique des feuilles de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.....	(Annexe I)
Tableau III: Composition et valeurs moyennes pour 100 g de coing cru, frais	11
Tableau IV : les caractéristiques du matériel animal utilisé.	16
Tableau V:Les microorganismes utilisés dans l'activité antimicrobienne.....	16
Tableau VI : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés d'extrait étudié..	28
Tableau VII: Répartition des lots pour le test de l'effet antispasmodique..	31
Tableau VIII : Echelle de cotation de l'effet cicatrisant	36
Tableau IX: La teneur en eau et de matière sèche des feuilles du <i>Cydonia oblonga</i> (AnnexeIII)	
Tableau X : Résultat du screening photochimiques.	38
Tableau XI : La densité optique des trois extraits et l'acide ascorbique.....	(AnnexeIII)
Tableau XII : : Le pourcentage de l'activité antiradicalaire des trois extraits et l'acide ascorbique.....	(AnnexeIII)
Tableau XIII: Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et le jus.....	44
Tableau XIV : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles «EMF».....	45
Tableau XV: : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot témoin (l'eau distillée)	(AnnexeIII)
Tableau XVI: Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot produit de Référence (Diclofénac®).....	(Annexe III)
Tableau XVII: Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot extrait aqueux	(Annexe III)

Tableau XVIII : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot jus	(Annexe III)
Tableau XIX : Etude statistique de l'activité anti-inflammatoire	(Annexe III)
Tableau XX : Résultats de l'activité antispasmodique	(Annexe III)
Tableau XXI: Pourcentage de protection de l'activité antispasmodique	48
Tableau XXII: Etude statistique de l'activité antispasmodique	(Annexe III)
Tableau XXIII: Résultats du contrôle microbiologique de la pommade.....	50

Sommaire

INTRODUCTION

Partie I

Rappels bibliographiques

I. Rappels bibliographiques

I.1 Généralités sur la phytothérapie et les plantes	1
I.1.1. Histoire de la phytothérapie	1
I.1.2. Utilisation des plantes médicinales en Algérie	3
I.1.3. Définition de la phytothérapie	3
I.1.4. Les avantages de la phytothérapie	4
I.2. Généralités sur le cognassier	5
I.2.1. Historique et origine	5
I.2.2. Etymologie	6
I.2.3. Systématiques	7
I.2.4. Description botanique	7
I.2.5 Période de floraison.	10
I.2.6 Exigences écologiques.....	10
I.2.7 Composition chimique et valeur nutritionnelle de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.	10
I.2.8 Vertus thérapeutiques de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.	11
I.2.9 Cicatrisation et plantes cicatrisantes	13

Partie II

Matériel et méthodes

II. 1. Matériel	15
II.1.1 Matériel biologique	15
II.1.1.1. Matériel végétal	15
II.1.1.2. Matériel animal.....	15
II.1.1.3. Les microorganismes.....	16
II.1.2 . Matériel non biologique	16
II. 2. Méthodes	17

II. 2.1. Préparation de la poudre végétale	17
II. 2.2. Détermination du taux d'humidité	17
II.2.3. Extraction des métabolites secondaires	18
II. 2.3.1. Préparation de l'infusé	18
II. 2.3.2. Préparation du jus de coing	18
II. 2.3.3. Préparation de l'extrait méthanolique des feuilles «EMF»	19
II.2.4. Screening phytochimique préliminaire pour l'infusé et le jus	19
II.2.5. Dosage des phénols totaux pour les trois extraits étudiés (extrait aqueux, jus et EMF).....	22
II. 2.6. Etude des activités biologiques de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.	23
II.2.6.1.Evaluation de l'activité anti-oxydante pour les trois extraits étudiés (EA, jus pure, EMF).....	23
II.2.6.1.a) Détermination du pouvoir réducteur par la méthode FRAP	23
II.2.6.1.b) Détermination du pouvoir anti-radicalaire par réduction du radical libre DPPH.....	25
II.2.6.2.Évaluation de l'activité antimicrobienne des trois extraits étudiés de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.	26
II.2.7.Etude des activités pharmacologiques de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.....	28
II.2.7.1.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'EA des feuilles et le jus du fruit de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.....	28
II.2.7.2.Evaluation de l'activité antispasmodique.....	30
II.2.7.3.Evaluation de l'activité cicatrisante des feuilles de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.....	32

Patrie III

Résultats et discussion

III. 1. Détermination de la teneur en eau dans les feuilles de <i>Cydonia oblonga</i> Mill.....	37
III. 2. Rendement en EMF.....	37
III. 3. Résultats du Screening phytochimique.....	37
III. 4. Dosage des polyphénols totaux	39
III.5. Résultats des activités biologiques	40
III.5.1. Résultat de l'activité anti-oxydante pour les trois extraits étudiés (EA, jus pure, EMF)	40
III. 5.1.1. Détermination du pouvoir réducteur par la méthode FRAP	40
III. 5.1.2. Détermination du pouvoir anti-radicalaire par réduction du radical libre DPPH.....	41

III. 5.2. Résultats de l'activité antimicrobienne des trois extrais étudiés de <i>Cydonia oblonga</i> Mill. (EA, le jus et l'EMF).....	43
III. 6. Résultats des activités pharmacologiques.....	47
III.6.1. Résultat de l'activité anti-inflammatoire de l'EA, jus de <i>Cydonia oblonga</i> Mill. ...	46
III.6.2. Résultat de l'activité antispasmodique	48
III.6.3. Résultats de l'activité cicatrisante.	49
III.6.3.1. Résultat du contrôle physicochimique de la pommade.	48
III.6.3.2 Résultats du contrôle microbiologique.....	48
III.6.3.3. Résultats de l'essai préliminaire de cicatrisation	49

Conclusion

Références Bibliographiques

Annexes

Rappels bibliographiques

I. Rappels bibliographiques :

I.1. Généralités sur la phytothérapie et les plantes :

I.1.1. Histoire de la phytothérapie :

Depuis les temps les plus reculés l'homme a cherché un moyen d'assouvir sa faim. Il a trouvé chez les végétaux des aliments nourrissants, mais aussi des remèdes à ses maux et il a appris à ses dépens à discerner les plantes toxiques. Ces connaissances, transmises d'abord oralement, ont ensuite été dans les écrits et il subsiste des traces de l'emploi des plantes comme médicaments par les anciens dans les plus vieilles civilisations (**Chabrier, 2010**).

Le premier recueil connu de formules végétales date de l'époque sumérienne, il y a 5000 ans, il a été gravé en caractères cunéiformes sur des tablettes d'argile, découvertes à Nippur en 1948 et recensé jusqu'à 250 espèces de plantes avec des suspensions, des décoctions et des onguents (**Clarac, 2008**). Dans ces derniers sont mentionnées des drogues comme l'opium, le Galbanum, l'Ase fétide, la Mandragore, ou encore la Jusquiame (**Paris et Moyse, 1976**). Déjà aux environs de 2000 ans av. J.-C., le roi assyrien Hammourabi (période de règne : 1792-1750 av. J.-C.) encourageait la culture des plantes médicinales (**Bézanger-Beauquesne et al., 1975**).

Le *Papyrus Ebers*, écrit vers 1600 av. J.-C., est l'un des témoignages les plus complets sur ce sujet. Ce rouleau de papyrus de grande valeur, provenant du pillage d'une sépulture et qui porte le nom de l'égyptologue Georg Ebers (1837-1898) qui en fit l'acquisition en 1873 pour le compte d'un musée allemand, mesure 18 mètres de long et comporte en tout 877 articles, essentiellement des recettes de médecine égyptienne à base de plantes (**Koth, 2007**).

Les Egyptiens possédaient déjà des notions de pharmacopée et plus de 200 plantes différentes, ramenées de Syrie par le pharaon Thoutmosis III, apparaissent sur le bas-relief du temple de Karnak (1450 ans avant J.C.) (**Fouché et al., 2000**).

Les premiers témoignages sur l'utilisation de remèdes naturels provenant d'Inde datent approximativement de la même période. Ainsi le Veda, recueil d'hymnes dont le titre peut se traduire par «savoir sacré», contient de nombreuses informations sur les connaissances en plantes médicinales de l'époque ; le *Caraka samhita* qui rassemble des traités médicaux rédigés par le médecin indien Caraka vers 700 av. J.-C., mais dont l'origine est vraisemblablement plus ancienne, recense déjà 1500 plantes médicinales (**Koth, 2007**).

Rappels bibliographiques

Les Grecs héritèrent, de la même manière, de certaines de drogues orientales par l'intermédiaire des Perses. Ils eurent de grands médecins comme Hippocrate (460-377 av.J.-C.), ou encore Aristote (384-322 av. J.-C.), qui utilisaient des narcotiques (Opium, Jusquiame, Mandragore) (**Bézanger-Beauquesne et al., 1975**).

Mais c'est Discoride, herboriste grec (100 ans avant J.C.), né en Asie mineure, qui est le véritable ancêtre des pharmacognostes. Il écrivit un recueil de cinq livres consacré à plus de 500 espèces de plantes médicinales, regroupant déjà les Labiées, les Papilionacées, les Apiacées et les Astéracées. Cet ouvrage connu sous le nom de «*De Materia Medica*», fut publié pour la première fois en 1478. Il constitua la référence principale en Europe jusqu'au 18^e siècle, en rassemblant environ 600 plantes (genévrier, orme, pivoine, bardane etc.).

Galien (130-201 avant J.-C.), d'origine grecque et médecin personnel de l'empereur romain Marc Aurèle, élaborait sa théorie des «quatre humeurs» et s'intéressa surtout à l'anatomie. Son influence se poursuivra durant près de 15 siècles. Il écrivit seulement trois livres et se limita aux plantes qu'il appréciait personnellement. Il est considéré comme le père de la pharmacie (**Verdrager, 1978 ; Wichtl et Anton, 1999**).

A l'apogée de l'empire arabe, tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7^e et 9^e siècle). Les arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Abu Bakr al-Razi ou Rhazès (865-925), fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrivit la célèbre encyclopédie "Canon de la médecine". Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très complet Somme des Simples : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs (**Fouché et al., 2000**).

Après plusieurs millénaires d'utilisation exclusive des plantes pour traiter les maladies, une mutation soudaine s'opéra aux XIX^e et XX^e siècles. Grâce aux progrès dans le domaine de la chimie, il fut alors possible d'extraire les substances actives des plantes, par exemple la morphine contenue dans le pavot, pour les utiliser de façon ciblée. Par la suite, on parvint même à fabriquer certaines substances actives de manière synthétique, voire à les modifier pour en améliorer l'efficacité. L'industrie pharmaceutique supplanta ainsi de plus en plus la médecine naturelle. (**Koth, 2007**).

Rappels bibliographiques

Un retour en arrière est apparu au cours des dernières années, en particulier à cause de la crise de confiance dont souffrent les médicaments pharmaceutiques en raison de problèmes survenus suite à la consommation de certains remèdes. La découverte des effets secondaires indésirables de certains médicaments pharmaceutiques a également contribué à modifier la mentalité des patients qui sont désormais plus vigilants lorsqu'ils utilisent ces produits et se tournent de plus en plus volontiers vers des remèdes domestiques à base de plantes, en particulier lorsque leurs maux sont bénins (**Koth ,2007**).

I.1.2.Utilisation des plantes médicinales en Algérie :

Le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, le Sahara et autour des points d'eau. En effet, plusieurs espèces se trouvent répandues sur des centaines d'hectares dans toutes les régions du pays comme la lavande, le romarin, la sauge (**Gheyouché et Hammiche, 1998**).

En Algérie, les plantes médicinales sont utilisées depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle, s'inspire principalement de la médecine arabe classique et de l'expérience locale des populations en matière de soins. Les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions médicales et la vie des habitants de cette région du monde, mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne. (**Baba Aïssa, 1999**).

Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie Algérienne et pour le maintien de l'équilibre écologique de la région .Parmi ces ressources, il existe au moins 500 espèces de plantes médicinales utilisables par les phytothérapeutes, dont 100 espèces se vendent au marché chez les herboristes (**Baba Aïssa, 1999**).

I.1.3.Définition de la phytothérapie :

Etymologiquement, ***la phytothérapie*** vient du grec phytos qui veut dire plantes et thérapia qui veut dire soins ou traitement. La phytothérapie est donc l'art de soigner par les plantes médicinales (**Salle,1991**) .

Les plantes sont dites médicinales lorsqu'elles présentent des activités pharmacologiques. Cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain, elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie, ainsi que dans la confection de boissons, soit nature, soit en préparations

Rappels bibliographiques

galéniques, soit encore sous forme de principes actifs comme matière première pour l'obtention de médicament (**Babulka, 2007**).

I.1.4. Les avantages de la phytothérapie :

L'utilisation traditionnelle des plantes médicinales remonte à fort longtemps, elle est sans doute, aussi ancienne que l'est la maladie. Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. De tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (**Bezanger- Beauquesne et al, 1990**).

Actuellement, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Iserin, 2001**).

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (**Iserin, 2001**).

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (**Nostro et al., 2000**) et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires (**Schnaubelt, 1998**).

Rappels bibliographiques

I. 2. Généralités sur le cognassier :

I.2.1. Historique et origine :

Les aires d'origine du cognassier sont les littoraux iranien et caucasien de la mer Caspienne (Azerbaïdjan); des cognassiers sauvages se rencontrent dans les forêts et maquis des pays riverains de cette mer et en Îlots dans des zones un peu plus éloignées (**Brosse, 2010**).

Augustin Pyrame de Candolle (botaniste genevois, 1778-1841) affirme qu'il y a plus de 4000 ans en Babylonie, parmi 46 espèces de plantes cultivées, figurait le cognassier. Non spontané dans ce pays, il y aurait été introduit depuis les bords de la Caspienne (**Tonelli et Gallouin, 2013**).

Sa culture s'est ensuite étendue vers l'Orient jusqu'en Inde himalayenne et en Chine, puis vers l'Occident en Asie mineure et en Europe orientale avant la Guerre de Troie (XIII^e siècle avant notre ère). Le cognassier se serait naturalisé dans ces régions et plus tard aurait gagné l'Europe du sud-ouest et l'Algérie.

L'agronome arabo-andalou Ibn Al-Awwâm (fin XIIe-début XIIIe siècle), dans son Livre d'Agriculture, distingue le cognassier sauvage, du cultivé ; il dit qu'en période de disette ou de cherté on peut faire une sorte de pain avec les coings .Ibn Al-Awwâm, rapportant des propos du Prophète Mohammed (que le salut soit sur lui) , dit qu'il faut « manger du coing parce qu'il fortifie le cœur et donne de l'énergie à l'âme », et Abû Abdallah que « celui qui mange du coing Dieu lui délie la langue pour la science pendant quarante nuits». (**Tonelli et Gallouin, 2013**)

Depuis Galien (1^{er} siècle de notre ère) et jusqu'au XVIe siècle, les fruits portés sur des arbres n'avaient pas bonne presse dans le monde médical, mais le coing à confire échappait à cet ostracisme et la pâte de coing était un mets servi en dessert. François 1^{er} et Louis XIV étaient friands de cotignac. Dans le calendrier républicain de l'an II (1793) le jour du coing était le 28 brumaire (18 novembre) (**Tonelli et Gallouin, 2013**) .

Ce fruit si apprécié des anciens qui le faisaient figurer dans leurs festins lardé de clous de girofle ou confit au miel (melimela), a toujours passé pour un astringent salutaire dans les flux diarrhéiques. (**Leclerc, 1976**), son astringence lui valut une place dans la médecine antique (**Babo ,2006**).

Rappels bibliographiques

En Espagne au XVI^e siècle le coing était employé comme contrepoison infaillible de l'hellébore blanc. La « pomme d'or » qu'est le coing est le symbole de l'immortalité.

Bien que cultivé depuis les temps les plus reculés, le cognassier est l'essence fruitière ayant subi le moins de modifications dans la saveur originelle de son fruit (**Bretauudeau et Fauré, 1990**).

I.2.2. Etymologie:

Cognassier commun: *Cydonia oblonga* Mill. (*Cydonia vulgaris* Pes.– *Pyrus cydonia* L.)

Les Grecs qui appréciaient ce fruit venu de Crète le nommaient Cydonia, du nom de la ville kudonia du peuple crétois, les Kudones. Le nom botanique est en fait issu de la ville de Kotonion au sud de l'Asie mineure, rappelant l'origine asiatique du coing. Cydonia a donné en latin *cydoneum malum* (la pomme de Cydon) qui, par une altération, a conduit à *cotoneum malum* (ce qui n'a aucun rapport avec le coton) d'où proviennent les noms français de « cooin » au XIII^e siècle, puis « coin », « coudoignac » (François Rabelais, XVI^e siècle), « coignier » en 1600 pour Olivier de Serre, et Coing au XVIII^e siècle (**Beloued, 2001 ; Tonelli et Gallouin, 2013**).

Cognassier et Coignassier reprennent le nom du fruit de l'arbre sauvage : la coignasse.

Le nom d'espèce *vulgaris* signifie : qui est commun.

Oblonga : définit la forme du fruit, qui est oblong, piriforme (**Brosse, 2010**).

En anglais : c'est Quince (**Bossard et Cuisance, 1984**).

En arabe : Safgardjel, R'hçace (**Beloued, 2001**).

Appellations locales : Sferdjel, Taqtounia ... (**Baba Aïssa, 2011**) Takthouniya (**Beloued, 2001**).

Rappels bibliographiques

I. 2.3. Systématiques :

D'après **Brosse (2010)** *Cydonia oblonga* Mill. appartient au :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Rosales

Famille : Rosacées

Genre : *Cydonia*

Espèce: *oblonga* Mill.

I.2.4. Description botanique :

Le cognassier est un petit arbre non épineux (**figure 01**). Avec son tronc et ses branches tortueux il a un port pittoresque ; se courbe vers le sol sous le poids des fruits (**Tonelli et Gallouin, 2013**),(**figure02**) s'il peut atteindre à un certain âge 6 à 8 m de hauteur , le cognassier ne dépasse généralement pas 4 à 5 m, et à l'état sauvage n'est souvent qu'un arbrisseau buissonnant (**Brosse, 2010**).

