

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE de BLIDA-1-



Faculté Des Sciences de la nature et de la vie
Département de biologie des populations et des organismes

Mémoire de fin d'étude
Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du
Diplôme de master en sciences biologiques
Option : Phytothérapie et santé

**Contribution à l'étude de quelques activités biologiques de l'extrait
flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso.
(Armoise blanche) récoltée dans la Région de BORDJ BOU
ARRERIDJ.**

Réalisé par :

M^{elle} : BETIT Yassamina

Le 27/09/2014 à 11 :00

Devant les jurys

M ^{me} FAIDI F.	MAA	UDB-1-	Présidente
M ^{me} CHERIF H.S.	MAB	UDB-1-	Examinatrice
M ^{me} GHANAI R.	MAA	UDB-1-	Examinatrice
M ^{me} BEN MANSOURE N.	MAA	UDB-1-	Promotrice
M ^{lle} DAHMANE T.	MAA	Labo SAIDAL	Co-Promotrice

Promotion : 2013-2014

REMERCIEMENTS

Nous remercions en premier lieu DIEU le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage de réaliser ce projet de fin d'étude.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à mon promotrice Mme BENMANSOURE N., et ma Co-promotrices M^{lle} DAHMANE T. L'Ingénieure de laboratoire SAIDAL

Pour ses aides, ses orientations et sa gentillesse.

Nos sincères remerciements s'adressent aussi à :

Présidente Mme FAIDI F. qui nous a fait l'honneur de présider les jurys. Notre examinatrice Mme CHIRIF H.S. et Mme GHANAI R. d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous présentons ainsi nos remerciements à tous les enseignants qui ont participé à notre formation.

A la fin, nous tenons à remercier profondément et sincèrement tout le personnel du laboratoire Substance naturelle, ainsi que les membres de laboratoires pharmacotoxicologie et microbiologie pour leur grande sympathie et leurs conseils.

A mes ami(e)s et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Une mention spéciale à toute ma famille

Enfin, un grand merci à tous ceux et toutes celles qui d'une manière ou d'une autre m'ont aidée et soutenu de près ou de loin.

YASSAMINA

DEDICACES

*Au terme de ce modeste Travail, il m'est agréable d'adresser mes dédicaces :
En premier lieu, à mes parents ,*

*Pour votre amour ainsi que les valeurs que vous m'avez transmises et qui m'ont permis
d'avancer dans la vie .*

A mon frère Kamel.

Mes soeurs : Samira, Nabila, Farida et Djamila.

Les deux petit de la famille : Rahaf Lodjaine et Mohamed Amine.

A toutes les familles BETTI.

A mes adorables amies Habiba , Zahra, Frida et Amine.

*A mes amies de la promotion et surtout les V.P.T pour les moments inoubliables que j'ai
vécus avec vous .*

*A tous mes camarades , de la faculté et d'ailleurs , merci pour votre présence et votre
réconfort .*

YASSAMINA

Résumé

Dans le cadre de la caractérisation et la détermination l'effet toxicologique et les activités biologiques d'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso., nous avons effectué une étude expérimental dont la quelle, l'extraction liquide-liquide par l'utilisation de méthanol comme solvant a donné un rendement de 0.366 %.

Le screening chimique a met en évidence la présence des substances polyphénoliques (tanin gallique et flavonoïdes) et les coumarines, cependant l'absence totale des anthocyanes, Leucoanthocyanes, quinones, alcaloïdes, sénosides et glucides.

L'identification des composants sur la plaque CCM a montrent la présence de l'Apigénine (**flavones**) avec un rapport frontales de 0.74 .

L'étude de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes d'*Artemisia herba alba* Asso. a donné des degrés de sensibilité variable allant de **16 mm** pour les *P. aeruginosa* suivi par **14 mm** pour *S. aureus. et E. coli.*, et **11mm** pour *B. subtilis*, par contre les deux levures testés (*C. albicans* et *Saccharomyce sp.*) ils sont résistances au extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso.

Test anti-inflammatoire à révélée que l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso . administré par voie orale, avec une dose de 200 mg/kg à induit une réduction d'œdème des pattes postérieure gauche des souris blanches albinos de 34,96 %. Ce résultat est proche de celui de Diclofenac ® (produit de référence) de 40 ,12 % .

L'étude de l'activité antioxydant par le teste DPPH à révélé de l'extrait flavonoïque possède une activité antioxydante supérieure à celle de acide ascorbique soit 0.195 mg/ml,

Et en fin aucune toxicité aigue n'a été enregistrée pour toute les souris testées (**DL 50** est nulle).

Mots clé :

Artemisia herba alba Asso., extrait flavonoïque, CCM, Effet biologique, DPPH, DL 50 .

Abstract

In the framework of the characterization and the determination the toxicological effect and the biological activities of extract flavonoïc of *Artemisia herba alba* Asso., we carried out a study experimental of which which, the extraction liquid-liquid by the use of methanol like solvent gave an output of 0.366 %.

Screening chemical A highlights the presence of the polyphenolic substances (tanin gallic and flavonoïdes) and coumarins, however the total absence of the anthocyanes, Leucoanthocyanes, quinones, alkaloids, sénosides and glucides.

The identification of the components on plate CCM A show the presence of Apigénine (**flavones**) with a report/ratio frontal of 0.74.

The study of the antimicrobial activity of the flavonoïdes of *Artemisia herba alba* Asso. gave degrees of variable sensitivity going of **16 mm** for *P. aeruginosa* followed by **14 mm** for *S.aureus* and *E coli.*, and **11mm** for *B subtilis*, on the other hand two yeasts tested (*C albicans* and *Saccharomyce sp.*) they are resistances to the extract flavonoïc of *Artemisia herba alba* Asso.

Test anti-inflammatory drug with revealed that the extract flavonoïc of *Artemisia herba alba* Asso. managed by oral way, with an amount of 200 mg/kg with armature a reduction of left oedema of the legs posterior of the albino white mice of 34,96 %. This result is close to that of Diclofenac ® (reference product) of 40,12 %.

The study of the antioxydant activity by tests DPPH with revealed extract flavonoïc has an antioxydant activity higher than that of ascorbic acid is 0.195 mg/ml,

And in end no acute toxicity was recorded for all the mouse tested (**DL 50** is null).

Key words:

Artemisia herba alba Asso, Extract flavonoïc , CCM, Biological effect, DPPH, DL 50.

ملخص .

في إطار توصيف وتحديد الأثر التسممي والأنشطة البيولوجية لمستخلص الفلافونويدات لنبات الشيح قمنا بدراسة تجريبية و التي اظهرت.