Botaniquement, l'espèce *Cydonia oblonga* forme à elle seule le genre *Cydonia*, très proche du poirier cultivée en Algérie comme porte greffe de poirier et pour ses fruits (**Brosse, 2010 ;Baba Aïssa, 2011**).



Figure 01 : Arbre de *Cydonia oblonga* Mill. lors de la floraison (**originale, 2014**)



Figure 02 : Arbre de *Cydonia oblonga* Mill. après maturité du fruit (**originale, 2014**)

Rappels bibliographiques

- **Feuille** : les feuilles sont alternes, molles, simples et entières (ou légèrement dentelées) sont grandes (6 à 10 cm de longueur sur 4 à 8 cm de largeur) tomenteuses, et de forme oblongue(**Baba Aïssa, 2001**), (**figure03**). Elles sont arrondies ou en cœur à la base et obtuses au sommet (ou avec une légère pointe) devenant vert foncé lustré et glabres à la face supérieure, restant feutrées de gris à la face inférieure ; à pétiole court, feutré et rougeâtre. En automne les feuilles deviennent jaune vif avant de tomber (**More et White, 2005 ; Brosse, 2010 ; Tonelli et Gallouin, 2013**) ainsi que les stipules marcescentes (**Beloued, 2001**).

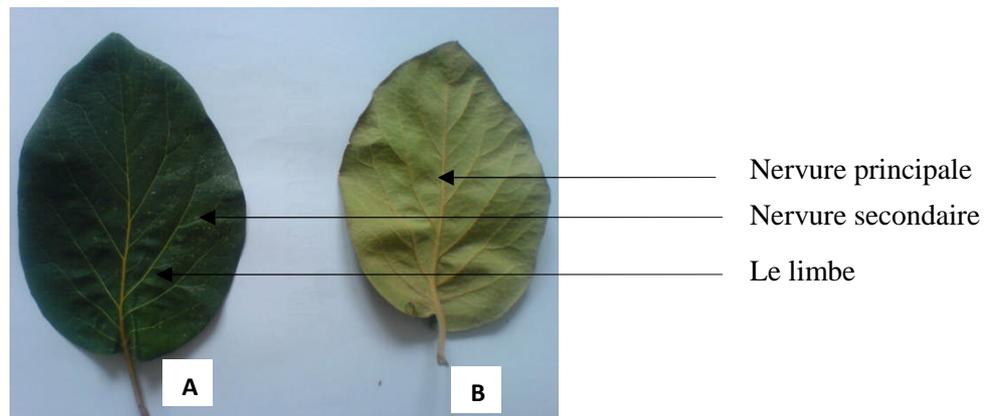


Figure03 : Feuilles de *Cydonia oblonga* Mill.(A) : la face supérieur, (B) : la face inférieure (**originale,2014**)

- **Fleurs** : Les fleurs sont régulières (actinomorphes), très grandes de 4 à 5 cm de diamètre, solitaires ou par deux et subsessiles (à très court pédoncule) au bout des petits rameaux(**Brosse, 2010 ; Tonelli et Gallouin, 2013**), riches d'un calice, d'une corolle à pièces (les pétales sont grandes, parfumées, d'un blanc rosé, suborbiculaires) (**figure04**) ; à 20 étamines plus courtes que les sépales à anthères jaunes,(**Baba Aïssa, 2001 ; Boullard, 2001**) .Les bases des 5 sépales sont suturées entre elles et forment une urne où se loge l'ovaire infère qui y adhère (concréscence),(**figure05**). Au sommet de l'urne les sépales forment 5 lames foliacées dentées et glanduleuses. Les fleurs sécrètent un nectar recherché par les abeilles (**Tonelli et Gallouin, 2013**).



Figure04 : Fleur de *Cydonia oblonga* Mill. (**Originale, 2014**)

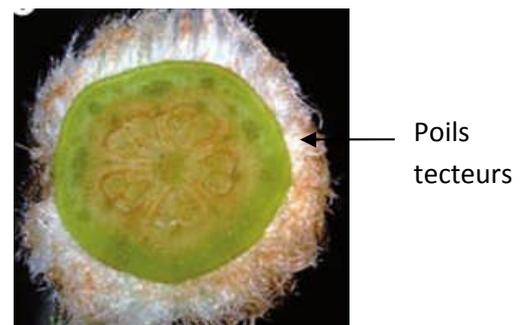


Figure05 : Coupe transversale de l'ovaire (**Tonelli et Gallouin, 2013**)

Rappels bibliographiques

- **Fruit** : Après la fécondation assurée par les insectes (entomophilie), l'ovaire et l'urne calicinale se développent et donnent un très gros fruit charnu indéhiscent et dense ; subglobuleux ou piriforme, rarement pédonculé ; inséré directement sur le rameau porteur, gros ou très gros (variétés fruitières), il est côtelé, recouvert d'un fin duvet floconneux et caduc, mais abondant, avec une peau cireuse ou presque huileuse (Bretaudeau et Fauré, 1990 ;Tonelli et Gallouin, 2013),(figure06). La Chair est très parfumée, dure, jaune pâle ou jaune d'or intense à maturité (la pomme d'or) (Boullard,2001), de 15 cm de longueur, juteuse (Bretaudeau et Fauré, 1990 ;Burnie et al., 2003) de saveur sucrée un peu âpre et astringente à l'état frais (Baba Aïssa, 2001 ;Brosse, 2010) à 5 loges contenant chacune 10 à 15 graines (Beloued, 2001).



Figure 06 : Fruit de *Cydonia oblonga* Mill. (Originale, 2014)

- **Graine** : les nombreuses graines (pépins) exalbuminées sont entourées de mucilage (Tonelli et Gallouin, 2013), (figure07).

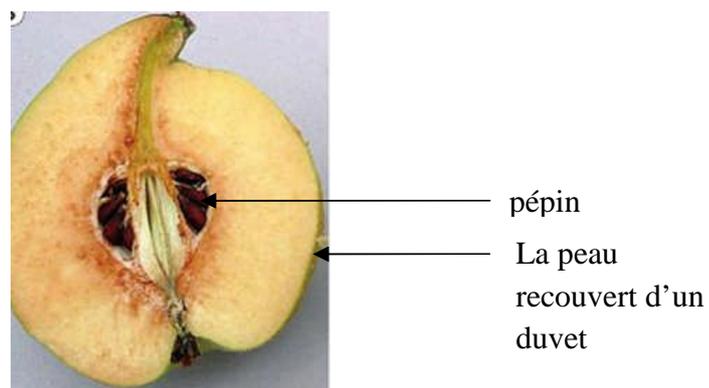


Figure07 : Coupe longitudinale d'un coing (Tonelli et Gallouin, 2013)

- **Ecorce** : L'écorce de couleur pourpre tirant sur le brun, s'exfolie en plaques irrégulières, révélant une nouvelle écorce d'un brun orangé (Russell et Cutler, 2008).

Rappels bibliographiques

I.2.5. Période de floraison :

La période de floraison se situe entre les mois de Mars et d'Avril (**Beloued, 2001**).

Sa floraison est une des plus tardives de tous les arbres fruitiers (**Bretonneau et Fauré, 1990**).

I.2.6. Exigences écologiques :

Cydonia oblonga Mill. ne se plaît qu'en climat tempéré frais. Il exige un sol profond, frais, et une situation ensoleillée. Il préfère les sols silico-argileux, mais tolère bien les terrains calcaires s'ils sont frais. Il ne craint pas le froid, mais demande de l'humidité pour le mûrissement de ses fruits. Multiplier par semis de graines de fruits trop mûrs, ou par greffage pour les variétés dénommées (**Burnie et al., 2003 ; Brosse, 2010**)

I.2.7. Composition chimique et valeur nutritionnelle de *Cydonia oblonga* Mill. :

Le fruit renferme des tanins (riches en tanins condensés) (**Bézanger-Beauquesne et al., 1990**), de forte proportion de pectine, glucides (**Baba Aïssa, 2001**), glucosides de polymères procyanidoliques (**Porter et al., 1985**) huiles essentielles, acides organiques (acide citrique, acide malique, acide oxalique, acide quinique, acide shikimique et acide fumarique), (**Oliveira et al., 2008**), (**Tableau I, Annexe I**) et vitamines (**Beloued, 2001**).

Les principaux polyphénols présents dans la cuticule et la pulpe du coing sont les acides hydroxycinnamiques, principalement l'acide chlorogénique, et les flavonoïdes : Dans l'extrait de pulpe, les acides chlorogéniques représentent 61% des composés phénoliques, et l'acide 5-O-caféoylquinique est le plus abondant (37%), tandis que dans l'extrait de cuticule l'acide chlorogénique représente seulement 13%, avec la rutine comme polyphénol principal (36%).

Les flavonols sont présent comme mélange d'aglycones différentes et de quercétine glycosylée et kaempférol. Les flavonols sont presque limités dans la pulpe, essentiellement catéchine et procyanidines. Les feuilles se caractérisent par la présence des acides mono et dicaféoylquiniques et deux dérivés de quercétine et de kaempférol (**Tableau II, Annexe I**), (**Fattouch et al., 2006**).

L'odeur agréable du coing est due à des constituants volatils dont l'un des plus importants est une lactone (**Tsuneya et al., 1980**)

Rappels bibliographiques

Les graines contiennent plus de 22% de mucilages en particulier des pentosanes (l'arabinose et xylose) et leur amande contient un glucoside cyanogénétiques dont l'amygdaline(en quantité modérée), tanin, lipides... (**Baba Aïssa, 2001 ;Brosse, 2010**)

Le coing est essentiellement riche en eau et en sucres (89% de l'apport énergétique). Sa faible teneur en sel et sa richesse relative en potassium le rendement diurétique. Sa grande teneur en fibres alimentaires en fait un aliment intéressant pour le transit digestif (**Tableau III**).

Tableau III : Composition et valeurs moyennes pour 100 g de coing cru, frais

Composition et valeurs moyennes pour 100 g de coing cru, frais	
Energie	27 kcal ou 112,86 kj
Eau	84 g
Glucides disponibles (sucres)	6,5 g
Fibres alimentaires (pectine)	6,5 g
Lipides	0,2 g
Protéines	0,3 g
Sodium	3 mg
Potassium	200 mg
Magnésium	6 mg
Phosphore	20 mg
Calcium	14 mg
Fer	0,3 mg
Caroténoïdes	0,03 mg
Vitamines B ₁ (thiamine)	0,02 mg
Vitamines B ₂ (riboflavine)	0,02 mg
Vitamines B ₃ (niacine=nicotinamide=vit. PP)	0,2 mg
Vitamines B ₅ (acide pantothénique)	0,08 mg
Vitamines B ₆ (pyridoxine)	-
Vitamines B ₉ (acide folique=folates=vit. Bc)	-
Vitamine C (acide ascorbique)	15 mg (soit 10 % des apports journaliers recommandés=AJR)
Tanins	+++
Acide malique	+++

(Tonelli et Gallouin, 2013)

I. 2.8. Vertus thérapeutiques de *Cydonia oblonga* Mill. :

Cydonia oblonga Mill. possède des effets anti-inflammatoire, anti-lithiasique (feuilles), antimicrobien, antiulcéreux, antioxydant, anti-allergique, antivirale et antiprolifératif des cellules cancéreuses (**Carvalho et al.,2010 ;Oliveira et al., 2012**). Le coing est utilisé comme astringent, émollient, expectorant, tonique, sédatif ,stomachique ,hypotensif et autres (**Baba Aïssa, 2001 ; Babo, 2006 ; Zhou, 2014**) .

Rappels bibliographiques

Du point de vue médical, le coing est un antidiarrhéique très efficace. Sa pectine adoucit l'action astringente des tanins, ce qui le fait recommander dans les diarrhées des tuberculeux, des convalescents, des enfants et des personnes âgées. Son astringence le fait employer aussi contre les crachements de sang, les hémorroïdes saignantes, et les relâchements du vagin, les maux de gorge, les aphtes et les gingivites (**Bellakhdar, 1997 ;Debuigne et Couplan ,2006**).

Usage interne :

Les feuilles astringentes sont stomachiques (**Tonelli et Gallouin, 2013**), et l'écorce de ses jeunes rameaux sont fébrifuges, cependant que les infusions de fleurs s'avèrent béchiques et antispasmodiques. La tisane préparée avec des morceaux de fruits bouillis a fait preuve de son aptitude à juguler les hémorragies, à stopper les vomissements et faciliter la digestion. (**Boullard, 2001 ;Tonelli et Gallouin, 2013**) quant aux racines du cognassier, en décoction elles est utilisé comme antidiabétique (**Ghourri et al., 2013**)

Les graines renferment un mucilage très abondant analogue à la gomme adragante et l'on en fait un grand usage en médecine traditionnelle, comme adoucissantes. On les prépare en décoction et sous forme de compotes, de cotignac (en donner 100 à 200 g par jour) de gelées, de pâtes et de sirops agit contre l'enrouement et les affections de la gorge et les inflammations des muqueuses. (**Beloued, 2001 ; Schauenberg, 2006**)et contre les bronchites (**Baba Aïssa 2001 ;Debuigne et Couplan ,2006**).

Les pépins pilés et macérés dans de l'eau, préalablement bouillie, entre dans la composition de certains collyres aux propriétés calmantes et émollientes.

Les pépins, mis à macérer dans l'eau puis chauffés, donnent un mucilage émollient et adoucissant fut indiqué dans le traitement des coliques par voie rectale et pratiquement pour toutes les irritations du gros intestin, recommandées en injection vaginales en cas de leucorrhées (**Boullard, 2001 ;Tonelli et Gallouin, 2013**).

Usage externe : la pulpe de coing est utilisée en cosmétologie pour les soins de la peau comme un masque anti-peau grasse (**Baba Aïssa, 2001**). La « bandoline» des coiffures, ancêtre de la Gomina qui servait à lisser les cheveux était une eau visqueuse aromatisée, dont la base était le mucilage des pépins de coing (**Debuigne et Couplan ,2006 ;Tonelli et Gallouin, 2013**) l'emploi des semences soit en mucilage ou réduites en poudre servent de pansement rafraîchissante contre les gerçures des lèvres, les crevasses du mamelon, les brûlures ,les érosions aphteuses, l'eczéma des mains et les hémorroïdes enflammées

Rappels bibliographiques

(**Leclerc,1976**).En les pilant dans un peu d'eau. Fleurs et feuilles seraient antispasmodiques et sédatives (**Couplan ,2009**).

Autres usages culinaires : les coings sont trop astringents pour pouvoir être mangés crus, mais, après cuisson, ils donnent des sirops, des gelées, des pâtes, des liqueurs délicieusement parfumées, et le cognac, (**Debuigne et Couplan ,2006**) Cette spécialité d'Orléans, est une pâte de coing très sucrée ; déjà citée au temps de Louis XI (XIII^e siècle), il était apprécié des rois et de leur Cour et offert aux invités de marque. Si le sucre a aujourd'hui remplacé le miel dans sa préparation, le cognac reste une confiserie estimée (**Tonelli et Gallouin, 2013**).

En Algérie, le fruit sert à préparer une confiture spéciale (rappelant le Loukoum) appelée : mādjoune et-tbassa et au Maroc, il entre dans la préparation des plats cuisinés, mélangés à d'autres légumes : khalouta (**Baba Aïssa, 2001**).

Au Maroc, le coing est surtout utilisé dans l'alimentation (ragoûts,confitures et jus). Le ragoût de viande aux coings et aux gombos est la spécialité de Fès (**Bellakhdar ,1997**).

En Europe de l'Est, le coing est utilisé comme légume en soupe d'hiver (**Tonelli Gallouin, 2013**).

Dans le sud de l'Italie, on fait cuire sous la cendre des coings peu astringents. En Turquie, de gros coings doux, fermes et aromatiques, très juteux, sont mangés à la cuillère avec du sel et du jus de citron, ainsi qu'on prépare du «pekmez» en concentrant le jus extrait du fruit en un sirop épais, aromatique et sucré (**Couplan ,2009**).

Les coings, choisis sains, se conservent assez longtemps et peuvent parfumer discrètement une pièce (**Tonelli et Gallouin, 2013**).

I.2.9. Cicatrisation et plantes cicatrisantes :

a)- Définition de la cicatrisation :

la cicatrisation est un processus de réparation tissulaire imparfaite qui aboutit à une cicatrice fibreuse. C'est un système de défense qui passe par une dédifférenciation cellulaire (**Mélessopoulus et Lavacher, 2001**).

b)- Définition de la cicatrice :

Tissus fibreux remplaçant à titre définitif ou très prolongé un tissu normal après une lésion.

Rappels bibliographiques

Le tissu cicatriciel se forme aussi bien dans les organes internes (à la suite d'une rupture musculaire, d'une intervention chirurgicale) que sur la peau (**Larousse Médical, 2003**).

c)-Quelques plantes cicatrisantes du bassin méditerranéen :

Bellakhder propose soit des agents maturatifs, soit des antiseptiques curatifs et cicatrisants. Dans le premier cas de figure, les plantes proposées sont nombreuses et souvent insoupçonnées des phytothérapeutes européens. Ainsi, par exemple, des macérations d'une Astéracée commune dans tout le Sahara *Ifloga spicata* sont utilisées en cataplasmes pour accélérer la maturation des abcès et furoncles. Dans d'autres contrées, ils utilisent pour les mêmes usages des graines de Lin (*Linum usitatissimum* Linaceae). De même, des feuilles de diverses Jusquiames (*Hyoscyamus sp.* Solanaceae), trouvent, là aussi, un emploi étonnant. Toujours en cataplasme, mais aussi introduites dans des onguents des graines de Cresson alénois (*Lepidium sativum* Brassicaceae), ou de Fèves (*Vicia faba* Fabaceae), jouent un rôle bénéfique. La poudre de feuilles de divers Zygophylles (*Zygophyllum sp.* Zygophyllaceae) est proposée pour de nombreux usages dermatologiques comprenant, par exemple, sous forme d'emplâtres, l'effet maturatif recherché (**Chaumont et Millet-Clerc, 2011**).

De plus, l'ethnobotaniste Bellakhdar apporte quelques solutions très spécifiques telles que :

- Les mucilages de Cognassier (*Cydonia oblonga* Rosaceae), qui, appliqués en suspension dans l'eau, fermeraient les gerçures.
- Les cataplasmes de poudres de sucre et de Henné (*Lawsonia inermis* Lythraceae).
- Le Myrte d'eau (*Lythrum junceum* Lythraceae) peut être utilisé à l'état de plante fraîche, là encore, en cataplasme astringents sur les crevasses du pied.
- Les poudres des Benjoints (*Styrax benzoin* et *S. tonkinensis* Styracaceae) sont utilisées pour la cicatrisation des crevasses des seins.
- Les infusions de fleurs de Zygophylles divers (*Zygophyllum sp.* Zygophyllaceae), qui sont réservées aux mêmes usages topiques. (**Chaumont et Millet-Clerc, 2011**).

Matériel et méthodes

Nos essais expérimentaux se sont étalés sur une durée allant du mois d'avril jusqu'au mois de juin 2014. Ils ont été réalisés au niveau des structures suivantes :

- Unités du contrôle microbiologique physico-chimique et toxicologique du complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa,

- Unité des Projets de Fin d'Etudes (PFE) département de Biologie, université de Blida-1.

L'expérimentation portait sur des analyses phytochimiques, pharmacologiques et microbiologiques des feuilles et des fruits du cognassier *Cydonia oblonga* Mill.

II. 1. Matériel :

II.1.1. Matériel biologique :

II.1.1.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué par les feuilles du cognassier *Cydonia oblonga* Mill. récoltés la fin du mois d'Avril 2014 et les fruits (coings) récoltés le mois d'octobre 2013, dans la localité de « Benchikao » wilaya de Médéa à 973 m d'altitude, où nous avons cueillies 1 kg de feuilles de printemps et 2 kg de coing d'automne.

II.1.1.2. Matériel animal :

Les différentes analyses pharmaco-toxicologiques ont été effectuées sur des lapins et des souris Albinos provenant de l'animalerie du complexe Antibiotical de SAIDAL (Médéa).

L'activité anti-inflammatoire et l'activité antispasmodique ont été testées sur 40 souris Albinos (**figure 08**) répartis en 8 lots de 5 souris chacun dans des cages en polypropylène :

- 4 lots pour l'activité anti-inflammatoire
- 4 lots pour l'activité antispasmodique

L'activité cicatrisante a été testée sur 2 lapins Albinos du laboratoire (**figure09**).



Figure 08: Souris Albinos
(Originale, 2014)



Figure 09:Lapin Albinos
(Originale, 2014)

Matériel et méthodes

Les caractéristiques du matériel animal sont illustrées dans le tableau IV :

Tableau IV: les caractéristiques du matériel animal utilisé

Animal	Souris Albinos	Lapins Albinos
Race	Swiss	Californien
Poids	20-24g	2300-2600g
Sexe	Mâles ♂	Mâles ♂ et femelles ♀
Alimentation	Granules «O.N.A.B» (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail)	
Boisson	Eau de ville (eau potable)	
Condition d'hébergement :-Température -Humidité -Eclairage	20-24 °C 50-60 % 10 h	
Elevage	Complexe Antibiotical (SAIDAL-Médéa)	

II.1.1.3. Les microorganismes :

Le tableau V ci-dessous regroupe les microorganismes utilisés pour les besoins de l'étude :

Tableau V : Microorganismes utilisés dans l'activité antimicrobienne

Les souches		Références
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Sarcina lutea</i>	Institut pasteur
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

II.1.2 . Matériel non biologique :

L'ensemble du matériel de laboratoire (verrerie, réactifs, appareillage) utilisé au cours de notre travail expérimental, sont regroupés en **Annexe II**.

II. 2. Méthodes :

II.2.1. Préparation de la poudre végétale :

Les feuilles de *Cydonia oblonga* Mill. (**figure10**) sont séchées à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique de marque Moulinex, en poudre fine de couleur verte (**figure11**), qui est ensuite conservée à l'abri de la lumière dans des sachets en papiers.



Figure 10: Les feuilles de *Cydonia oblonga* Mill. (**Originale, 2014**)



Figure 11: La poudre des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill. (**Originale, 2014**)

II.2.2. Détermination du taux d'humidité :

a) Principe :

La méthode utilisée est la méthode de dessiccation par évaporation, qui est effectuée par séchage à l'étuve à une température de 105°C jusqu'à obtention d'une masse constante (**Simpson, 1999 ; Twidwell et al., 2002**).

b) Mode opératoire :

- Sécher les béchers dans l'étuve et les laisser refroidir puis les peser.
- Peser 5g de poudre végétale dans les béchers, à 0.0001 g près «Pi».
- Placer les béchers dans l'étuve à 105°C et vérifier le poids chaque 30 minutes jusqu'à sa stabilisation.

c) Lecture des résultats :

Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H\% = [(m_1 - m) / m_1] \times 100$$

H : taux d'humidité exprimé en pourcentage

M₁ : masse de l'échantillon avant séchage en étuve (g).

M : masse de l'échantillon après séchage en étuve (g).

Matériel et méthodes

II.2.3. Extraction des métabolites secondaires : Trois procédés ont été utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires de *Cydonia oblonga* Mill., à savoir :

- Infusion
- Compression des fruits
- Extraction par solvant

II.2.3.1. Préparation de l'infusé :

D'après le protocole de **Bruneton (1999)**, nous avons infusé pendant 15min 20g de la poudre sèche des feuilles dans 200 ml d'eau distillée bouillante. L'infusé a été filtré pour produire l'extrait aqueux (**figure12**).



Figure 12: Extrait aqueux des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill. (**Originale, 2014**)

II.2.3.2. Préparation du jus de coing:

Le jus de coing a été préparé à l'aide d'une centrifugeuse de Marque Moulinex (**figure 13, annexe II**). Un volume de 449.36 ml de jus frais a été obtenu à partir d'un broyage de 1 kg de coing (**figure 14**).



Figure 14: Jus du fruits de *Cydonia oblonga* Mill. (**Originale, 2014**)

Matériel et méthodes

II.2.3.3. Préparation de l'extrait méthanolique des feuilles «EMF» :

La préparation de l'extrait méthanolique par décoction a été effectuée selon le protocole décrit par **Chavane et al. (2001)** avec légère modification : 10 g de la poudre des feuilles de cognassier sont ajoutés à 300 ml de solvant d'extraction (éthanol, acétone ou méthanol à 70 % v/v dans l'eau et eau). Le mélange est porté à ébullition dans un bain Marie durant 30 min puis filtré sur un papier Wattman. Le filtrat est ensuite placé dans l'évaporateur rotatif (**figure 15, annexe II**) en raison de l'évaporation des solvants (méthanol et l'eau) à 70°C.

L'extrait organique a été conservé dans un endroit frais et obscur à l'abri de la lumière (**figure 16**).



Figure 16: Extrait méthanolique des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill.(EMF) (**Originale, 2014**)

Le pourcentage en extrait brut méthanolique des feuilles a été calculé par la formule suivante :

$$R\% = M/M0 \times 100$$

R(%) : rendement exprimé en pourcentage.

M : masse en gramme de l'extrait brut résultant.

M0 : masse en gramme de matériel végétal à traiter.

II.2.4. Screening phytochimique préliminaire pour l'infusé et le jus :

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de physico-chimie du Complexe SAIDAL Antibiotical- Médéa.

Nous avons caractérisé les différents groupes chimiques en nous référant aux techniques décrites par **Bruneton (1999)** pour l'infusé des feuilles et le jus de coing.

II. 2.4.1. Les anthocyanes :

5 ml d'extrait aqueux (jus) sont introduit dans un tube à essai auquel quelques gouttes d'ammoniaque ½ sont ajoutés. La réaction donne une coloration bleue en présence des anthocyanes.

Matériel et méthodes

II.2.4.2. Les leucoanthocyanes :

Introduire 2 g de poudre végétale (1,92 ml de jus) et 20 ml d'un mélange de propanol /acide chlorhydrique (1/1), dans un bécher de 20 ml. Puis porter au bain marie bouillant pendant quelques minutes.

Une coloration rouge se développe en présence des leucoanthocyanes.

II.2.4.3. Les tanins :

À 5 ml d'extrait aqueux (jus) rajouter quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 5%.

La réaction donne une coloration bleu-noir en présence des tanins.

➤ Les tanins catéchiques :

Dans un bécher, 15ml d'extrait aqueux (jus) sont additionnés à 7ml de réactif de Stiasny. La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchiques.

➤ Les tanins galliques :

A l'aide d'une pipette graduée 5 ml d'extrait aqueux (jus) sont introduit dans une fiole auxquels 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 sont ajoutés. Après agitation, une coloration bleue foncée apparait en présence des tanins galliques.

II.2.4.4 . Les alcaloïdes :

Faire macérer dans une bouteille en verre(Duran SCHOTT) 5g de poudre (4,8ml de jus) humectés avec de l'ammoniaque $\frac{1}{2}$ pendant 24h dans 50ml d'un mélange éther chloroforme (3/1).Le mélange obtenu est filtré. Ainsi, le filtrat est épuisé par 2ml d'acide chlorhydrique2N.

Après adjonction de quelques gouttes du réactif de DRAGENDORFF, la présence d'alcaloïdes se manifeste par le développement d'un trouble ou d'un précipité dans la bouteille.

II.2.4.5. Les flavonoïdes :

Introduire dans une fiole 5 ml d'extrait aqueux (jus), 5 ml d'HCl, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool isoamylique. L'ensemble est agité pendant quelques minutes.

La réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.

II.2.4.6. Les saponosides :

Dans un tube à essai, on introduit 2 ml d'extrait aqueux (jus) auxquels, on rajoute quelques gouttes d'acétate de plomb.

La formulation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

II.2.4.7. Les quinones :

➤ Les quinones libres :

Dans un bécher, 2g de poudre (1,92 ml de jus) humectés par 2ml d'acide chlorhydrique N sont mis en contact pendant 3heures dans 20 ml de chloroforme. Le mélange est filtré puis agité avec 5 ml d'ammoniaque ½. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des quinones libres.

➤ Les quinones combinées :

A 2g de poudre (1,92 ml de jus) on additionne 5 ml d'acide sulfurique 2N et porter à reflux (**figure 17, annexe II**) pendant 2h.

La solution extractive est filtrée puis épuisé par 20 ml de chloroforme. Cette solution chloroformique est évaporée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (**figure 15, annexe II**) puis épuisée par l'ammoniaque 1/2. Une coloration rouge apparait en présence des quinones combinées.

II.2.4.8. Les coumarines :

La préparation de l'extrait se fait comme suit :

- Faire bouillir à reflux 2g de poudre (1,92 ml de jus) dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min puis filtrer.
- A 5 ml du filtrat, rajouter 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'HCl à 10%.

La formation d'un trouble indique la présence de coumarines.

II.2.4.9. Amidon :

A 2g de poudre végétale (1,92 ml de jus) on rajoute quelques gouttes d'Iode(I₂). Une coloration bleue violette est obtenue en présence d'amidon.

Matériel et méthodes

II.2.4.10. Les glucosides :

A 2 g de poudre végétale (1,92ml de jus) on rajoute 10ml de H_2SO_4 . La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glycosides.

II. 2.5. Dosage des phénols totaux pour les trois extraits étudiés (extrait aqueux, jus et EMF) :

- **Principe :**

Le réactif de Folin-Cioecalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$).

En milieu basique, ce réactif oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques. Les produits de réduction (oxydes métalliques de tungstene W_8O_{23} et de molybdene Mo_8O_{23}) de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**figure 18**).

Ainsi, la quantité de polyphénols pour chaque échantillon est déterminé par la projection de la valeur de la DO à 760 nm sur une courbe étalon d'un polyphénol standard (acide gallique ou catechin) réalisé dans les mêmes conditions (**Singleton et Rossi, 1965**).

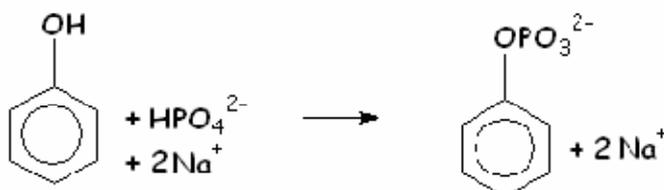


Figure 18 : Principe de la réduction du réactif de Folin Cioecalteu(**Singleton et Rossi, 1965**)

- **Mode opératoire :**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Cioecalteu (FC) (**Boizot et Charpentier, 2006**) : 100 μ l d'extrait sont mélangés avec 500 μ l du réactif FC dilué 10 fois et 400 μ l de Na_2CO_3 à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant dix minutes et l'absorbance est mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV/Vis (PerkinElmer),(**figure 19,annexe II**)

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Matériel et méthodes

II.2.6. Etude des activités biologiques de *Cydonia oblonga* Mill.

II.2.6.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante pour les trois extraits étudiés (EA, jus pure, EMF) :

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par deux méthodes différentes:

- a) Détermination du pouvoir réducteur par la méthode FRAP.
- b) Détermination du pouvoir anti-radicalaire par réduction du radical libre DPPH.

II.2.6.1.a) Détermination du pouvoir réducteur par la méthode FRAP :

Le pouvoir réducteur mesure la capacité d'un antioxydant à donner un électron (**Balasundram et al., 2005**).

La réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) est mesurée par l'intensité de l'absorbance de la solution bleue verte qui en résulte. Cette dernière absorbe à une longueur d'onde de 700 nm. Une augmentation de l'absorbance est l'indice d'un pouvoir réducteur élevé (**Balasundram et al., 2005**).

a) Mode opératoire:

1 ml de différentes concentrations de chaque extrait (0,012 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,15 mg) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%.

Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min, après, 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) sont additionnés. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min.

2,5 ml du volume de chaque concentration sont mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires que les autres échantillons.

b) Expression des résultats :

Pour explorer les résultats obtenus, nous avons tracé les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les trois extraits de plante étudiés. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

Matériel et méthodes

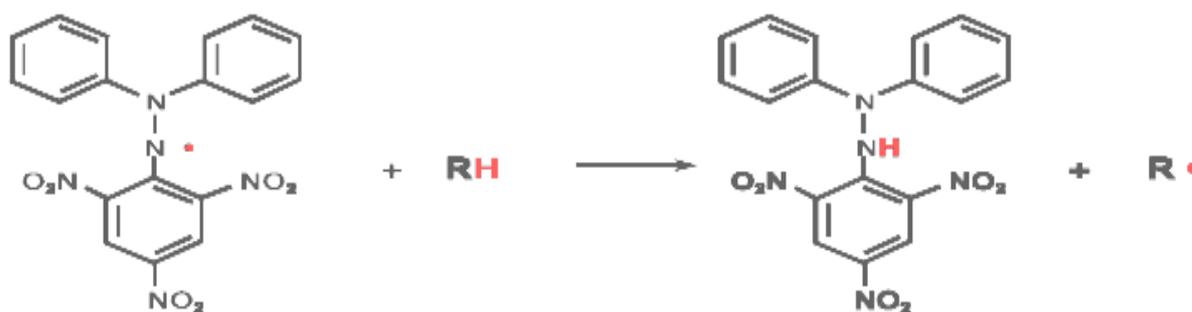
II.6.1.b) Détermination du pouvoir anti-radicalaire par réduction du radical libre DPPH :

Le principe consiste en la réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil par les substances anti radicalaires (**figure 20**).

Le pouvoir antioxydant sera comparé par la suite avec un antioxydant de synthèse l'acide ascorbique (vit C). Tous les tests ont été réalisés avec 3 répétitions pour chaque concentration.

Le DPPH est un radical libre stable qui possède une coloration violette foncée, une fois réduit, il devient jaune pâle. Cette dernière est due aux molécules responsables du pouvoir antioxydant présent dans les extraits étudiés.

Cette capacité de céder les hydrogènes est mise en évidence par une méthode spectrométrique en suivant la disparition de la couleur violette de la solution contenant le DPPH.



Violet

Jaune

Figure 20: Forme libre et réduite du radical DPPH (Molyneux, 2004).

a) Préparation de la solution mère de DPPH :

Le DPPH est solubilisé dans l'éthanol à raison de 4mg / 100ml, sous agitation magnétique pendant une demi heure (**figure 21**).



Figure 21: Solution de DPPH à 0.04 % (Originale, 2014)

b) Préparation de la solution mère et les dilutions de l'extrait aqueux, le jus et l'EMF :

Comme première étape, 1 gramme de poudre sont mixés sous agitation magnétique pendant 25min dans 100 ml d'eau distillée. La solution obtenue est filtrée avec du papier «Wattman»

Pour les deux autres extraits, 1 gramme de jus et d'extrait méthanolique (EMF) ont été mélangés avec 100 ml d'eau distillée respectivement.

Les dilutions de nos extraits ont été préparées en choisissant différentes concentrations (50 ; 100 ; 200 ; 400 ; 600 ; 800 μ l). Où chacune des dilutions est mélangée avec 1ml de la solution éthanolique de DPPH.

Après une période d'incubation de 30min à température du laboratoire et à l'obscurité ainsi qu'à l'abri de l'O₂ atmosphérique.

En parallèle, la solution éthanolique d'antioxydant de synthèse l'acide ascorbique a été préparée.

L'expérimentation a été effectuée en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS à longueur d'onde de 517nm.

c) Calcul :

L'activité antioxydante qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans l'éthanol. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\%DPPH = \frac{Abs T - Abso E}{Abs T} \times 100$$

(Wang et al., 2002)

Où :

% DPPH : Taux du DPPH piégé ou taux d'inhibitions.