الإستخلاص سائل – سائل بإستخدام الميثانول كمذيب أعطى مردود يقدر بـ 0.336 بالمئة .
الفحص الكيميائي يسلط الضوء على وجود البوليفينول (تنين قاليك والفلافونويدات) ، و الكومارين ، مع غياب
للأنتوسيان ، لوكوانتوسيان ، كينون ، ألكالويد ، سينوزيد والسكريات .
أظهر تحديد المكونات على لوحة الكروماتوغرافيا وجود مركب الأبيجينين مع تقرير جبهى يقدر بـ 0.74 .
دراسة النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص الفلافونويدات لنبات الشيح تظهر درجة حساسية متباينة 16 مم

بالنسبة ل *P. aeruginosa*

E.coli . و *S. aureus* ب 14 مم تليها *B. subtilis* ب 11 مم بالمقابل اظهر مقاومة للمستخلص المجرب

نوعي الخميرة المستخدمة *C. albicans* et *Saccharomyce sp.*

تجربة مضاد للإلتهاب لمستخلص الفلافونويدات المتناول عن طريق الفم بجرعة قدر ب 200مغ/مل تظهر تثبيط
الإلتهاب للطراف اليسرى للفئران ب 36.62 % بالنسبة للفئران البيضاء المستخدمة . هذه النتائج تقارب تاك ألسجله
باستخدام دي كلوفناك ب 40,12% .

سجلت دراسة نشاط مضاد الأكسدة لمستخلص الفلافونويدات بإستخدام DPPH نسبة تراجع تقدر بـ 0.195مغ / مل
والتي تظهر نشاط مضاد للأكسدة يفوق نشاط حمض الأسكور غبيك الذي سجل نسبة تراجع تقدر 0.26 مع / مل.
لم يتم تسجيل أي سمية حادة (DL 50) تساوي صفر بالنسبة لمجموعة الفئران المستخدمة .

كلمات المفتاح :

الشيح ، مستخلص الفلافونويدات ، لوحة الكورماتوغرافيا ، مفعول بيولوجي , DPPH . DL 50

Sommaire

	Page
Introduction	01
Chapitre I : Généralités sur l'<i>Artemisia herba alba</i> Asso	03
I-1- Répartition géographique	03
I-2- Classification botanique	03
I-3- Description botanique	04
I-4- Ecologie de la plante	06
I-5- Principaux constituants d' <i>Artémisia herba alba</i> Asso	07
I-6- Domaine d'utilisation	07
Chapitre II : Composés phénoliques	09
II-1 - Composés phénoliques	09
II-2- Définition	09
II- 3- Classification	10
II- 4 - Flavonoïde	11
II- 4-1- Définition	11
II- 4- 2- Structure	11
II- 4- 3 -Distribution et localisation	12
II- 4- 4 - Biosynthèse des flavonoïdes	12
II- 4- 5- Propriétés physico-chimiques	13
II- 4- 6 - Activités biologiques	14
Chapitre III : Matériel et méthodes	15
III-1- Matériel	15
III-1-1- Matériel non biologique	15
III-1-2- Matériel biologique	15
III-2 - Méthodes	17
III-2-1- Détermination de l'humidité dans la matière végétale	20
III-2-2 - Tests phytochimiques préliminaires	21
III-2-3 - Extraction et Analyses des flavonoïdes	24
III-2-4- Etude des activités biologiques	28
III-2-4-1- Evaluation de l' effet anti microbien « in vitro »	28
III-2-4-2- Mise en évidence de l'effet Anti-inflammatoire	31
III-2-4-3- Evaluation de l'activité antioxydante	34
III-2-4-4- Etude de la toxicité aiguë	37
Chapitre IV : Résultats et Discussion	39

IV-1- Tests phytochimiques	39
IV-2 - Humidité dans la matière végétale	40
IV-3- Rendement en flavonoïdes	40
IV-4 - Résultats de l'analyse des flavonoïdes par la CCM et interprétation.	41
IV-5 - Activité antimicrobienne	42
IV-6 - Effet Anti -inflammatoire	45
IV-7- Activité antioxydante	47
IV-8 - Etude de l'effet toxicologique « La toxicité aiguë »	49
Conclusion	50
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des tableaux

<i>Tableau</i>	<i>Page</i>
Tableau I : Localisation et caractéristique écologique de station d'étude	16
Tableau II : Liste des caractéristiques des souches utilisées pour l'évaluation de l'activités anti microbiennes	17
Tableau III : Résultats de l'étude phytochimiques	39
Tableau IV : Représentation des RF obtenus par CCM	41
Tableau V : Paramètre de calcule l'activité anti oxydante	48
Tableau VI : Résultat de l'effet toxicologique d'extrait flavonoïque	30
Tableau VII : Souche anti microbiennes utilisées	ANNEXCE I
Tableau VIII : Résultat de l'activité anti microbienne	ANNEXCE II
Tableau VX : Résultat de l'activité anti inflammatoire	ANNEXCE II
Tableau X : Résultat de l'activité anti inflammatoire	ANNEXCE II
Tableau XI : Résultat de l'activité anti oxydante	ANNEXCE II

Liste des figures

Figures

Page

Figure 1 : Touffe d'Armoise blanche	04
Figure 2 : Feuilles d'Armoise blanche.	05
Figure 3 : Fleurs d'Armoise blanche	06
Figure 4 : Principales classes des composées phénoliques	10
Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes	11
Figure 6 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes	13
Figure 7 : Etapes du protocole expérimental	19
Figure 8 : Etapes d'extraction des flavonoïdes	25
Figure 9 : Principe de méthode de diffusion par disque	29
Figure 10 : Réaction d'une anti oxydant DPPH	34
Figure 11 : Protocole de l'activité anti oxydante	36
Figure 1 2 : Résultat de CCM d'extrait flavonoïque <i>l'Artemisia herba alba</i> Asso.	41
Figure 13 : Diamètre des zones d'inhibition	42
Figure 14 : Résultat de l'activité anti microbienne d'extrait flavonoïque <i>d'Artemisia herba alba</i> Asso.	43
Figure 15 : Variation du poids des pattes postérieurs gauche et droites	45
Figure 16 : Variation de pourcentage d'œdème des pattes gauches et droites	46
Figure 17 : Variation de pourcentage de réduction d'œdème des pattes gauches et droite	46
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition de radicale DPPH	47
Figure 29 : Pourcentage de mortalité	49
Figure 20 : Poudre utilisées	Annexe II
Figure 2 1 : Appareille de DEAN et STARCK	Annexe II
Figure 2 2 : Rota – vapeur	Annexe II
Figure 2 3 : Extrait flavonoïque récupéré	Annexe II
Figure 24 : Cuve et plaqua CCM utilisé	Annexe II
Figure 25 : Dispositif UV	Annexe II
Figure 26 : Gavage d'extrait testé	Annexe II
Figure 27 : Injection de Carraghénine	Annexe II
Figure 28 : Résultat de l'activité anti oxydante	Annexe II

Les Abréviations

Abs : Absorbance

ATCC: American Type Culture Collection.