Abs T : Absorbance du témoin (solution de DPPH □ blanc) en (nm).

Abs E : Absorbance de l'échantillon.

Le test de DPPH est réalisé suivant la méthode décrite par **Cuendet et al. (1997), Burits et Bucar (2000)**.

II.2.6.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne des trois extraits étudiés de *Cydonia oblonga* Mill.(EA, le jus et l'EMF)

Ces tests ont été effectués au laboratoire de stérilité Complexe SAIDAL-Médéa.

L'objectif de cette étude est de déterminer le taux d'inhibition de la croissance des bactéries et levures soumis aux trois extraits (extrait aqueux à 10%, jus et extrait méthanolique) et ceci par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

a) Principe :

la méthode de diffusion en milieu solide, en utilisant des disques en papier Wattman est décrite par (**Duraffourd et al., 1990 ;Mazari et al., 2010**).

Des disques en papier Wattman pré-imprégnés des différents extraits sont déposés à la surface de la gélose déjàensemencée par une culture bactérienne, l'extrait diffuse à partir du disque en créant une zone d'inhibition qui permet la déduction des caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne.

L'incubation est faite dans une étuve à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48 h pour les levures.

L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre (**figure 22**).

La boîte de contrôle présente un disque non imbibé par l'extrait. Une autre boîte témoin, sans disque, estensemencée dans les conditions de l'expérience. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien.

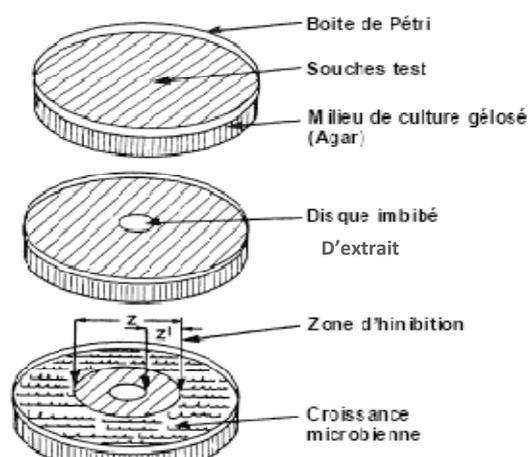


Figure 22 : Illustration de la méthode de diffusion en milieu gélosé sur boîte de Pétri. (De **Billerbeck et al., 2002**)

La méthode utilisée dans cette étude est celle adoptée par le laboratoire de stérilité (SAIDAL).

b) Milieux de culture (AnnexI).

c) Mode opératoire :

- Préparer les milieux de Soja-Agar et Sabouraud ,stériliser les milieux pendant 20min à 120°C.
- Laisser les milieux 5min à la température du laboratoire (25-28°C) avant de les couler dans des boîtes de Pétri sous une hotte à flux laminaire.
- Préparer les extraits testés (l'extrait aqueux , jus et EMF) :
 - Extrait aqueux à 10%.
 - Le jus pure .
 - 30 mg d'extrait méthanolique des feuilles ont été dissous dans 10 ml d'eau physiologique (3 mg/ ml).
- Devant un bec-benzène, ensemercer les souches bactériennes à l'aide des écouvillons, en suspension dans de l'eau physiologique, dans les boîtes de Pétri contenant le milieu préparé de Soja-Agar.
- Imbiber les disques (de papier filtre de 9 mm de diamètre) par les solutions à tester, puis déposer les boîtes de Pétri dans une étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures.

Matériel et méthodes

• L'absence de toute croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre.

Remarque :

Des disques imprégnés de méthanol sont également utilisés comme témoin négatif.

c) Lecture du résultat :

La mesure du diamètre des halos d'inhibition est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (Lis-Balchin et al., 1998), (Tableau VI).

Tableau VI : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés d'extrait étudié.

Diamètres de la zone d'inhibition	Transcription	Sensibilité du germe
0	0	Résistant
0.5 cm	±	Peu sensible
1 cm	+	Sensible
2 à 3 cm	++	Assez sensible
> 3 cm	+++	Très sensible

(Lis-Balchin et al., 1998)

II.2.7. Etude des activités pharmacologiques de *Cydonia oblonga* Mill.

II.2.7.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'EA des feuilles et le jus du fruit de *Cydonia oblonga* Mill. :

1. Principe :

Selon la méthode de Levy (1969), l'injection de la carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire.

Matériel et méthodes

2. Mode opératoire :

Afin de mettre en évidence de façon indubitable l'effet anti-inflammatoire, les souris sont réparties en 4 lots de 5 souris chacun, à savoir trois lots traités et un lot témoin, les souris mâles des 4 lots ont été mis à jeûn pendant 18 heures avant l'expérimentation.

Le gavage (au temps t_0) a été réalisé à l'aide d'une sonde gastrique (**figure 23**).



Figure 23 : Gavage des souris avec les extraits étudiés (**Originale, 2014**).

☞ Lots traités :

- Lot E_1 : les souris sont gavées avec 0.5 ml d'un produit anti-inflammatoire (Diclofenac[®]) ; 1 comprimé de 75mg dans 750 ml d'eau physiologique.
- Lot E_2 : Souris gavées avec 0.5 ml d'infusé à 10%(une dose de 2000mg/kg).
- Lot E_3 : Souris gavés avec 0.5 ml de jus frais de coing .

☞ Lot témoin :

- Le témoin reçoit par gavage de l'eau physiologique 0.9% sous un volume de 0.5ml.

L'inflammation est provoquée par l'injection de 0.025 ml d'une solution de carraghénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de chaque souris 30 min après l'administration du traitement (**figure 24**).

Matériel et méthodes



Figure 24 : Injection de la solution carraghénine (Originale, 2014).

Au temps t4, l'activité anti-inflammatoire des extraits a été évaluée en sacrifiant les souris par rupture de la nuque puis en coupant les pattes postérieures au niveau de l'articulation tarso-métatarsienne (figure 25).



Figure 25: Coupure des pattes postérieures au niveau de l'articulation tarso-métatarsienne (Originale, 2014)

Les pesées sont faites à l'aide d'une balance analytique (figure 26, annexeII).

Le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (%d'œdème) est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids de la patte gauche} - \text{Moyenne de la patte droite}}{\text{Moyenne des poids de la patte droite}} \times 100$$

Le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins est calculé comme suit :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ d'œdème témoin}} \times 100$$

Matériel et méthodes

Les résultats sont exprimés en moyenne du nombre de contractions abdominales \pm écart-type, la signification statistique est déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie par Test de comparaison par paire de Fisher au risque de 5%. $P < 0.05$ est considérée comme différence significative, l'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel Statistica 10.

II. 2.7.2. Evaluation de l'activité antispasmodique :

La mise en évidence de l'effet antispasmodique est réalisée par le test de torsion selon la méthode **Vogel (2002)**.

a) Principe :

Ce test consiste à réduire par un produit antispasmodique (extrait aqueux et le jus), la douleur provoquée chez les souris par injection intrapéritoniale d'une substance irritante (acide acétique) capable d'entraîner des mouvements de torsion de l'abdomen avec étirement des pattes postérieures (spasmes).

b) Mode opératoire :

L'extrait aqueux et le jus sont administrés aux souris qui sont réparties en 4 lots de 5 souris chacun, la répartition de ces derniers est représentée dans le tableau suivant :

Tableau VII : Répartition des lots pour le test de l'effet antispasmodique.

Désignation des lots	1	2	3	4
Nature du produit	Extrait aqueux	jus	Eau physiologique	Spasfon
Dose	0.1 g/ml (2000mg/kg)	-	-	0.025mg/ml
Voie d'administration des produits	Voie orale (gavage)			

- A T0 : administration par gavage de 0,5ml de la dose des produits (Extraits aqueux, jus ,eau physiologique et solution de spasfon) équivalente pour chaque lot.
- Après 30 min : toutes les souris reçoivent 0,2 ml de la solution d'acide acétique à 1% par voie intra-péritonéale (**figure 27**).



Figure 27 : Injection de la solution d'acide acétique à 1% par voie intra-péritonéale (**Originale, 2014**)

- Après 5min : le comptage du nombre de spasmes est réalisé par l'observation directe des souris pendant les 20 min qui suivent.

c) Lecture des résultats

L'activité antispasmodique est exprimée par le pourcentage de réduction du nombre de spasmes chez les souris traitées par rapport aux témoins selon la formule de **Vogel (2002)**.

$$\% \text{ RED} = \frac{\text{MST} - \text{MSE}}{\text{MST}}$$

%RED : % réduction de la douleur.

MST : moyenne des spasmes du lot témoin.

MSE : moyenne des spasmes du lot essai.

Les résultats sont exprimés en moyenne du nombre de contractions abdominales \pm écart-type, la signification statistique est déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie par Test de comparaison par paire de Fisher au risque de 5%. $P < 0.05$ est considérée comme différence significative, l'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel Statistica 10.

II. 2.7.3. Evaluation de l'activité cicatrisante des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill. :

La recherche de la propriété cicatrisante des feuilles de *Cydonia oblonga* est réalisée selon le protocole suivi de **Pourrat (1993)**.

- **Principe :**

Ce test consiste à évaluer l'activité cicatrisante d'une pommade formulée à base de poudre de feuilles de *Cydonia oblonga* sur des scarifications cutanées profondes à la limite de

Matériel et méthodes

saignement chez les lapins et comparer son activité par rapport à une autre pommade de référence.

- **Mode opératoire :**

- a) **Formulation de la pommade :**

Pour avoir une pommade à base de feuilles de *Cydonia obonga* d'une concentration de 40% et de 100g de poids, les constituants suivants sont pesés à l'aide d'une balance analytique de précision :

- 40g de poudre de feuilles sèches, fines et stériles (stérilisée suite à une exposition à l'UV sous une hotte à flux laminaire pendant 20 min)
- 20g de l'huile de vaseline
- 40g de vaseline

La pommade est préparée dans un mortier en porcelaine à la température ambiante du laboratoire, dans des conditions d'asepsie rigoureuses (sous hotte à flux laminaire).

La vaseline est portée au bain marie à 36°C pour faciliter le malaxage et pour y pouvoir dissoudre plus facilement la poudre (**Le Hir, 2001**).

Le malaxage du mélange doit être effectué jusqu'au complet refroidissement afin d'éviter la séparation des constituants (**Fonteneau et al., 1999**).

La pommade est conditionnée dans des boîtes de Pétri stériles, le remplissage est réalisé à l'aide d'une spatule stérile, les boîtes sont ensuite fermées afin d'éviter toute contamination extérieure.

- b) **Contrôle physicochimique et microbiologique de la pommade**

- **Mesure du pH**

Pour connaître le pH de la pommade, 10g de cette dernière sont triturés avec de l'eau distillée dont le pH est ensuite mesuré par un pH mètre (**Seiller et Martini, 1996**).

- **Homogénéité de la pommade**

Elle est vérifiée macroscopiquement par étalement de la pommade en couche mince sur une surface plane (paillasse du laboratoire) à l'aide d'une spatule (**Le Hir, 2001**).

Matériel et méthodes

c) Contrôle microbiologique de la pommade

Les analyses microbiologiques ont pour but de rechercher les germes responsables de toute contamination du produit fini (pommade), le protocole suivi est celui préconisé par la pharmacopée européenne en 1997.

- ❖ Préparation de l'échantillon : 10g de pommade sont pesés et introduits dans un flacon de 100ml de solution tampon pH 7, puis chauffés au bain marie à 45°C jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- ❖ Dénombrement des germes aérobies viables totaux : à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de l'émulsion préparée et 20 ml de milieu gélosé au peptones de caséine et de soja (Soja agar) liquéfié dont la température n'est pas supérieure à 45°C sont introduits dans une boîte de Pétri, qui est ensuite remuée dans le sens circulaire et laissée reposée jusqu'à solidification puis incubée à 35°C pendant 5 jours pour faire le dénombrement.
- ❖ Dénombrements des moisissures et levures : la même procédure citée précédemment est suivie en utilisant cette fois le milieu gélosé Sabouraud liquéfié qui est incubé à 25°C pendant 5 jours pour le dénombrement.

Remarque :

Le nombre de germes aérobies viables totaux est la somme du nombre de bactéries et du nombre de moisissures et levures trouvées dans les deux boîtes des milieux Soja agar et Sabouraud.

- ❖ **Recherche des entérobactéries et autres grams négatifs :** 10ml de l'émulsion sont introduits dans 90ml du milieu liquide lactosé (BL) à l'aide d'une pipette stérile et incubés à 35°C pendant 2h, après incubation le flacon est bien agité d'où 1ml de la solution est prélevé dans un tube contenant 9ml du milieu d'enrichissement Mossel stérile, ce dernier est incubé à 35°C pendant 24h. une subculture est effectuée sur le milieu gélosé d'isolement XLD (Xylose-Lysine-Désoxycholate) et incubé à 35°C pendant 24h.

Une croissance de colonies bien développées de bactéries à Gram négatif, généralement rougeâtre révèle une contamination.

- ❖ **Recherche de *Staphylococcus aureus* :** à l'aide d'une pipette stérile, 10ml de l'émulsion sont introduits dans 90ml du milieu liquide aux peptones de caséine et de

Matériel et méthodes

Soja (BS), et incubé à 35°C pendant 24h, une subculture est ensuite réalisée sur milieu gélosé Chapman et incubée à 35°C pendant 24h.

L'apparition des colonies dorées et la dégradation de la couleur du milieu confirme la présence de *Staphylococcus aureus*.

- ❖ **Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*** : à partir du milieu liquide aux peptones de caséine et de Soja (BS) précédemment ensemencé, une culture sur milieu gélosé cétrimide (CAB) est réalisée puis incubée à 35°C pendant 24h.

L'apparition des colonies verdâtre et le virement de couleur du milieu de culture confirme la présence de *Pseudomonas aeruginosa*

- ❖ **Recherche d'*Escherichia coli*** : le milieu liquide aux peptones de caséine et de Soja (BS) est réincubé à 43°C pendant 24h, dépassé le délai ,des subcultures sont faites sur milieu gélosé éosine bleu de éthylène (EMB) et incubés à 35°C pendant 24h. La présence de colonies rouges indique une présomption d'*Escherichia coli*.

- ❖ **Lecture des résultats :**

Les résultats sont exprimés en Colonie Formant Unité (CFU), le produit est déclaré conforme selon les normes spécifiées par les monographies de la pharmacopée européenne (Anonyme, 2002) si les résultats sont inférieurs aux limites sous citées :

- * Germes aérobies viables totaux : $\leq 5.10^2$ UFC / ml
- * Levures et moisissures : $\leq 5.10^2$ UFC / ml
- * Entérobactéries et Gram(-) : ≤ 10 UFC / ml
- * *Staphylococcus aureus* : absence
- * *Pseudomonas aeruginosa* : absence
- * *Escherichia coli* : absence

d) Essai pharmacologique de la pommade :

- Mode opératoire

L'essai s'effectue sur deux lapins albinos de race californienne, ces derniers ont subi une épilation réalisée à l'aide d'une paire de ciseaux et par un rasoir ; après épilation et désinfection de la peau par un coton imbibé d'alcool, trois scarifications parallèles profondes à la limite de saignement sont effectuées à l'aide d'un bistouri, l'application de la pommade de feuilles et de la pommade de référence (Madécassol) s'effectue quotidiennement pendant 14 jours sur les plaies provoquées du côté droit après délimitation des zones, tandis que les plaies du côté gauche ne reçoivent aucun traitement (cicatrisation naturelle) et serviront de témoin(**figure 28**).

Matériel et méthodes



Figure28: Application de la pommade sur la plaie (**Originale, 2014**)

Afin de suivre l'évolution de processus de la cicatrisation, un examen macroscopique est réalisé, une échelle de cotation a été fixée en tenant compte de quatre paramètres :

- La profondeur de la plaie
- L'apparition ou non d'œdème
- La présence ou non d'un bourgeon
- L'épaisseur de la croûte

Chacun de ces quatre paramètres est qualifié par une valeur numérique de 0 à 4 définie dans le tableau suivant :

TableauVIII : Echelle de cotation de l'effet cicatrisant .

	Profondeur	Bourgeon	Œdème	Epaisseur de la croûte
0	Profondeur nulle	Absence de bourgeon	Pas d'œdème	Pas de croûte
1	Légèrement creusée	Petit bourgeon	Très léger œdème	Début de croûte
2	Peu profonde	Gros bourgeon	Œdème visible	Croûte en voie d'épaississement
3	Assez profonde	Bourgeoisement massif	Œdème moyen	Croûte épaisse
4	Très profonde	Excès de bourgeoisement	Œdème grave	Croûte très épaisse

III. Résultats et discussion

III.1. Détermination de la teneur en eau dans les feuilles de *Cydonia oblonga* Mill.

Les résultats de la teneur en humidité des feuilles fraîches du cognassier sont rapportés dans le tableau IX (**annexe III**), et illustrés par la figure 29.

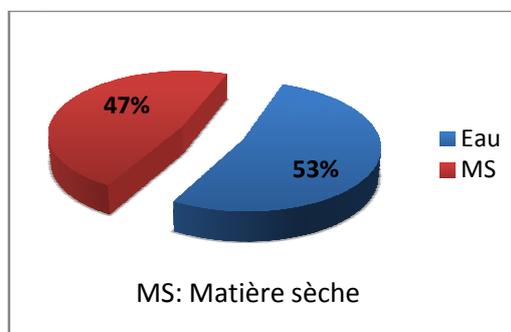


Figure 29: Teneur en eau des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill.

Les végétaux sont riches en eau, les analyses de nos échantillons ont révélé un taux d'humidité moyen de 53% des feuilles fraîches de la plante. Cela signifie que la moitié du poids des feuilles fraîches de la plante est constituée par l'eau. Nous constatons que le cognassier est moyennement riche en eau avec un taux environ 53% de la matière fraîche.