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

C.R.D : Centre de recherche et de développement

DL 50 : Dose Létale qui tue 50 pourcent de population

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2 Diphenyle-1-Picryl-Hydrazyle

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

GN : Gélose Nutritive

I % : Pourcentage d'inhibition

IC50 : La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire

IP : Intra parentérale

MH : Milieu Mueller Hinton

MO .C.LP : Mode Opérateur Commun Laboratoire Pharmacologie

MO.C.SN : Mode Opérateur Commun Substance Naturelle

NaCl : Chlorure de sodium

N. M. R. I. : Naval Medical Research Institut

O.N.A.B : Office National de l'alimentation du bétail

R: Rendement

Rf : Rapport frontal

SAB : Sabouraud

UV : Ultra Violet

v/v : volume par volume

INTRODUCTION

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (**FERRARI, 2002, BERUBE-GAGNON, 2006**)

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**)

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, ABDOLLAHI. et al., 2003**)

le lien entre consommation de flavonoïdes et prévention de cancer est encore faible. A l'inverse, plusieurs études ont démontré que la consommation d'aliments riche en flavonoïdes est inversement corrélée au risque de développer des maladies cardiovasculaires (**BALASUNDRAM ., 2006 , HOLLMAN., 2001**)

Cependant, le potentiel thérapeutiques des flavonoïdes pas encore établit à cause de la connaissance limitée de leur absorption chez l'homme. La biodisponibilité des flavonoïdes étant en générales assez faibles chez l'homme (**BRUNETON., 1999**) il est nécessaire d'être prudent quant à l'extrapolation des données in vitro.

L'Algérie, riche par sa biodiversité et son climat, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de molécules à effet biologique originaires des plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication.

Parmi les plantes aromatiques douées de propriétés curatives potentiellement intéressante qui occupent une surface peu attiens jusqu'à 4 millions d'hectares (**AYAD., 2008**), on a l'armoïse blanche l'*Artemisia herba alba* Asso. Il poussant dans les zones arides et semi-arides de l'Afrique du nord et du Moyen-Orient, et qui est très utilisée en médecine traditionnelle en Algérie pour nombreuses pathologies, (soulager le mal gastro-intestinal et vermifuge chez l'homme et le bétail) (**BOUGUETTAYA – DELIMIA., et al ., 2013**)

Toutes fois notre travail fait pour but de compléter les travaux qui été déjà faite par d'autre chercheurs (**BEN MANSOURE, 2013**) sur l'extrait alcoolique, aqueuse et les huile essentielle de l'*Artemisia herba alba* Asso.

Dans ce travaille, nos sommes intéressé particulièrement aux flavonoïdes *d'Artemisia herba alba* Asso. , après extraction de ce dernier quatre objectifs ont été tracées.

- ✓ *Identification des principaux composants chimiques d'Artemisia herba alba* Asso.
- ✓ *Extraction des flavonoïdes et détermination de leur rendement.*
- ✓ *Evaluation de ces activités biologiques (Anti - microbienne (in vitro), Anti – inflammatoire (in vivo) et Anti - oxydante par le test DPPH)*
- ✓ *Vérifier l'effet toxicologique d'extrait flavonoïque d'Artemisia herba alba* Asso.(in vitro)

Chapitre I
Généralité sur la plante

I -1 - Répartition géographique

L'*Artemisia herba alba* Asso. (Nom vernaculaires : Armoise blanche en français, Chih en arabe), est une plante vivace qui se caractérise par une odeur de thymol (GHARABI et SAND, 2008)

C'est une espèce Méditerranéenne et Saharo-Indienne (OZENDA, 1977). Très répandue sur les hauts-plateaux (DELLILE, 2007 ; OZENDA, 1991), plus rare au Sahara septentrional (Zousfana , El Goléa , Hamada de Tinghert) massifs du Sahara central, en altitude (au –dessus de 1400 m dans le Hoggar) (OZENDA,1991), Elle couvre près de 6 millions d'hectares (TRABUT, 1988).

I -2 - Classification botanique

La systématique d'*Artemisia herba alba* Asso. selon QUEZEL et SANTA, 1963.

Règne : végétales

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Angiosperme

Classe : Dicotylédones

Sous- classe : Gamopétales

Ordre : Astérales

Famille : Composées

Sous famille : Radiées

Genre : *Artemisia*

Espèces : *Artemisia herba alba* Asso.

L'*Artemisia herba alba* Asso. a été découverte en Algérie en 1779 par le botaniste Asso. Elle est connue en Algérie sous les noms de: Chih, Ifsi, Zezzare, Izri et Armoise blanche (QUEZEL et SANTA , 1963).

I -3 - Description botanique

L'armoise blanche se présente sous la forme buissons très ramifiés de 30 à 80cm de hauteur (DELLILE, 2007), ligneuse qui se développe en touffes bien individualisées mesurant en moyenne entre 30 à 40 cm de diamètre. (AIDOU, 1984) (Figure 1)

La croissance végétative de l'*Artemisia herba alba* Asso. à lieu en automne, la floraison commence en juin et se développe essentiellement en fin d'été. (GHARABI et al., 2008)



Figure 1: Touffe d'Armoise blanche (PHOTO ORIGINALE. 2014)

- **Système racinaire**

Le système racinaire est très dense à la surface, il peut atteindre un étalement latéral de 50 cm au maximum (LE FLOCH, 1989). Grâce à ce système racinaire, l'armoise blanche est capable de valoriser toute l'humidité superficielle occasionnée par les faibles pluies et d'exploiter l'eau du sol jusqu'à 50 cm de profondeurs (FLORET et al., 1982)

- **Feuilles**

Ses feuilles sont blanches, laineuses (OZENDA, 1991), en des petites languettes d'un vert argenté. Lors du développement des premières feuilles, leur taille est relativement grande mais au fur et à mesure que les rameaux s'allongent, les feuilles deviennent plus en plus petites à l'extrémité (AIDOU, 1984) (Figure 2)

- **Fleurs**

Les fleurs sont hermaphrodites, emballés dans des petits capitules de 1.5 à 3 mm de diamètre, de couleurs jaunes à rougeâtre (Comprenant chacun de 3 à 8 fleurs).Elles sont groupées en grappes (GHARABI *et al.*, 2008 ; BEZZA *et al.*, 2010 ; GASTON , 1990). La floraison de l'*Artemisia herba alba* Asso. débute le plus souvent en juin mais les fleurs se développent essentiellement à la fin de l'été (NABIL, 1989) (Figure 3)

- **Graine**

C'est un akène allongé à division longue étroite et espacée. Son odeur est très forte, aromatique, d'une saveur amère (DELLILE, 2007).



Figure 2 : Feuille d'Armoise blanche. (PHOTO ORIGINALE. 2014)



Figure 3 : Fleurs d'Armoise blanche (PHOTO ORIGINALE. 2014)

I- 4 - Ecologie de la plante

L'*Artemisia herba alba* Asso. est une plante très connue en Afrique du nord, au Moyen-Orient, en Espagne, en Egypte, en Asie Occidentale, en Chine, en Russie et en Californie. Elle affectionne les climats secs et chauds, et elle forme des peuplements importants dans les zones arides (TRABUT, 1988), Avec une pluviométrie moyenne de 200 à 300 mm en hiver (AIDOU, 1988).

Concernant les facteurs édaphiques, les groupements d'*Artemisia herba alba* Asso. colonisent les dépressions non salées et les glacis à sol généralement limoneux, peu perméables à ruissellement important. La texture la plus répandue d'armoise blanche est plutôt limono-sableuse, se trouvant dans les sols superficiels (inférieures de 20 cm de profondeur) avec un taux très faible d'éléments grossiers en surface et une salure très faible à nulle (POUGET, 1980) .

En Algérie, l'armoise blanche est très répandue aux hauts plateaux (QUEZEL et SANTA, 1963), mais elle est rare dans le tell Algérien, elle est rencontrée dans le sahels et les plaines du littoral ainsi que dans le tell constantinois (OZENDA, 1983).

I- 5 - Principaux constituants

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de l'*Artemisia herba alba* Asso., les plus importants sont les sesquiterpènes lactones. D'autres études ont été portées sur les flavonoïdes et l'huile essentielle.

La gamme des sesquiterpènes lactones a été trouvée dans les parties aériennes de l'*Artemisia herba alba* Asso. les Eudesmanolides suivies par Germacranolides semblent les types les plus abondants dans cette espèce (AHMED *et al.*, 1990 ; BORIKY *et al.*, 1996).

Les flavonoïdes détectés dans l'*Artemisia herba alba* Asso. montrent aussi une diversité structurale allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et favonols) jusqu' aux flavonoïdes méthyles qui sont très inhabituels (SALEH *et al.*, 1985 ; SALEH *et al.*, 1987).

Les flavonoïdes glycosides comprennent des O-glycosides tels que quercitrine-3-glucoside, mais aussi des flavones C-glycosides qui sont rares dans le genre *Artemisia*, ainsi que dans l'ensemble des Asteracées.

Parmi les composants les plus importants des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso. on trouve les monoterpènes tels que le 1,8-cineole et le terpène 4 ol (FEUERSTEIN *et al.*, 1986), des santonines, des coumarines, des triterpènes pentacycliques et des tanins (GHARABI *et al.*, 2008).

I-6- Domaine d'utilisation

A- En pharmacie

Traditionnellement, cette espèce est utilisée pour traiter les problèmes gastriques. Elle présente un vermifuge très prise pour le bétail et possède une activité anti-helminthique. (NEGRE, 1962).

Les principaux modes d'utilisation d'armoise blanche sont : l'infusion, la macération, la décoction et l'inhalation ou pour parfumer le thé et le café. (BABA AISSA , 1991)

Elle peut être employée comme apéritif, diurétique, stimulant de la digestion car elle est douée d'une propriété stomachique

En Chine, dans plusieurs pays européens et en Algérie, elle est employée en usage externe dans le traitement du rhumatisme, de la goutte, des aphtes, des mycoses et contre les piqûres des insectes et des scorpions (BABA AISSA, 1991) .

L'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* Asso. a un effet antidiabétique. (HAOUARI, 2009), les feuilles sont utilisés en médecine traditionnelle pour soigner la bronchite et les abcès. (AKROUT, 2004).

B- En cosmétique

Les huiles essentielles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers, ils ont donné naissance à une branche nouvelle de phytothérapie : « L'aromathérapie ». (BRUNETON, 1999).

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

Chapitre II
Les composés phénoliques
Et
Les flavonoïdes

II-Composés phénoliques

II-1-1- Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolite secondaire des plantes, largement distribués (**BAHORUN, 1997**), localisés dans différentes parties des plantes. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal.

Les polyphénols sont des substances hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, ces métabolites secondaires sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (**SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006**).

II-1-2- Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent un ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles (**SALUNKHE, 1990**).

Les polyphénols naturels sont des molécules simples (acides phénoliques) et des composés hautement polymérisés (les tanins). Il existe différentes classes de polyphénols (**Figure 5**), les plus importants sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**FLEURIET *et al.*, 2005**).