III. 2. Rendement en EMF

L'extrait méthanolique des feuilles possèdent un rendement peu important avec un pourcentage de 26,32 %.

III.3. Résultats du Screening phytochimique

Ces tests ont été effectués pour mettre en évidence la présence de certains groupements chimiques qui peuvent être responsables à des activités biologiques étudiées. Les résultats sont indiqués dans le tableau X :

Résultats et discussion

Tableau X : Résultat du screening phytochimiques.

Composés	Réaction	
	Extrait aqueux	Jus
Anthocyanes	+	+
Leucoanthocyanes	+	+
Tanins	+	+
Tanins catéchiques	-	-
Tanins galliques	+	+
Alcaloïdes	+	-
Quinones libres	-	-
Quinones combinés	+	+
Saponosides	+	+
Coumarines	+	+
Amidon	-	-
Flavonoïdes	+	+
Glycosides	+	+

(+) : Réaction positive / (-) : Réaction négative.

Le test phytochimique réalisé sur la poudre, l'infusé et le jus de *Cydonia oblonga* Mill. révèle la présence de plusieurs familles de composés chimiques (**figure 30, annexe III**).

Ces résultats montrent que la plante est riche en tanins ; seule la classe des tanins galliques est présente (réaction positive) tandis que la classe des tanins catéchiques est absente (réaction négative).

On note aussi la présence des leucoanthocyanes, tanins, saponosides, glycosides, flavonoïdes et les composés réducteurs (coumarines) et des traces des alcaloïdes seulement pour l'extrait aqueux des feuilles.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Evans (2006)**, **Aslan et ses collaborateurs (2010)** qui ont révélé la présence d'alcaloïdes à l'état de trace, d'une grande quantité de flavonoïdes, de tanins et de petite quantité de saponosides avec absence des glycosides.

Kurban(2004) rapporte que le fruit de l'espèce *Cydonia oblonga* Mill. contient le fructose, les tannins, protopectine, des acides organiques, des acides aminés, l'acide tétradecylique,

Résultats et discussion

l'acide vaccénique , glycedride, huile volatile et les flavonoïdes , ainsi que les feuilles contiennent les alcaloïdes , les tannins , les glycosides, le mucilage, aldose, lipides, vitamine C, glycosides cyanogenetiques ,etc.

Ces résultats nous donnent une bonne prévision concernant les activités biologiques de la plante, malgré son imprécision, elle reste encourageante surtout que ces composés phytochimiques, dont on a révélé la présence, sont connus par leurs effets pharmacologiques et d'être impliqués dans de nombreuses activités biologiques.

III.4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique préconisée par **Boizot et Charpentier (2006)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg éqAG/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Figure 31**).

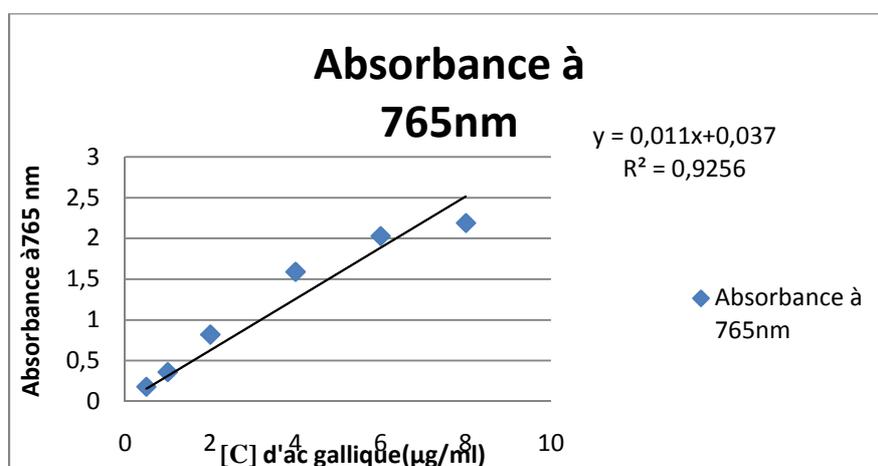


Figure 31 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

Pour les trois extraits de la plante étudiée *Cydonia oblonga* Mill. nous avons remarqué une variabilité des teneurs en phénols totaux (**figure 32**). La teneur la plus élevée est constatée dans l'EMF, elle est de l'ordre de 14.39 mg éqAG/g de la matière sèche suivi par l'EA avec une teneur de 3,81mg éqAG/g MS, puis le jus de coing avec une teneur de 0.6 mg éqAG/g de matière sèche.

Résultats et discussion

Ces résultats importants reflètent les données trouvées dans la figure 32 où nous avons enregistré des rendements moyennement élevés des deux extraits aqueux et méthanolique ce qui prouve la richesse de chaque extrait de la plante en polyphénols à savoir les flavonoïdes, les tanins et les anthocyanes.

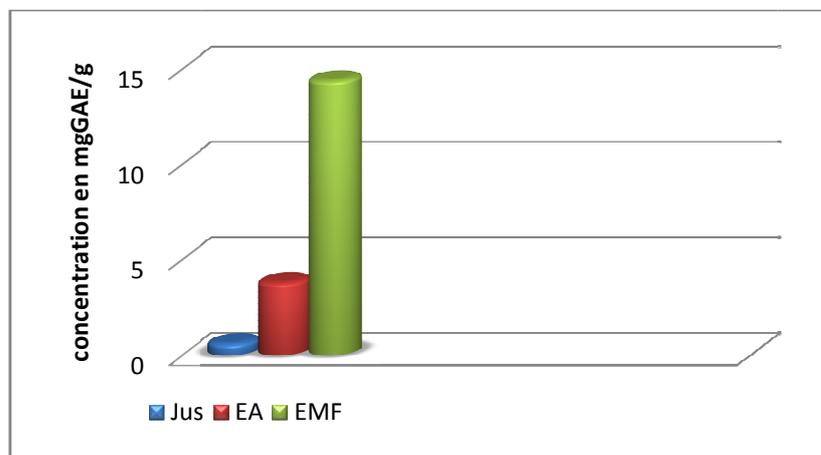


Figure 32: Teneurs en phénols totaux pour les trois extraits de la plante étudiée

Legua et al. (2013) ont montré que la teneur phénolique des extraits de coing varie entre 0.4mg/g jusqu'à 1.12 mg/g de matière sèche exprimée en équivalent d'acide gallique.

D'autre part, Costa (2009) et ses collaborateurs ont révélés une teneur phénolique de 34,9 mg éqAG/g de la matière sèche de l'extrait méthanolique des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill.

III.5. Résultats des activités biologiques

III.5.1. Résultat de l'activité anti-oxydante pour les trois extraits étudiés (EA, jus pure, EMF) :

III.5.1.1. Détermination du pouvoir réducteur par la méthode FRAP :

Le tableau XI (Annexe III) et les figures 33 et 34 ci-dessous regroupent les résultats de l'activité antioxydante des trois extraits étudiés (EA, jus et EMF) et de l'acide ascorbique à différentes concentrations.



Figure 33 : Résultat du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP (Originale, 2014).

Résultats et discussion

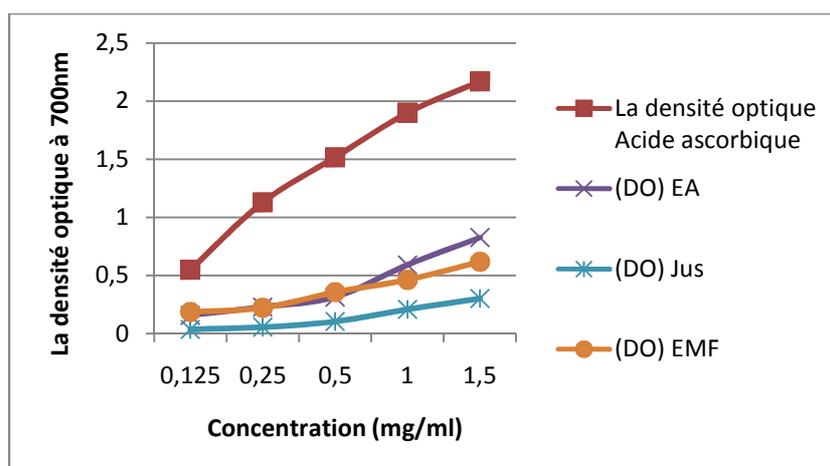


Figure34 : Pouvoir réducteur des extraits et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP.

Nous remarquons qu'à la concentration de 0.125 mg/ml, le pouvoir réducteur de l'EMF présente une densité optique (DO=0.189) supérieure à celle de l'EA (0.159) et de jus(0.036) mais nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique (DO=0.55). D'après la figure 34, on constate que les trois extraits ont une bonne action vis-à-vis de Fe³⁺.

A la concentration de 1.5 mg/ml l'EA est le meilleur vis-à-vis de réduction de fer, et leur DO est de 0.827 (**Tableau XI, annexe III**) mais elle reste toujours inférieure à celle de l'acide ascorbique.

L'augmentation simultanée du pouvoir réducteur des trois extraits de *Cydonia oblonga* Mill. met en évidence la présence de l'activité antioxydante.

Les résultats de l'activité antioxydante corroborent avec ceux de **Allane et Benamara (2010)** qui rapportent l'existence d'une grande activité antioxydante d'extrait aqueux du fruit (796 mg de la vitamine C/100g de la matière fraîche) ce qui confirme la présence du pouvoir réducteur de l'espèce *Cydonia oblonga* Mill.

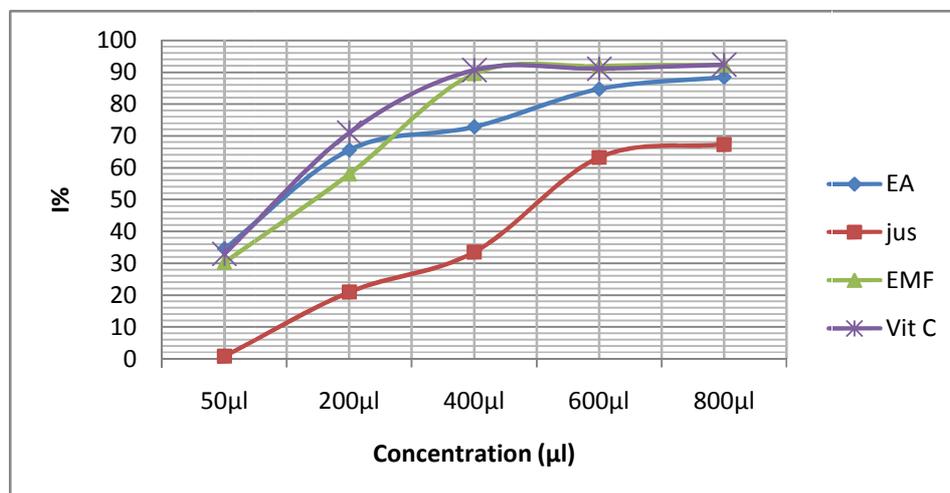
III.5.1.2. Détermination du pouvoir anti-radicalaire par réduction du radical libre

DPPH

Le radical libre DPPH permet l'estimation du pouvoir antioxydant des extraits de la plante *Cydonia oblonga* Mill. C'est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité anti-radicalaire de cet extrait.

Résultats et discussion

Les résultats peuvent être exprimés en tant que : pourcentage de l'activité anti-radicalaire ou en pourcentage de DPPH restant ou peuvent également être exprimés en utilisant le paramètre IC50 qui est défini comme la concentration du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH (Markowiez Bastos *et al.*, 2007).



(I%) : Pourcentage d'inhibition

Figure 35: Activité anti-radicalaire des trois extraits EA, jus, EMF et VitC (chaque valeur représente la moyenne de trois essais)

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (**tableau XII,annexe III**) révèlent que les extraits testés ainsi que la vitamine C pris comme référence, sont des anti-radicalaires (**figure 35**).

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration des dilutions soit pour le standard ou pour les trois extraits de *Cydonia oblonga* Mill. (**figure35 et 36**).

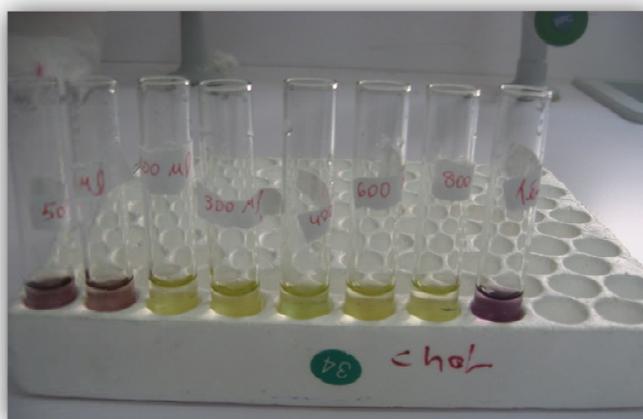


Figure 36: Capacité anti-radicalaire de l'EMF en fonction de la concentration (Originale, 2014).

Résultats et discussion

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'extrait méthanolique des feuilles est proche à celui de la Vit C pour les concentrations 50µl, 400 µl et 800 µl (**Tableau XII, annexe III**).

Pour une concentration de 800µl, l'EMF a révélé un pourcentage d'inhibition important de 92.23% proche de celui de la vitamine C qui est de 92.38 % tandis que celui du l'EA et le jus est respectivement de 88.47% et 67.3% (**figure 35**).

L'activité anti-radicalaire de l'EMF de *Cydonia oblonga* reste supérieur significativement ($P < 0.001$), par rapport à la vitamine C.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire sont en accord avec ceux de **Fkih (2007)** et **Costa (2009)** et **ses collaborateurs**. Ces derniers ont constaté que l'extrait méthanolique des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill. de Portugal possède un fort potentiel antioxydant mais inférieur à celui de thé vert. Cette activité pourrait être liée, en partie, à leur richesse en composés phénoliques qui se produisent dans les feuilles.

Comme proposé par **Silva et ses collaborateurs (2004, 2008)**, les dérivés acides hydroxycinnamiques semblent être la force responsable de cette activité. L'effet antioxydant des acides caféoylquiniques peut être expliqué par la présence d'un groupe de catéchol, qui confère une grande stabilité aux radicaux de phenoxy en participant à la délocalisation d'électron. En plus, le lien double conjugué dans la chaîne latérale d'un groupe de catéchol est probable pour avoir le grand effet en stabilisant le phenoxy putatif radical et, en conséquence, en augmentant l'activité antiradicalaire (**Laranjinha et al., 1994 ; Silva et al., 2004, 2008**).

III.5.2. Résultats de l'activité antimicrobienne des trois extrais étudiés de *Cydonia oblonga* Mill. (EA, le jus et l'EMF)

Après 24 heures d'incubation pour les bactéries à 35°C et 48h pour les levures dans une étuve portée à 25°C, nous avons retiré les boîtes de Pétri pour la lecture et l'interprétation des résultats.

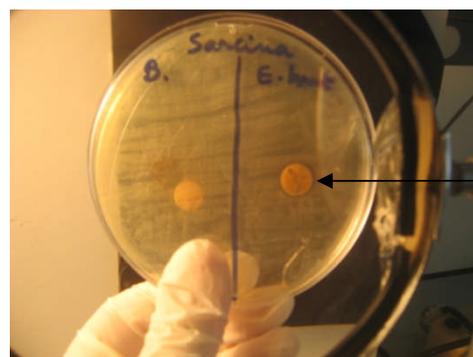
Les figures si dessus (37,38) montrent les résultats obtenus par la technique de diffusion sur milieu gélosé :

Résultats et discussion



Absence de la zone d'inhibition

Figure 37: Absence de l'effet inhibiteur de l'EA et le jus sur *Staphylococcus aureus* (Originale, 2014).



Zone d'inhibition

Figure 38: Présence de l'effet inhibiteur de l'EA sur *Sarcina lutea* (Originale, 2014).

Nous remarquons que les deux extraits n'ont présenté aucun effet inhibiteur sur la croissance microbienne d'où l'absence des zones d'inhibition, sauf pour l'extrait aqueux qui a présenté un faible effet inhibiteur de 11 mm contre une seule souche bactérienne *Sarcina lutea* (Figure 37,38).

Le tableau XIII extrapole les résultats obtenus pour l'extrait aqueux et le jus

Tableau XIII: Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et le jus

Les souches		Diamètre des zones d'inhibition (mm)*		Sensibilité du germe
		EA	Jus	
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	0	0	Résistant
Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	Résistant
	<i>Sarcina lutea</i>	11	0	Peu sensible
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	Résistant
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	Résistant
Levures	<i>Candida albicans</i>	0	0	Résistant

* :Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus).

Les valeurs sont la moyenne de deux répétitions

(0) : pas d'inhibition

Résultats et discussion

Nous constatons d'après ce tableau que *Sarcina lutea* est sensible à l'EA des feuilles, tandis que les autres souches testés sont résistants. Le jus de coing n'a eu aucun effet sur les microorganismes testés. Ceci serait en rapport, soit avec la concentration de l'extrait aqueux, soit avec la multirésistance des souches.