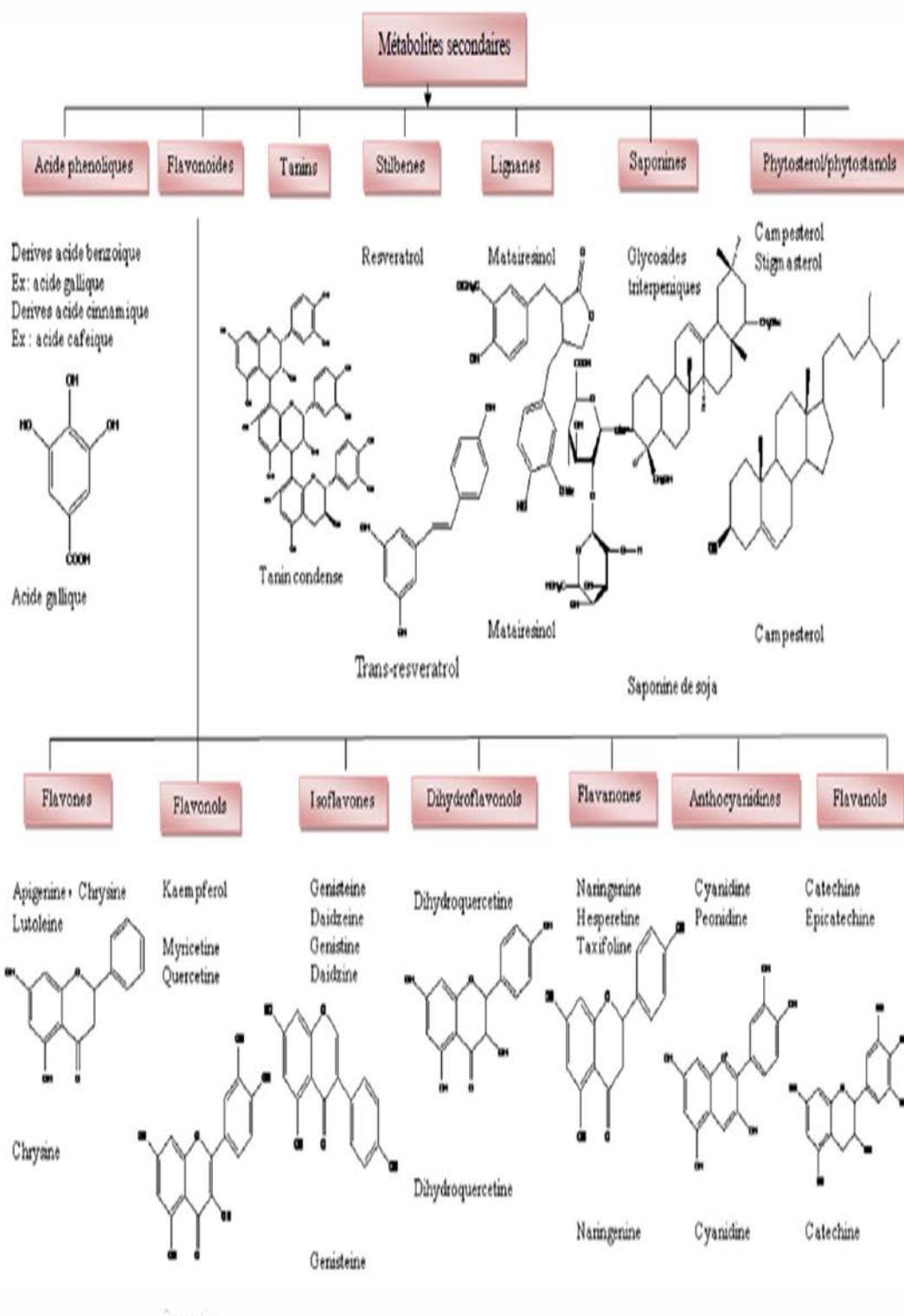


Figure 5 : Principales classes des composés phénoliques (FLEURIET *et al.*, 2005)

II - 2- Flavonoïde

II-2-1- Définition

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols. Le nom flavonoïde est dérivé du mot « flavus » en latin, qui signifie jaune (BRUNETON, 1993).

Ce sont des molécules ayant un rôle de métabolites secondaires chez les plantes. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes (HARBONE, 1975). Plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 10^9 tonnes par an, sont converties en flavonoïdes (AGRAWAL, 1989).

I-2-2- Structure

Flavonoïde (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6), le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Figure 6) (GROTEWOLD, 2006).

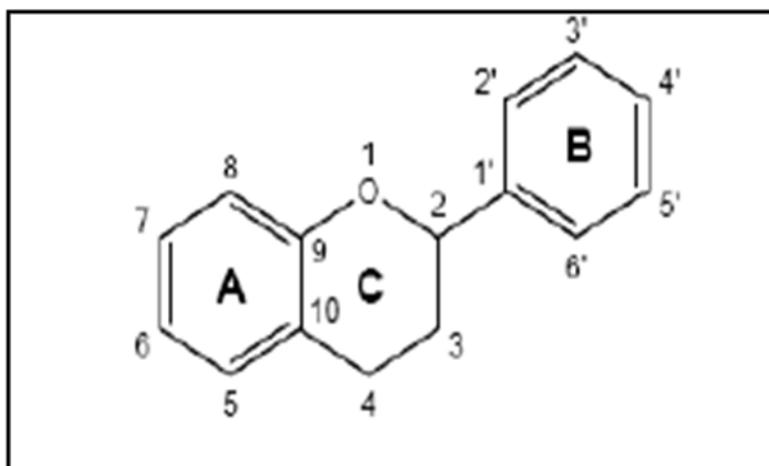


Figure 6: Structure de base des flavonoïdes. (KRISHNA *et al.*, 2001)

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- γ -pyrane) mais du point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié. Se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines , flavonoles , isoflavonoles , flavones , isoflavones , flavanes , isoflavane , flavanols , isoflavanoles , flavanones, isoflavanones , aurones (**HAVSTEEN, 2002**) .

II-2-3- Distribution et Localisation

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois (**HARBORNE *et al.*, 1975**).

Ils sont quasiment absents chez les algues. Il apparaît chez les bryophytes, chez les fougères et les gymnospermes, ils sont présents mais leur variété structurale est faible. Par contre, ils sont largement représentés chez les angiosperme ou leur diversité structurale est maximale (**RAKIPOV, 1987**), on les trouve aussi en abondance dans les Polygonacées, Apiacées, Rutacées, et les Légumineuses (**MILANE, 2004**).

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes est hydrosolubles, s'accumulent dans les vacuoles dans certaines espèces ils se concentrent dans l'épiderme des feuilles, et dans d'autres espèces, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques des fleurs et dans la cuticule épidermique des fruits (**BRUNETON, 1993**).

I-2-4 - Biosynthèses des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, dérivant de la voie de l'acide shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate – coenzyme A synthétisé à partir de la phénylalanine ((**BRUNETON, 1999 ; KRISHNA *et al.*, 2001**)). la voie de biosynthétique de ces polyphénols est présentée dans la figure suivant **7**.