Les figures (39,40) ci dessous présentes les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique des feuilles «EMF»

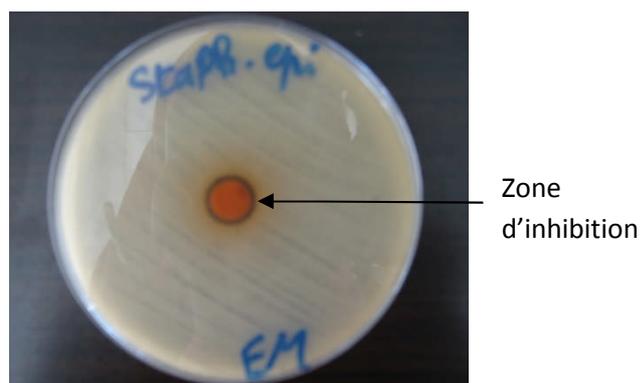


Figure 39: Présence de l'effet inhibiteur de l'EMF sur *Staphylococcus epidermidis* (Originale, 2014)

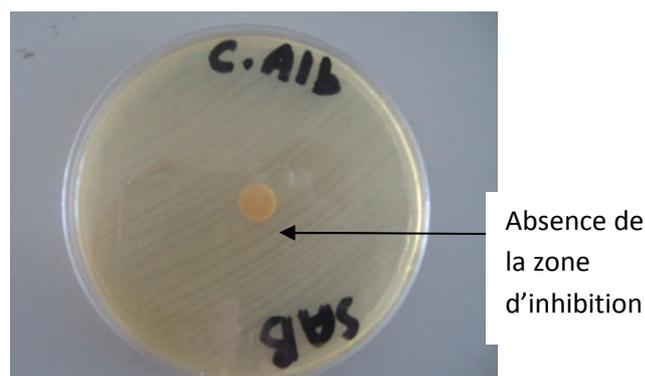


Figure 40: Absence de l'effet inhibiteur de l'EMF sur *Candida albicans* (Originale, 2014)

Le tableau XIV extrapole les résultats obtenus pour l'extrait méthanolique des feuilles «EMF»

Tableau XIV : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles «EMF»

Les souches		Diamètre des zones d'inhibition	Sensibilité du germe
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	0	Résistant
Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	0	Résistant
	<i>Sarcina lutea</i>	0	Résistant
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12mm	sensible
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13mm	sensible
Levures	<i>Candida albicans</i>	0	Résistant

Nous constatons, que les souches utilisées *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, présentent une sensibilité à l'extrait méthanolique EMF avec des diamètres de zones d'inhibition de 13 mm et 12mm respectivement (**Figure 39**), par contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Sarcinas lutea* et *Candida albicans* (**Figure 40**), ne présentent aucune

Résultats et discussion

sensibilité par rapport à l'extrait méthanolique. Ceci serait en rapport, soit avec la concentration de l'extrait méthanolique, soit avec la multirésistance des souches.

Globalement, nous n'avons constatés aucun effet antimicrobien sur l'extrait aqueux et le jus (EA, jus). En revanche, les trois extraits n'ont exercé aucune activité antifongique sur la souche *Candida albicans*.

Les résultats de l'activité antimicrobienne concernant l'extrait méthanolique sont en grande partie en rapport avec sa composition chimique riche en tannis, flavonoïdes révélés par screening phytochimique.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Poyrazoglu Çoban et Biyik (2010)** qui n'ont révélé aucune activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de *Cydonia oblonga* Mill. de Turquie et ceux de **Fkih (2007)** qui ont donné le même résultat avec l'extrait des feuilles en solution et lyophilisé.

Cependant, **Fattouch (2006)** et ses collaborateurs ont montré que le coing possède une activité antimicrobienne envers *Staphylococcus aureus* avec l'extrait acétonique aqueux de la pulpe et de la peau de fruit de coing (*Cydonia oblonga* Mill.) qui a montré un effet antimicrobien plus élevé contre la croissance de bactéries comparée à la pulpe de coing due à la concentration élevée du contenu phénolique, principalement acide chlorogénique.

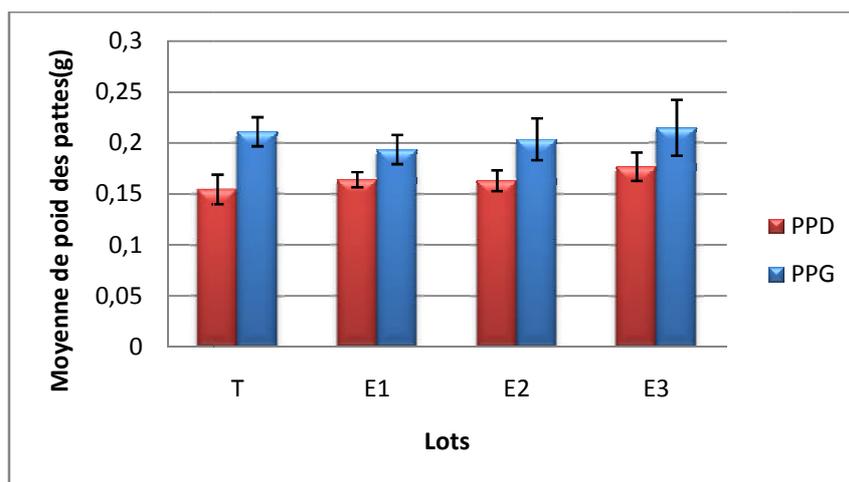
Tandis que **Karar et ses collaborateurs (2013)** ont évalués un effet inhibiteur important (20 mm) contre *Escherichia coli* avec l'extrait brut de coing d'Allemagne.

III.6. Résultats des activités pharmacologiques

III.6.1. Résultat de l'activité anti-inflammatoire de l'EA, jus de *Cydonia oblonga* Mill.

Nous avons calculé pour chaque lot, le pourcentage d'augmentation de l'œdème de la patte enflammée par rapport au poids de la patte saine selon la formule de **Levy (1969)**. Les résultats des moyennes et de la réduction de l'inflammation obtenus sont compilés dans les tableaux (XV, XVI, XVII et XVIII) en Annexe III.

Résultats et discussion



PPD : Patte postérieure droite

PPG : Patte postérieure gauche.

Figure41 : Variation du poids des pattes droites et gauches pour chaque lot.

D'après la **figure 41** et les tableaux (**XV, XVI, XVII et XVIII ; annexe III**), nous constatons qu'il n'y a aucune différence significative ($p > 0.05$) entre les pattes enflammées (patte postérieure gauche : PPG), qui ont reçu la carraghénine (**T : 0.211 ± 0.01 g ; E1 : 0.19 ± 0.01 ; E2 : 0.20 ± 0.02 ; E3 : 0.21 ± 0.02)** et les pattes saines (patte postérieure droite : PPD) dont le poids moyen dans les trois lots est respectivement de (**T**) **0.154 ± 0.01 ; (E1) 0.164 ± 0.007 ; (E2) 0.163 ± 0.01 ; (E3) 0.176 ± 0.01** . Ainsi, aucune différence significative ($p > 0.05$) entre les différents traitements utilisés n'est observée (**Tableau XIX, annexe III**).

Cela est peut être dû soit à la dose utilisée ou bien à l'anatomie de l'animal de l'expérimentation.

Plusieurs recherches ont révélés l'activité antiallergique de l'espèce *Cydonia oblonga* Mill. tel que dans une expérimentation *in vitro*, les auteurs ont soumis des mastocytes traités par un extrait à l'eau chaude de coing (*Cydonia oblonga* Mill.) à une stimulation par IgE et antigène. L'extrait aqueux du fruit du cognassier a un effet de réduction de l'expression de la cyclo-oxygénase COX-2 intracellulaire, et qu'il a un effet large sur la phase tardive des réactions immunitaires des mastocytes. Le leucotriène C4 et la prostaglandine D2 sont aussi réduits. Cela explique l'effet *in vivo* chez l'animal de l'extrait de coing sur les lésions ressemblant à la dermatite atopique (**Goetz ,2011**).

Essafi-Benkhadir et al.(2012) ont montré que l'extrait polyphénolique de coing tunisien présente un effet anti-inflammatoire par le traitement de Lipopolysaccharide(LPS) des

Résultats et discussion

macrophages humains de THP-1-dérivé a induit la sécrétion des niveaux élevés du cytokine pro-inflammatoire TNF- α et du chemokine IL-8, qui a été empêché par l'extrait polyphénolique de peau de coing d'une façon dépendante de la dose.

Selon Goetz (2011) et Gründemann et al. (2011), le coing a différentes propriétés : ses fibres, pectines et tanins agissent au niveau de l'intestin. Le jus de coing est utilisé contre la rhinite allergique dans un produit comme le Gencydo®. Ici, même s'il s'agit d'une expérience *in vitro* et *in vivo*, le coing agirait sur l'allergie retardée, et cela serait une indication pour l'eczéma atopique. Si le produit, théoriquement atoxique, se révèle efficace, on se trouverait vraiment devant un complément alimentaire « efficace ».

Suite à l'administration de l'extrait aqueux des feuilles et le jus de fruit de cognassier aux souris, nous avons constatés un effet sédatif remarquable.

III.6.2. Résultat de l'activité antispasmodique

Les résultats de l'activité antispasmodique obtenus sont compilés dans les tableaux XX (annexe III) et XXI :

Tableau XXI : Pourcentage de protection de l'activité antispasmodique

Lot	Nombre des spasmes moyen	Pourcentage de protection
Témoin	24.2 \pm 6.97	0%
Solution de référence	4 \pm 1.58	83.47%
Lot EA	16 \pm 2.64	33.88%
Lot Jus	10.8 \pm 1.64	55.37%

Après 10 min de l'injection de l'acide acétique au lot témoin de souris, une moyenne de 24.2 crampes abdominales a été enregistrée, l'administration de l'extrait aqueux des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill. à 10% réduit la moyenne des crampes abdominales jusqu'à 16 avec un pourcentage de protection de 33.88 % , ce pourcentage est inférieur par rapport à la solution de référence Spasfon qui exerce un taux de protection de 83.47% avec une moyenne de contraction de 4. De même, l'administration de jus de coing réduit la moyenne des crampes abdominales jusqu'à 10.8 avec un pourcentage de protection de 55.37% qui est moyennement inférieur par rapport à la solution de référence.

Résultats et discussion

Nous avons comparé par ANOVA suivi du test de Fisher les nombres moyen de spasmes de ces 4 lots et trouvé une différence très significative, ce qui indique que l'extrait aqueux et le jus possèdent vraiment une activité antispasmodique (**Tableau XXII,annexeIII**).

Une étude ethnobotanique de **Tuzlaci (2010)** et ses collaborateurs dit que *Cydonia oblonga* Mill. présente un effet antispasmodique.

Ainsi, une autre enquête ethnobotanique sur l'utilisation des plantes médicinales au Québec à montré que la population interrogée utilise le genre *Crataegus sp.* de la famille des rosacées comme antispasmodique.

Les résultats des analyses préliminaires pour l'occurrence des constituants phytochimiques ont montré l'existence de tanins, qui sont connus par leurs activité spasmodolytique (**Budriesi et al., 2010 ; Kirimer et al., 1997 ; Ammar et al., 2009**).

III.6.3. Résultats de l'activité cicatrisante

III.6.3.1. Résultat du contrôle physicochimique de la pommade

L'homogénéité de la pommade a été vérifiée macroscopiquement en l'étalant sur une couche mince sur une surface plane, nous constatons à l'œil nu l'absence des agrégats et des grumeaux et la bonne répartition de la pommade, donc elle est parfaitement homogènes.

Le pH de la pommade est égal à 6,82. D'après la valeur qui est ni très acide ni très basique, nous pouvons dire que la pommade ne provoque pas d'irritation sur la peau (**Pharmacopée européenne , 1997**).

III.6.3.2 Résultats du contrôle microbiologique

Le contrôle microbiologique de la pommade n'a révélé aucune contamination bactérienne ou fongique (**figure 42,annexeIII**).

Nous colligeons dans le tableau XXIII les résultats du contrôle de la qualité microbienne de la pommade .

Résultats et discussion

Tableau XXIII: Résultats du contrôle microbiologique de la pommade.

Germes recherchés	Normes (Ph.Eur)	Notre étude
	UFC/g	UFC/g
Germes mésophiles	<100	00
Entérobactéries	<10	00
Pseudomonas aeruginosa	00	00
Staphylococcus aureus	00	00
Escherichia coli	00	00

Pour les germes aérobies viables totaux, aucune croissance bactérienne ou fongique n'a été décelée au bout de 5 jours d'incubation des géloses SA et Sabouraud.

Pour ce qui est des germes spécifiques, aucune croissance microbienne n'a été constatée.

L'analyse microbiologique a révélé un taux de contamination bactérienne et fongique nulle et a permis aussi de montrer l'absence totale de germes pathogènes.

Au vu des normes en vigueur de la Pharmacopée Européenne (1997), les lots des crèmes analysés sont exempts de toutes contaminations microbiennes. Ils sont ainsi déclarés conformes.

III.6. 3.3. Résultats de l'essai préliminaire de cicatrisation

L'essai préliminaire de cicatrisation nous a permis de relever certaines observations :

- * Cliniquement, aucun signe de toxicité locale ou systémique n'a été noté chez les lapins traités par la pommade. Au terme de la période de traitement, aucunes lésions ou perturbation dans la repousse des poils n'ont été observées.
- * Ainsi, la pommade s'est révélée relativement bien tolérée chez le lapin après des applications cutanées itératives durant 15 jours.
- * D'une façon générale, l'observation montre l'absence d'œdème pour les deux zones traitées par la pommade à base de feuilles de *Cydonia oblonga* et par le produit de référence Madécassol, ce qui signifie que ces deux traitements ne favorisent pas le processus inflammatoire, par contre pour le lot témoin un œdème léger apparaît dès le premier jour et s'estompe pour disparaître le 3ème jour.

Résultats et discussion

- * Le bourgeon est relativement peu marqué, il se manifeste dès le premier jour pour les plaies traitées pour s'estomper assez rapidement et disparaître le 4^{ème} jour, cependant pour le lot témoin il n'apparaît que vers le 3^{ème} jour et persiste jusqu'au 6^{ème} jour .
- * Chez les lapins traités, nous observons la formation d'une croûte légère après 24h du traitement et qui s'épaissit durant les premiers jours et disparaît au 5^{ème} jour pour les zones traitées par la pommade de feuilles et au 7^{ème} jour pour les zones traitées par Madécassol ; cependant, elle apparaît moins épaisse au bout du 3^{ème} jour, elle s'épaissit et persiste jusqu'au 11^{ème} jour.
- * Les scarifications sont nettement plus profondes pour les zones non traitées (témoin) que pour celles traitées, au bout 5^{ème} jour de traitements , la profondeur des plaies traitées par la pommade de feuilles est moins importante par rapport à celles traitées par Madécassol. Les deux traitements ont donné une bonne cicatrisation avec des délais de guérisons un peu différentes et qui est de 8 jours pour la pommade de feuilles de *Cydonia oblonga* et de 9 jours pour Madécassol. La cicatrisation naturelle et complète des témoins se fait au bout du 14^{ème} jour (**Figure 43 et 44,annexeIII**).

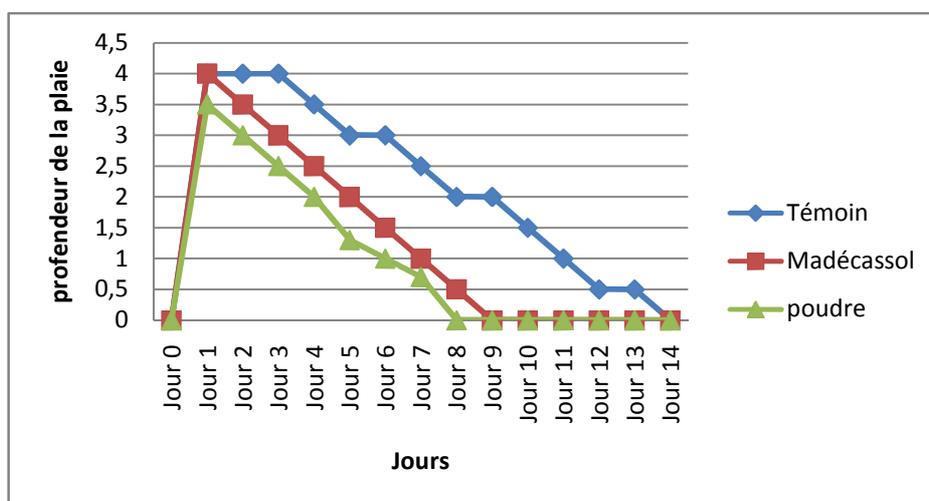


Figure 43: Evolution de la profondeur des plaies.

Le résultat de l'activité cicatrisante concorde avec celui trouvé par **Echard et Droux (2014)** qui ont formulé une crème à base d'un extrait de feuilles de *Cydonia oblonga* à 0.5% testée sur quinze volontaires en réduisant la réponse inflammatoire et protège également la peau contre des irritations.

Le screening phytochimique révèle que *Cydonia oblonga* est une plante très riche en tannins qui, selon **Bruneton (1999)** possèdent des activités cicatrisantes. L'absence de l'œdème est justifié par l'activité anti-inflammatoire que possède la plante .

CONCLUSION

Conclusion

Le présent travail nous a permis d'avoir une idée sur les métabolites secondaires que peut synthétiser *Cydonia oblonga* Mill. et sur les éventuelles activités biologiques et pharmacologiques qui le caractérisent. Cette espèce s'est avéré être une remarquable source de molécules biologiquement actives à travers ses feuilles et ses fruits .

Dans la première partie, le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis d'identifier les tanins, les flavonoïdes, les leucoanthocyanes, les saponosides, les coumarines et les glycosides, ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

De plus, le dosage des phénols totaux des extraits étudiés a révélé des teneurs considérables dans *Cydonia oblonga* Mill. alors que, la forte teneur a été enregistrée dans l'extrait méthanolique (EMF).

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH de l'extrait aqueux, le jus et l'extrait méthanolique a montré que tous nos extraits possèdent un pouvoir antioxydant modéré en particulier l'extrait méthanolique (EMF).

Il est à noter que le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique (EMF) est largement supérieur par rapport aux autres extraits, mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique.

En outre, les résultats de l'activité antimicrobienne nous a montré que l'extrait méthanolique possède un faible pouvoir inhibiteur sur deux souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus épidermidis*. De même, l'extrait aqueux des feuilles et le jus de fruit ne manifestent aucun effet antimicrobien vis-à-vis les germes testés sauf pour la souche *Sarcina lutea* avec une faible action inhibitrice. Toute fois les trois extraits ne présentent aucune activité antifongique.

La résistance de ces germes peut être expliquée, selon la bibliographie, par la rigidité de leur paroi, ou à leur faculté de métaboliser ces composés.