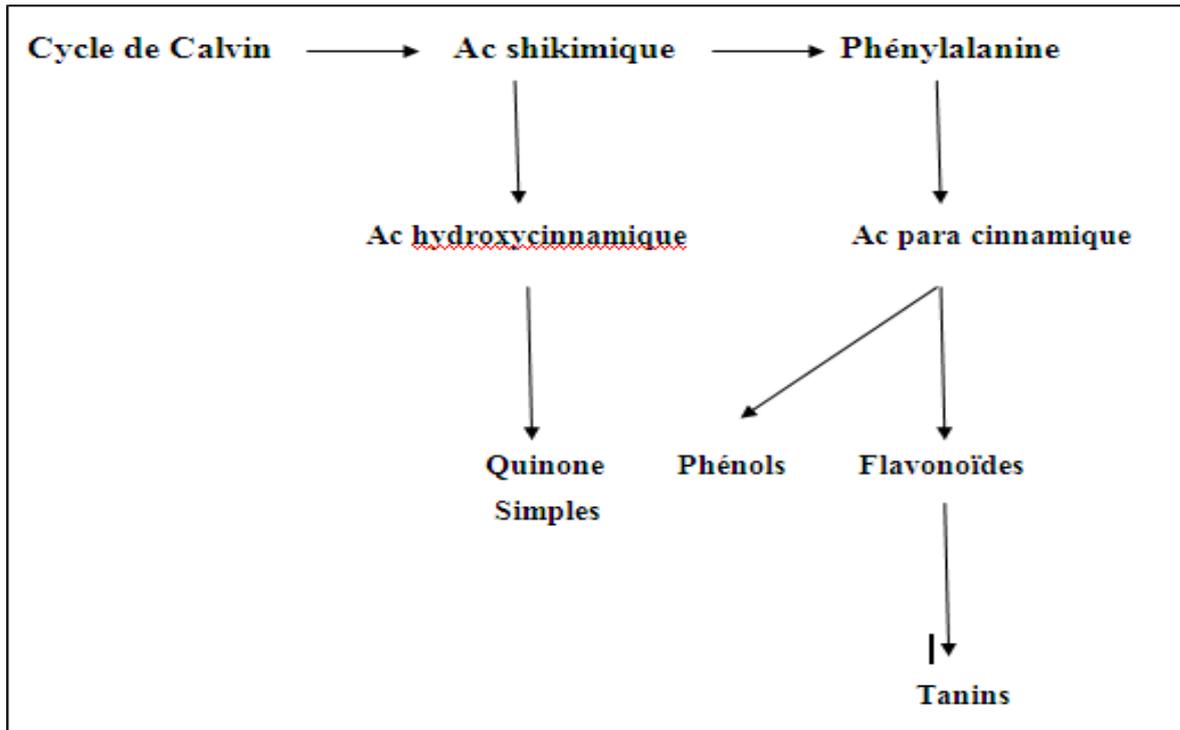


Figure 7 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes (BRUNETON, 1999)

I-2-5 - Propriétés physico-chimiques

a- Solubilité

La solubilité des flavonoïdes dépend, en grand partie, de nature et du nombre des substituants : plus le nombre d'hydroxyles libre est élevé, plus ils sont solubles dans les solvants polaires et vis versa.

En règle générale, les hétérosides sont solubles dans les alcools et l'eau, par contre les aglycones sont solubles dans les solutions aqueuses d'hydroxydes alcalins (BRUNETON, 1999).

b- Couleur et propriétés spectrales

Selon JAAKOLA *et al.*, (2002), Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, auronnes, flavonoles jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets.

Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments tel que le cas des flavones et des flavonoles incolores (**BRUNETON, 1999 ; SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006**).

Des étapes ultérieures, surtout de glycosylation et d'acylation, amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent *in vivo* (**UILA et HEIKKI, 2006**).

Les flavonoïdes possèdent un spectre d'absorption dans l'ultraviolet avec généralement deux maximums caractéristiques variant avec type flavonoïque et permettant leur identification (**BRUNETON, 1999 ; RIBEREU-GAYON, 1968**).

I-2-6- Activités pharmacologiques

Les flavonoïdes sont connus pour leur action antioxydante et leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux, antispasmodiques, anti-sécréteurs et anti diarrhéiques, peuvent être aussi : diurétiques (**BRUNETON, 1999**). Analgésiques (**GONZALEZ-TRUJANO *et al.*, 2007**). Antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, cardioprotective et vasodilatatoire (**MIDDLETON *et al.*, 2000 ; KSOURI *et al.*, 2007**).

Leurs effets bénéfiques ont été décrits pour le diabète et le mal de tête (**VAN ACKHER *et al.*, 1998**).

Quelques flavonoïdes montrent également une variété d'effets biologiques tels qu'anti inflammatoire, anti-allergique, ainsi que la capacité de stimuler le système immunitaire (**MERKEN et BEECHER, 2000**).

Des articles de synthèse concernant leur mécanisme d'action (la relation structure-activité liée à la fonction antioxydante, notamment, a été établie et leurs utilisations thérapeutiques potentielles ont été publiées ces dernières années (**HENNEBELLE *et al.* 2004 ; LHUILLIER, 2007**).

De nombreuses preuves ont été apportées sur l'importance des effets *in vitro* des flavonoïdes sur différents modèles biologiques et, en particulier, enzymatiques : inhibition de l'histidine-decarboxylase par le quercétol ou la naringénine ; inhibition de l'élastase ; inhibition de la hyaluronidase, par les flavones et surtout par les proanthocyanidols (**BRUNETON, 1999 ; HAVSTEEN, 2002**).

Chapitre III

Matériel

Et

Méthodes

Dans le cadre de la caractérisation et la détermination de l'effet toxicologique et les activités biologiques d'*Artemisia herba alba* Asso. Connue sous le nom de l'Armoise blanche, nous avons effectué une étude expérimental au sein des laboratoires des substances naturelles, microbiologiques et pharmaco toxicologique du Centre de Recherche et Développement Scientifique du Groupe SAIDAL (CRD) durant une période de 6 mois (du mois de Mars jusqu'au mois Août 2014).

Durant notre stage, nous avons déterminé quelque activités pharmacologiques et toxicologiques de l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso.

Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons utilisé différents protocoles par l'utilisation des techniques scientifiques modernes.

III-1 Matériel

III-1-1 Matériel non biologique

Appareillage, verrerie, Réactifs et préparations (ANNEXE I)

III-1 -2 Matériel biologique

A-Matériel végétal

✚ Identification botanique de la plante

L'identification des parties aériennes d'*Artemisia herba alba* Asso. est faite par deux docteurs en phytothérapie respectivement **Dr : NASLEDJE S.** Professeur à l'université de Sétif, et **Dr : MAHMODI Y.** Médecin phytothérapeute à Blida.

✚ La récolte

Nous avons réalisé notre récolte durant le mois d'Avril dans la région de **BORDJ BOU ARRERIDJ.**

La localisation géographique et les caractéristiques écologiques de la station d'étude sont représentées dans le tableau I.

Tableau I : Localisation et caractéristiques écologiques de la station d'étude (Données par la station météorologique d'Alger)

Station	Localisation	Latitude	Longitude	Altitude(m)
Bordj Bou Arreridj	Semi -aride	36°04	04°40 EST	928 m

Séchage

La matière végétale a été séchée à température ambiante, à l'abri de la lumière afin d'éviter la photo- oxydation des substances, et dans un endroit bien aéré pour éviter les moisissures (GUIGNARD., 2000 ; DELLILE., 2007) (pendant 25 jours).