Les résultats obtenus, à l'issue du test anti-inflammatoire montrent que l'extrait aqueux des feuilles et le jus de fruit réduit de façon non considérable l'œdème induit par la carraghénine.

D'autre part, l'extrait aqueux des feuilles et le jus de fruit de *Cydonia oblonga* Mill. présentent une importante activité antispasmodique chez les souris rendus spasmodiques par l'acide acétique, en diminuant d'une manière significative les spasmes.

Enfin, la plante exhibe une activité cicatrisante équivalente à celle du Madécassol[®]. En effet la poudre de la plante engendre une cicatrisation rapide, notamment entre le 5^{ème} et 8^{ème} jour du traitement. La poudre de la plante accélère la cicatrisation comparativement à celui du médicament. L'effet cicatrisant de la plante est dû aux tanins et aux phénols mis en évidence par le criblage phytochimique. Ces composés sont connus par leur activité antimicrobienne et antiseptique qui combattent les infections, réparent les tissus et renforcent la cicatrisation. En effet les tanins activent la multiplication et la régénération cellulaires ce qui contribue à augmenter la vitesse de cicatrisation.

Pour conclure, cette étude reste préliminaire, de ce fait, elle nécessite des études approfondies par des méthodes analytiques performantes tel que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou encore la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) pour déterminer, d'une part, les composés de *Cydonia oblonga* qui peuvent être responsables de tels effets et d'autres part, le mécanisme absolu par lequel ces composés accomplissent leurs rôles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références bibliographiques

- ✓ **Allane T., Benamara S.,2010.** Activités antioxydantes de quelques fruits communs et sauvages d'Algérie.Département de technologie alimentaire (FSI), université de Boumerdès, Pharmacognosie Springer, Algérie.
- ✓ **Ammar, S., H. Edziri, M. A. Mahjoub, R. Chatter, A. Bouraoui and Z. Mighri (2009).** Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. Phytomed. 16:1156-61.
- ✓ **Aslan M., Orhan N., Orhan D.D., Ergun F., 2010.**Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes. Journal of Ethnopharmacology, Vol.128
- ✓ **Anonyme, 2002** « Pharmacopée européenne ». 4ème édition, Strasbourg.
- ✓ **Baba Aïssa F., 1999 .** Les plantes médicinales d'Algérie, Edition : Diwen, Alger, pp 3-39.
- ✓ **Baba Aïssa F., 2011.** Encyclopédie des plantes utiles, Edition : el Maarifa, Alger, pp.115. 471p
- ✓ **Babo D., 2006.** L'encyclopédie des fruits. Edition Dés Iris, Paris, pp.64-65. 223p.
- ✓ **Babulka P., 2007.** Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales : de la médecine traditionnelle à la phytothérapie moderne ; phytothérapie Edition Paris, pp 137-145
- ✓ **Balasundram N.,Ai T.Y.,Sambanthanmurthi R., Sundram K. and Samman S .,2005.** « Antioxydant properties of palm fruits extracts », Asia Pac J Clin Nutr,V.4, n 4,pp. 319-324.
- ✓ **Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ed. Ibis Press, 764p.
- ✓ **Beloued A., 2001.** Plantes médicinales d'Algérie, Edition : Office des publications universitaire, Alger, pp.76. 277p.
- ✓ **Benabdallah M., 1992.** Homéopathie, une médecine pour tous. Edition Ellebore, 201p.
- ✓ **Bérubé-Gagnon J., 2006.** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Thèse. Doctorat en Chimie . Univ. Québec, pp 2-4.
- ✓ **Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M. et Torck M., 1975.** Les plantes dans la thérapeutique moderne, 1ère édition, Ed. Maloine S.A.
- ✓ **Bézanger-Beauquesne L.,Pinkas M,Torck et Trotin F,1990 .**Plantes médicinales des régions tempérées .Maloine. pp 105.

Les références bibliographiques

- ✓ **Boizot N. et Charpentier J-P., 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cah. Tech. INRA. N°. spécial. Pp.79-82.
- ✓ **Boullard B., 2001.** Dictionnaire plantes médicinales du monde (Réalités et Croyances), Ed. ESTEM , Paris, France, pp. 177-231, 660p
- ✓ **Bossard et Cuisance, 1984.** Arbres et arbustes d'ornement des régions tempérées et méditerranéennes, Ed. Tec & Doc. J.b. baillièrre TECHNIQUE & DOCUMENTATION-Lavoisier,Cedex, France, pp. 206
- ✓ **Bretauudeau J. et FauréY., 1990.** Collection des techniques horticoles spéciales :Atlas d'arboriculture fruitière, 4ème volume, Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris,pp.243-246.
- ✓ **Brosse J., 2010.** Larousse des arbres : Dictionnaire de 1600 arbres et arbustes, Ed. Larousse, Espagne, pp.150, 591p
- ✓ **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Ed. Tec & Doc, Paris.1120p.
- ✓ **Budriesi, R., P. Ioan, M. Micucci, E. Micucci, V. Limongelli, and A. Chiarini (2010).** Stop Fitan: antispasmodic effect of natural extract of chestnut wood in guinea pig ileum and proximal colon smooth muscle. J. Med. Food. 13: pp. 1104- 1110.
- ✓ **Burits M. and Bucar F., 2000.** Antioxydant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytother. Res., 14 : pp 323-328.
- ✓ **Burnie G. ,Forrester S., Greig D., Guest S., Harmony M., Hobley S., Jackson G., Lavarack P., Ledgett M., Silk J. et al., 2003 .**Botanica: Encyclopédie de botanique et d'horticulture, Plus de 10000 plantes du monde entier, Ed. Place des victoires, Paris, Random House Australia .
- ✓ **Carvalho M, Silva B.M., Silva R., Valentão P., Andrade P.B., Bastos M.L. ,2010.** First report on *Cydonia oblonga* Miller anticancer potential: Differential antiproliferative effect against human kidney and colon cancer cells. J. Agric. Food Chem., 58: pp. 3366-3370.
- ✓ **Chabrier J.Y., 2010.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse Doc. Uni. Henri Poincaré, Nancy 1. France.
- ✓ **Chaumont J-P. et Millet-Clerc J., 2011.** Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie. Editions TEC & DOC , Lavoisier. Paris. France. Pp. 234.pp126-128

Les références bibliographiques

- ✓ **Chavane U.D., Shahidi F. and Naezck M., 2001.** Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents, J. Food Chem. Vol. 75. Pp. 509-512.
- ✓ **Clarac F., 2008.** Encyclopédie historique des neurosciences : du neurone à l'émergence de la pensée, Edition de Boeck Supérieur 1009p.
- ✓ **Couplan F., 2009.** Le régal végétal : Encyclopédie des plantes sauvages, comestibles et toxiques de l'Europe, Ed. Sang de la Terre, 2ème trimestre, Cedex, Paris,pp. 243
- ✓ **Costa M.R., Magalhães A. S., Pereira J. A., Andrade P. B., Valentão P., Carvalho M., Silva B. M.,2009.** Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*).Journal of Food and Chemical Toxicology. Portugal.
- ✓ **Cuendet M., Hostettmann K., Potterat O. and Dyatmiko W., 1997.**Iridoid glucosides with free radical scavenging from *Fagraea blumei*. Helvetica Chimie. Acta. 80 : pp 1144-1152.
- ✓ **De Billerbeck VG, roques C, vaniere P, marquier P., 2002** « Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles ». HYGIENES - Vol X – n°3, pp : 248-251.
- ✓ **Debuigne G. et Couplan F.,2006.** Petit Larousse des plantes médicinales. Ed. Larousse. Paris, pp325-326.
- ✓ **Debuigne G. et Couplan F., 2009.** Petit Larousse des plantes médicinales. Ed. Larousse. Paris, 74p.
- ✓ **Duraffourd C., Dhervicourt L.,et Laparaz J.C., 1990.** Examen de laboratoire galénique, Eléments thérapeutiques synergiques T.1.2ème édition. Masson. Paris p.10.
- ✓ **Duraffourd C., Lapraz J-C., Chemli R. ; 1997.** La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.
- ✓ **Echard A. et Droux J., 2014.***Cydonia oblonga* (quince) leaf extract :A new solution for sensitive skin, Agro FOOD Industry Hi Tec (Tekno Scienze Publisher) .France.
- ✓ **Ernest E. et Pittler M.H. , 2005.** Médecines alternatives, le guide critique, Edition Elsevier, 504p.
- ✓ **Essafi-Benkhadir K., Refai A., Riahi I., Fattouch S., Karoui H., Essafi M., 2012.** Quince (*Cydonia oblonga* Miller) peel polyphenols modulate LPS-induced inflammation in human THP-1-derived macrophages through NF-jB, MAPK and Akt inhibition , Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications, Tunisie. p38

Les références bibliographiques

- ✓ **Evans, W. C. ,2006.** Trease and Evans Pharmacognosy, 5th Ed. Elsevier, Delhi.India. 135p.
- ✓ **Fattouch,S; Caboni ,P; Coreneo,V;Tuberesso C; Angioni A.; Dessi S; Marzouki N;Cabras P, 2006.** Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia Oblonga miller*) pulp and peel phenolic extracts, J.Agr.food.chem.
- ✓ **Fattouch S, Caboni P, Coroneo V, Tuberoso CI, Angioni A, Dessi S, et al., 2007.** Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga Miller*) pulp and peel polyphenolic extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry;55:963.
- ✓ **Fkih S., 2007.** Etude de l'effet de l'irradiation ionisante sur certains polyphenols alimentaires et residus pesticides . Mémoire de D.U.T. Tunisie .
- ✓ **Fouché J.G. , Marquet A. et Hambuckers A., 2000.** Les plantes médicinales, de la plante au médicament ; Observatoire du monde des plantes, Sart-Tilman, B77. B-4000, Liège, pp 3-7.
- ✓ **Fonteneau J. M., Orecchioni A-M., Pain J., 1999.** Galénique : préparateur en pharmacie, Edition Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, 204p
- ✓ **Goetz P., 2011.** Actualités en phytothérapie, Springer-Verlag, France.
- ✓ **Gheyouché.R et Hammiche.Y,1998 .**Plantes médicinales et thérapeutiques L'INA Algérie Vol :12 Tome :2.pp 68.
- ✓ **Ghourri M., Zidane L., Douira A., 2013.** Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète au sahara marocain (Tan-Tan). Journal of animal & plant sciences, Vol.17,pp.2410.
- ✓ **Gründemann, C., M. Papagiannopoulos, E. Lamy, V. Mersch-Sundermann, and R. Huber ,2011.** Immunomodulatory properties of a lemon-quince preparation (Gencydo®) as an indicator of anti-allergic potency, journal of phytomedicine, Germany,pp. 760– 768.
- ✓ **Hans W. kothe ,2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales (Plantes aromatiques et médicinales de A à Z propriétés et usages) Ed. Terres, Toulouse, France, pp.6-9, 336p
- ✓ **Halliwell B., 1999.** Antioxydant defence mechanism :From the beginning to the end. Free Radical Res., 31:261-272.
- ✓ **Iserin Paul., 2001.** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse. Pp10-15, 132p.
- ✓ **Karar M.G.E., Pletzer D., Jaiswal R., Weingart H., Kuhnert N., 2013.** Identification, characterization, isolation and activity against *Escherichia coli* of quince (*Cydonia oblonga*) fruit polyphenols, Journal of Food Research International, Allemagne.

Les références bibliographiques

- ✓ **Kirimer, N., Z. Tunalier, K. H. Başer, and I. Cingi (1997).** Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and Taraxasteryl acetate on isolated ileum preparations. *Planta. Med.* 63: 556-558.
- ✓ **Kurban, M., 2004.** Mensuration of the Total flavone in Xinjiang *Cydonia Oblonga* Mill. *Journal of Xinjiang Normal Univetsity* 23, 68-69.
- ✓ **Laranjinha, J. A., Almeida, L. M., & Madeira, V. M. (1994).** Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: Antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 3, 487–494.
- ✓ **Leclerc H., 1976.** Précis de phytothérapie : thérapeutiques par les plantes françaises, 5ème Edition Masson, 3ème Tirage, Paris, pp.103-104, 363p.
- ✓ **Legua P., Serrano M., Melgarejo P., Valero D., Martínez J.J., Martínez R., Hernández F., 2013.** Quality parameters, biocompounds and antioxidant activity in fruits of nine quince (*Cydonia oblonga* Mill.) accessions, *Journal of Scientia Horticulturae*, Espagne , 61-65.
- ✓ **Levallois J-P., 2003.** Larousse médical. Edition LAROUSSE. France.
- ✓ **Le Hir A., 2001.** Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication de médicaments .Edition Masson, 402p.
- ✓ **Levy L., 1969.** Carrageenan paws edema in the mouse. *Life Science* 8 .pp 601-606.
- ✓ **Lis-balchin M, deans SG, eaglesham E., 1998.** « Relationship between the bioactivity and chemical composition of commercial plant essential oils ». *Flav. Fragr. J.*, 13:, pp. 98–104.
- ✓ **Markowicz Bastos D.H., Saldanha L.A., Catharino R. R., Sawaya A.C.H.F., Cunha I.B.S., Carvalho P.O. et Eberlin M.N., 2007 .** Phenolic Antioxydants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12:pp 42-432.
- ✓ **Mazari K., Bendinerad N., Benkhechi Ch. et Fernandez X., 2010.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algérian *Juniperus phoenicea* L and *Cupressus sempervirens*. *Medicinal Plants Research*. 4 (10): 959-964.
- ✓ **Minaiyan M., Ghannadi A., Etemad M., Mahzouni P., 2012.** A study of the effects of *Cydonia oblonga* Miller (Quince) on TNBS-induced ulcerative colitis in rats, *Research in Pharmaceutical Sciences*. Iran. Pp103-110.
- ✓ **Milpied H., 2009.** Progrès en dermato-allergologie, Edition John Libbey Eurotext, pp391.

Les références bibliographiques

- ✓ **Mazari K., Bendinerad N., Benkhechi Ch. et Fernandez X., 2010.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algérian *Juniperus phoenicea* L and *Cupressus sempervirens*. *Medicinal Plants Research*. 4 (10): 959-964
- ✓ **Mélessopoulos A. et Levacher CH., 2001.** La peau : structure et physiologie. Edition TEC & DOC Lavoisier. Paris. France.
- ✓ **More D. et White J., 2005.** Encyclopédie des arbres : Plus de 1800 espèces et variétés du monde, Ed. Flammarion, Grande Bretagne, pp. 455.
- ✓ **Nostro A., Germanò M. P., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M.a., 2000.** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliqué*. 30 (5), 379p.
- ✓ **Oliveira A.P., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentão P., Seabra R.M., Silva B.M., 2007.** Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *J. Agric. Food Chem*. 55, 7926-7930.
- ✓ **Oliveira A.P., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentão P., Seabra R.M., Silva B.M., 2008.** Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chem*. 111, 393-399.
- ✓ **Organisation Mondiale de la Santé, 2003.** Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. Genève. Lien ; <https://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5526f/s5526f.pdf>.
- ✓ **Paris R.R. et Moyse H., 1976.** Précis de matière médicale. Tomes 1, 2 et 3. 2^{ème} Ed. Masson.Paris.
- ✓ **Pharmacopée Européenne, 1997.** Direction de la qualité du médicament du conseil d'Europe (DEQM), troisième addendum de la 3^{ème} Edition, Série des traités européens n°50, Strasbourg, 2230p.
- ✓ **Porter L.J., Foo L.Y., Furneaux R.H., 1985.** *Phytochemistry*, 24, pp567-569
- ✓ **Pourrat A., 1993.** Etude de la cicatrisation des plaies chez le lapin et le rat. *J. Pharm. Belg*, 1993.
- ✓ **Poyrazoglu Çoban E., Biyik H. ,2010.** *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(21).Turkie.pp. 2318-2323
- ✓ **Roux D. et Catier O. ,2007.** *Pharmacognosie, phytothérapie*. 3^{ème} Ed. Wolters Kluwer France, 141p.
- ✓ **Rousseau J., Raymon M.,1945.** *Etudes ethnobotaniques québécoises*, n°55. université de MONTRÉAL, INSTITUT BOTANIQUE, MONTRÉAL CANADA. Pp45-90.

Les références bibliographiques

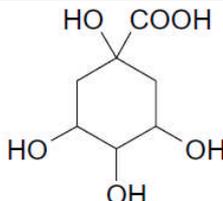
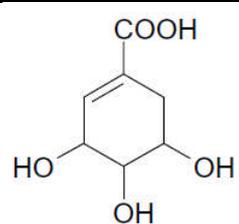
- ✓ **Russell T. et Cutler C., 2008.** Encyclopédie mondiale des arbres : Un guide superbement illustré sur les arbres du monde entier, Ed. Hachette pratique, Paris, pp. 146. 256p
- ✓ **Salle J.L., 1991.** Le Totum en Phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie, Ed. FRISON-ROCHE , Paris, France, pp.17, 239p
- ✓ **Schauenberg P. et Paris F., 2006.** Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes, Ed. Delachaux et Niestlé , Paris, pp. 308-309, 396p
- ✓ **Schnaubelt K., 1998.** Advanced Aromatherapy. Vermont : Healing Arts Press.
- ✓ **Silva B.M., Andrade P.B., Valentão P., Ferreres F., Seabra R.M., Ferreira M.A., 2004.** Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 52, 4405-4712.
- ✓ **Silva B.M., Valentão P., Seabra R.M., Andrade P.B., 2008.** Quince (*Cydonia oblonga* Miller): an interesting dietary source of bioactive compounds. In: Food chemistry research developments. Ed. K.N. Papadopoulos. Nova Sci. Publ. New York, 243-266.
- ✓ **Singleton V.L ; Rossi J.A, 1965** .Indice de Folin, polyphenols totaux, J. Eol.Vitic.
- ✓ 16 :144-158
- ✓ **Strang C., 2006.** Larousse Médical. Edition Larousse, Paris, pp12-19
- ✓ **Svoboda K. et Svoboda T.; 2000;** Secretory structures of aromatic and medicinal plants; Ed: MICROSCOPIX PUBLICATIONS; p: 7-12.
- ✓ **Tchoumak E., 2012.** Le bien être des cordes vocales par les remèdes naturels. Ed. Mon petit éditeur.70p.
- ✓ **Tonelli N. et Gallouin F., 2013.** Des fruits et des graines comestibles du monde entier, Ed. Lavoisier, Paris, pp.197-204 , 726p
- ✓ **Torres R. et al; 2006.** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*; Phytochemistry 67; Ed: ELSEVIER; p: 984-987
- ✓ **Tsuneya T., Ishihara M., Shiota H., Shiga M., 1980.** Agric. Biol. Chem.,44, pp. 957-958
- ✓ **Tuzlaci, E., Tolon, E., 2000.** Turkish folk medicinal plants, part III: S, ile (Istanbul). Fitoterapia 71, 673–685.
- ✓ **Twidwell E.K., Wagner J.J., et Thies Nancy J., 2002.** Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. 8077p.
- ✓ **Verdrager J., 1978.** Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Ed. Maloine S.A. pp9-13.

Les références bibliographiques

- ✓ **Vogel G., 2002.** Drug discovery and evaluation pharmacological assays. 2eme Edition Springer, 1385p.
- ✓ **Wang S-Y., Wu J.H., Shyur L.F., Kuo Y-H.et Chang S.T., 2002.** Antioxdant activity of Abietane type diterpenes from heartwood of Taowania cryptomerioides Hayata. *Holzforschung*. 56, p5.
- ✓ **Zhou W. Abdusalam E, Abliz P., Reyim N., Tian S., Aji Q., Issak M., Iskandar G., Moore N., Umar A., 2014.** Effect of Cydonia oblonga Mill. Fruit and leaf extracts on blood pressure and blood rheology in renal hypertensive rats .*Journal of Ethnopharmacology*, Science direct. China. pp 464-496.

Annexe I

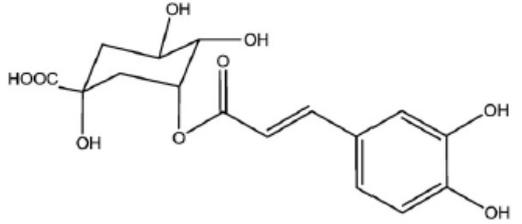
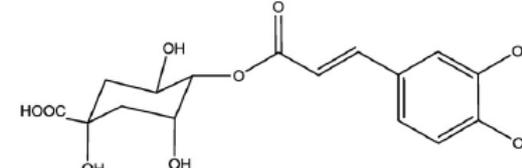
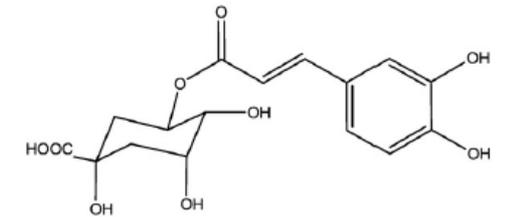
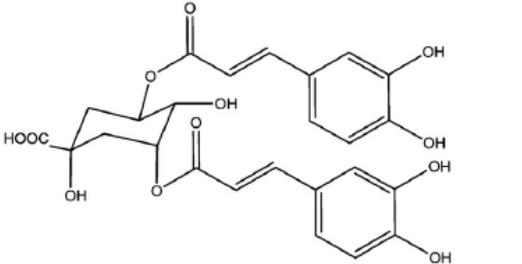
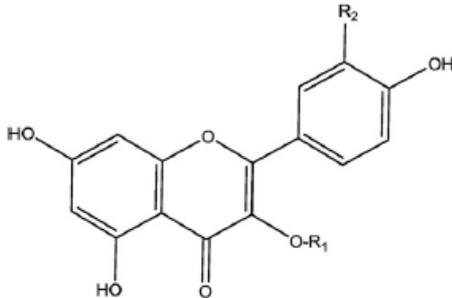
Tableau I : Structure chimique des acides organiques des feuilles de *Cydonia Oblonga* Mill.

Acide organique	Structure chimique
Acide citrique	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} $
Acide malique	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} $
Acide oxalique	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array} $
Acide quinique	
Acide shikimique	
Acide fumarique	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array} $

(Oliveira et al., 2008)

Annexe I

Tableau II : Composition chimique des feuilles de *Cydonia oblonga* Mill.

Composé	Structure chimique
Acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique	
Acide 4- <i>O</i> -caféoylquinique	
Acide 5- <i>O</i> -caféoylquinique	
Acide 3,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique	
<p> $R_1 = \text{Galactose}, R_2 = \text{OH}; \text{Quercetin-3-}O\text{-galactoside}$ $R_1 = \text{Rutinoside}, R_2 = \text{OH}; \text{Quercetin-3-}O\text{-rutinoside}$ $R_1 = \text{Glucose}, R_2 = \text{H}; \text{Kaempferol-3-}O\text{-glucoside}$ $R_1 = \text{Rutinoside}, R_2 = \text{H}; \text{Kaempferol-3-}O\text{-rutinoside}$ </p>	

(Oliveira et al., 2012)

Annexe III

Tableau IX : La teneur en eau et de matière sèche des feuilles du *Cydonia oblonga*

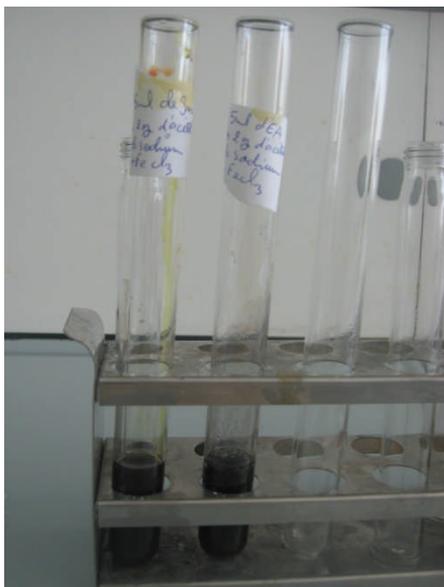
Teneur en eau (g/100g)	Teneur en matière sèche (g/100g)
52,55	47,45



Réaction des leucoanthocyanes



Réaction des tanins



Réaction des tanins galliques



Réaction des tanins saponosides

Figure 30: Résultats du screening phytochimique (Originale, 2014)

Annexe III

Tableau XI: La densité optique des trois extraits et l'acide ascorbique

Les concentrations(mg/ml)		0,125	0,25	0,5	1	1,5
La densité optique (DO)	Acide ascorbique	0,55	1,13	1,517	1,9	2,17
	EA	0,159	0,229	0,315	0,592	0,827
	Jus	0,036	0,056	0,104	0,209	0,302
	EMF	0,189	0,224	0,358	0,464	0,619

TableauXII : Le pourcentage de l'activité antiradicalaire des trois extraits et l'acide ascorbique.

C (µl)	Pourcentage d'inhibition (I)%			
	EA	jus	EMF	Vit C
50µl	34,57	0,82	30,31	32,98
200µl	65,61	20,98	58,04	71,03
400µl	72,86	33,51	89,46	90,69
600µl	84,75	63,21	91,86	91,12
800µl	88,47	67,3	92,23	92,38

Tableau XV : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot témoin (l'eau distillée)

	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Moyenne
Poids des pattes droites (g)	0,1395	0,1621	0,1637	0,1691	0,1385	0,1545
Poids des pattes gauches (g)	0,2005	0,2166	0,2291	0,2160	0,1931	0,2110
Pourcentage d'œdème (%)	36,57					
Pourcentage réduction de l'œdème (%)	0					

Annexe III

Tableau XVI : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot produit de Référence
(Diclofénac®)

Souris	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Moyenne
Poids des pattes droites (g)	0,1729	0,1611	0,1701	0,1622	0,1540	0,1640
Poids des pattes gauches (g)	0,1852	0,1950	0,215	0,1960	0,1768	0,1936
Pourcentage d'œdème (%)	18,05					
Pourcentage réduction de l'œdème (%)	50,76					

Tableau XVII : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot extrait aqueux

Souris	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Moyenne
Poids des pattes droites (g)	0,1601	0,1794	0,1518	0,1605	0,1667	0,1631
Poids des pattes gauches (g)	0,1901	0,2330	0,215	0,1813	0,1989	0,2036
Pourcentage d'œdème (%)	24.83					
Pourcentage réduction de l'œdème (%)	32,10					

Annexe III

Tableau XVIII : Résultats de l'activité anti-inflammatoire chez le lot jus

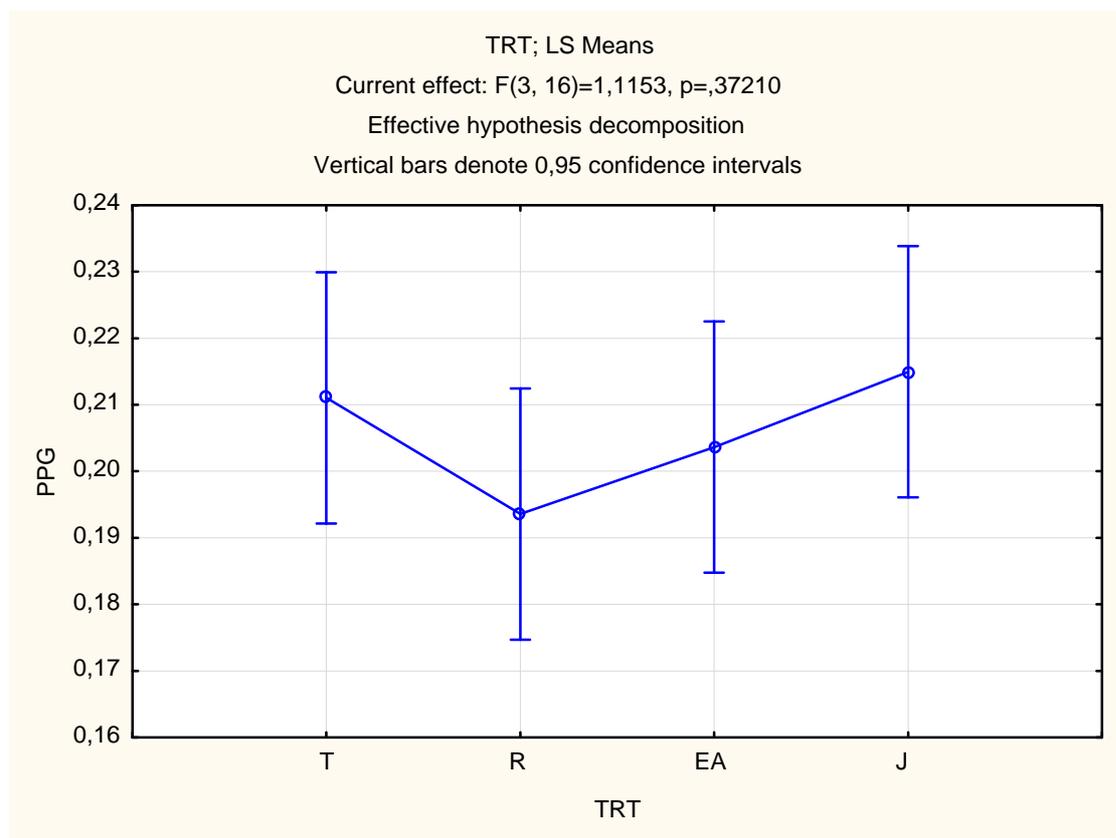
Souris	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Moyenne
Poids des pattes droites (g)	0,1870	0,1579	0,1844	0,1661	0,1887	0,1768
Poids des pattes gauches (g)	0,2601	0,2001	0,2213	0,1917	0,2017	0,2145
Pourcentage d'œdème (%)	21,32					
Pourcentage réduction de l'œdème (%)	41.70					

Tableau XIX: ETUDE STATISTIQUE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

TEST ANOVA suivie par Test de comparaison par paire de Fisher au risque de 5%.

LSD test; variable PPG (stat PPG) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00040, df = 16,000					
	TRT	{1} - ,21106	{2} - ,19360	{3} - ,20366	{4} - ,21498
1	T		0,184654	0,565019	0,759625
2	R	0,184654		0,436114	0,108942
3	EA	0,565019	0,436114		0,382071
4	J	0,759625	0,108942	0,382071	

Annexe III



- $P > 0.05$: La différence n'est pas significative.

- $0.05 > P > 0.01$: La différence est significative.

- $0.01 > P > 0.001$: La différence est très significative.

- $P < 0.001$: La différence est hautement significative.

Tableau XX: Résultats de l'activité antispasmodique.

	Témoin	Référence	EA	J
Souris1	19	6	13	9
Souris2	35	4	15	10
Souris3	27	3	20	12
Souris4	22	5	17	10
Souris5	18	2	15	13
somme	121	20	80	54
Moyenne	24,2	4	16	10,8
Ecart type	6,97853853	1,58113883	2,64575131	1,64316767

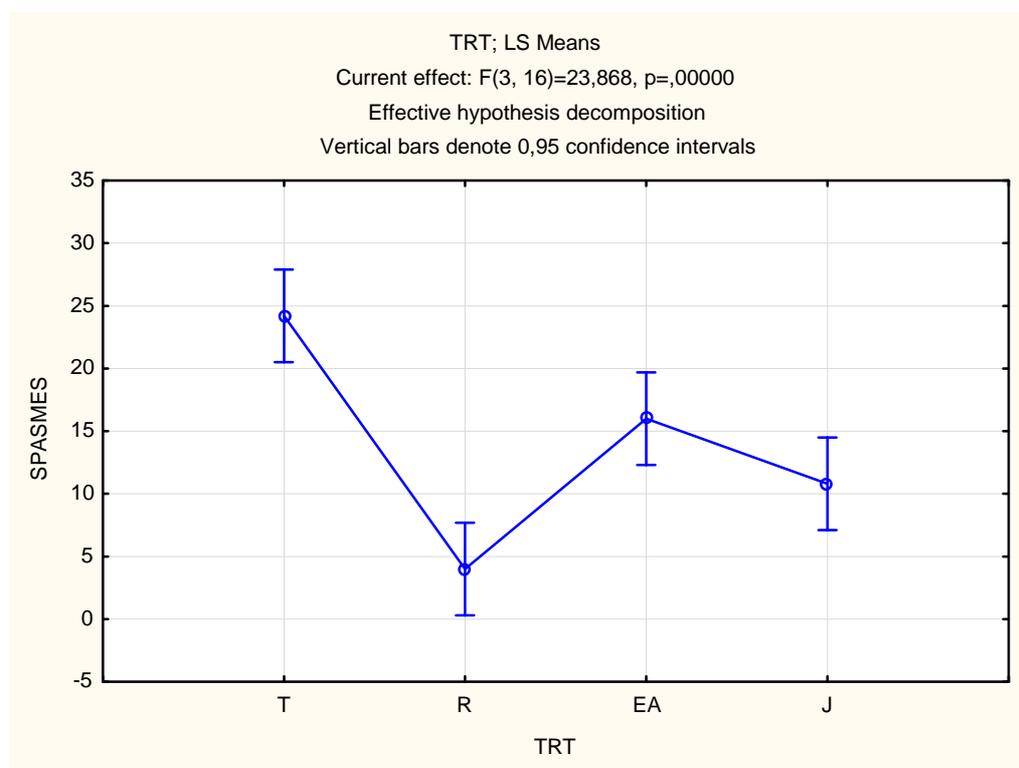
Annexe III

Tableau XXII: ETUDE STATISTIQUE DE L'ACTIVITE ANTISPASMODIQUE

TEST ANOVA suivie par Test de comparaison par paire de Fisher au risque de 5%.

LSD test; variable SPASMES (Spreadsheet3) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 15,225, df = 16,000

	TRT	{1} - 24,200	{2} - 4,0000	{3} - 16,000	{4} - 10,800
1	T		0,000000	0,004307	0,000056
2	R	0,000000		0,000173	0,014074
3	EA	0,004307	0,000173		0,051236
4	J	0,000056	0,014074	0,051236	



Annexe III



Figure 42: Résultats du contrôle microbiologique (Originale, 2014)

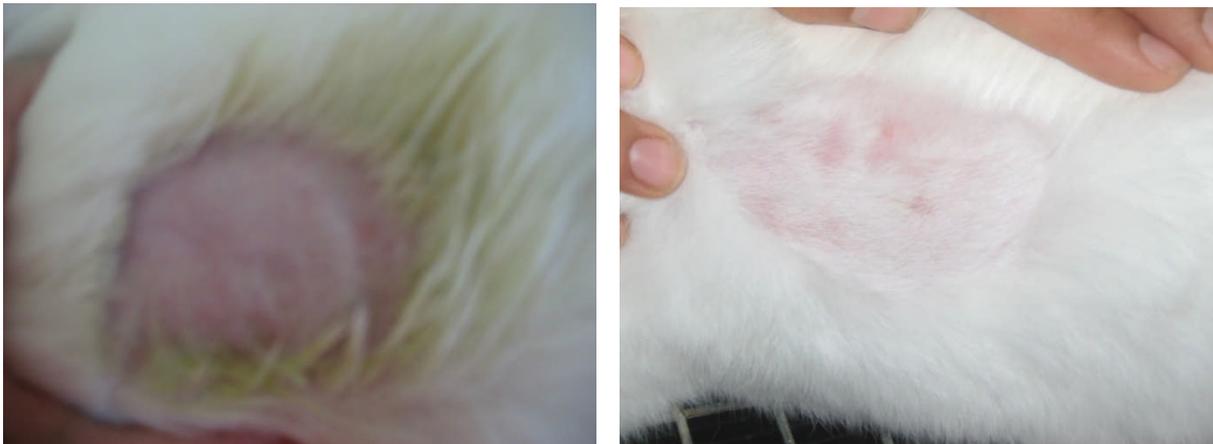


Figure44 : Résultats de l'essai préliminaire de cicatrisation (Originale, 2014)