Le broyage a été réalisé à l'aide d'un moulin électrique, et la conservation de la poudre obtenus dans des bouteilles en verre hermétiquement fermées (**Figure 21, Annexe II**)

B - Animaux

Les activités pharmacologiques et toxicologiques de l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. sont effectuées au niveau du laboratoire de pharmaco-toxicologique du CRD -SAIDAL.

Nous avons réalisé nos essais sur des souris blanches de race NMRI de poids moyen \pm 20g de sexe mâle et femelle.

Ces souris étaient maintenues dans les mêmes conditions d'hébergement (température de laboratoires $25\pm 2^\circ\text{C}$, Eclairage : 10 h) tout en ayant un accès Libre à l'eau de robinet et à la nourriture (granulés « O.N.A.B ») **Figure 22, Annexe II.**

C - Micro-organismes

L'étude antimicrobienne a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie du CRD SAIDAL, nous avons utilisé 6 souches microbiennes de référence citées dans le tableau **II.**

Tableau II : Liste des caractéristiques des souches de références utilisées pour l'évaluation de l'activité anti microbienne.

Nom de la souche	N° ATCC	Famille	Gram
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	Bacillaceae	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Micrococcaceae	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Pseudomonadaceae	-
<i>Escherichia coli</i>	4157	Enterobacteriaceae	-
<i>Candida albicans</i>	24433	Cryptococcaceae	
<i>Saccharomyces sp</i>	2601		

III-2 Méthodes

Pour réaliser cette étude, nous avons suivi plusieurs méthodes.

- ❖ L'étude phytochimiques de la poudre de la partie aérienne de *l'Artemisia herba alba* Asso. : Par technique colorimétrie (**MO.C.SN.008**).
- ❖ L'extraction des flavonoïdes d'*Artemisia herba alba* Asso. : par la méthode d'extraction liquide –liquide (**MO.C.SN.009**).
- ❖ La chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait flavonoïque fait selon (**MARTINI et SEILLER , 1992**)
- ❖ Etude de l'activité anti -microbienne : par technique d'Aromatogramme qui été déjà utilisé par **CHAO et al., 2000 ; OZCAN et al., 2003**.
- ❖ Etude de l'activité anti inflammatoire d'extrait flavonoïque a été réalisée selon la méthode de Levy, cité par (**WINTER et al., 1962**).
- ❖ Evaluation de l'activité anti- oxydant par un test (test de DPPH (**KIM et al., 2003**))
- ❖ La toxicité aiguë de l'extrait flavonoïque fait selon Protocole de CRD. (**MILLER et TAINTER, 1944**)

Les différentes étapes de ce travail sont résumées dans la figure suivante :

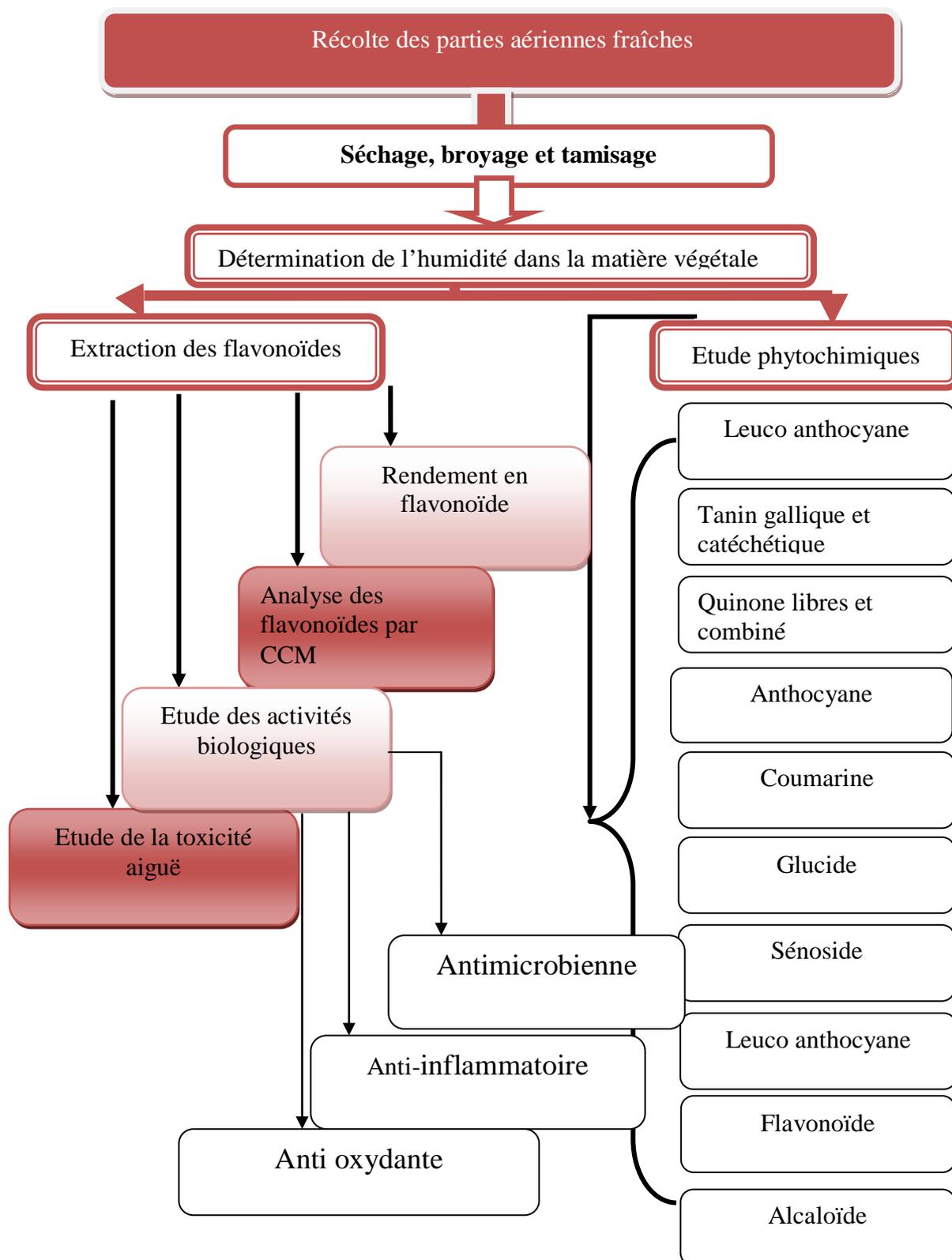


Figure 8 : Etapes du protocole expérimental

III-2- 1- Détermination de l'humidité dans la matière végétale

L'humidité est la teneur en eau dans la matière végétale sèche, elle est l'un des paramètres importants qui caractérise la bonne qualité de celle-ci, selon la norme de la Pharmacopée européenne les plantes médicinales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité qui dépasse (**12 à 15%**), car une grande quantité d'humidité provoque une décomposition des substances actives par des micro-organismes.

- **Principe**

La méthode consiste à séparer l'eau des substances hydrophobes par dissolution de celles-ci dans le solvant organique (toluène) non miscible à l'eau et à mesurer le volume d'eau dégagé par chauffage après condensation dans un tube gradué.

- **Mode opératoire (M.O.C.SN.002)**

Pour déterminer le taux d'humidité, on utilise l'appareil de DEAN et STARCK (**Figure 23, ANNEXCE II**), le réactif utilisé est le toluène ; on procède de la manière suivante :

On immerge 10,0829 g de matière végétale dans 100ml de solvant (toluène), dans un ballon de 500ml, On surmonte le ballon d'un réfrigérant, ce dernier est muni d'un tube collecteur gradué, on le porte à ébullition (2 à 3 gouttes par secondes) jusqu'à ce que la plus grande partie de l'eau soit entraînée (niveau d'eau constant dans le tube collecteur).

Avant qu'on n'arrête l'expérience, on augmente le chauffage afin de récupérer toutes les gouttes d'eau disposées sur les parois du réfrigérant, on laisse refroidir le tube collecteur à température ambiante, on lit le volume d'eau lorsque l'eau et le toluène sont séparés.

On calcule le taux d'humidité de la matière végétale à l'aide de la formule suivante :

$$H (\%) = [(V \cdot 0,998)/G] \cdot 100$$

H : Le taux d'humidité ou teneur en eau en %

G : La prise d'essai en g (matières végétales)

V : Le volume d'eau lu en ml

0.998 : Densité d'eaux

III-2-2 - Tests phytochimiques préliminaires (M.O.C.SN.008)

Ces tests ont pour but de connaître la composition en métabolites secondaires de l'*Artemisia herba alba* Asso. Ils sont effectués, soit sur la poudre (broyat), soit sur l'infusé.

La caractérisation des substances chimiques bioactives met en Œuvre des réactions en tube soit par précipitation soit par coloration pour l'identification des différentes substances chimiques existantes dans la plante.

Ces tests sont effectués sur l'infusé des parties aériennes de l'*Artemisia herba alba* Asso. Dans le laboratoire des substances naturelles du groupe SAIDAL suivies de leur protocole (BRUNETON, 1999 ; Pharmacopée URSS, 1983)

A- Préparation de l'infusé d'*Artemisia herba alba* Asso.

But

Extraction des substances bioactives solubles dans l'eau.

Principe

La préparation de l'infusé est réalisée par additionnement de 15g de poudre à 100 ml d'eau distillée bouillante, puis on laisse le mélange à Infuser pendant 30 minutes avec agitation de temps en temps.

Puis on filtre à l'aide d'une gaz, le filtrat est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée, ensuite il est mis dans des petits flacons en verre.

B- Les analyses qualitatives

✚ Les phénols

a- Les anthocyanes

Quelques gouttes d'ammoniaque 1/2 sont ajoutées à 5 ml d'infusé.

- La réaction donne une coloration bleue en présence des anthocyanes.

b- Les leuco-anthocynes

2 g de poudre végétale sont additionnées à 20 ml d'un mélange de propanol / acide chlorhydrique (v/v), ensuite le mélange est placé dans un bain marie bouillant pendant quelque minutes.

- Une coloration rouge se développe en présence des leuco-anthocyanes

c- Les flavonoïdes

5 ml d'infusé sont additionnés à 5 ml d'acide chlorhydrique concentré à 97% (HCl), un copeau de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique

- En présence des flavonoïdes, la phase organique est rouge orangé

d- Les tannins

Quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 5% sont ajoutées à 5ml de l'infusion.

- La réaction donne une coloration bleue noire en présence des tannins.

❖ Les tannins galliques

Après filtration et saturation du filtrat, on prend 15 ml d'infusé, on rajoute 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 à 5%.

- La réaction est positive lorsque la coloration bleu foncé apparaît.

❖ Les tannins catéchéiques

15 ml d'infusé soit additionnés à 7 ml de réactif de stiansy.

- En présence des tannins catéchéiques, on obtient une coloration rouge.

✚ Les dérivés quinones

❖ Quinones libres

2g de poudre végétale humectés par 2 ml d'acide chlorhydrique N à 97 % , sont mises en contact pendant 3h dans 20 ml de chloroforme puis filtrer le mélange.

Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque 1/2.

- La formation d'une coloration rouge présence des quinones libres.

❖ Quinones combinés

2 g poudre végétale sont additionnées avec 5 ml d'acide sulfurique N et porter à reflux pendant 2 heures.

La solution extractive est filtrée puis épuisée par 20 ml de chloroforme .Cette solution chloroformique est évaporée à sec puis épuisée par l'Ammoniaque (1/2).

- La réaction donne une coloration rouge en présence des quinones combinées.

✚ Les alcaloïdes

5 g de poudre végétale humectée avec 50 ml d'ammoniaque (1/2), sont macérées pendant 24 heures dans 50 ml d'un mélange éther – chloroforme (3v/1v) Le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2 N.

Des réactions de précipitation sont effectuées sur la solution chlorhydrique en présence d'alcaloïde, le réactif de dragendorff donne un précipite rouge

✚ Les senosides

Dans une fiole, mettre 2.5 g de poudre végétale, puis rajouter 50 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (à 97%), le mélange est chauffé dans un bain marie pendant 15 min .Après refroidissement agiter avec 40 ml d'éther.

La couche éthéré est séparée et séchée avec le sulfate de sodium anhydre, ensuite évaporer à siccité.

Au résidu refroidi, rajouter 5 ml d'Ammoniaque diluée (1/2) .Elle se développe une coloration jaune ou orange.

Le chauffage de cette solution au bain marie pendant 2 min donne une coloration violette rouge en présence des sénoside.

✚ Les glucosides

Quelques gouttes de l'acide sulfurique N sont ajoutées à 2 g de poudre végétale.

- La réaction donne une coloration rouge brique ensuite violette à la présence des glucosides.

 **Les coumarines**

Faire bouillir à reflux 2g de poudre dans 20 ml d'alcool éthylique (éthanol) pendant 15 min puis filtrer.

A 5 ml du filtrat rajouté 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'HCl à 10% (acide chlorhydrique).

- La formation d'un trouble indique la présence des coumarines.

III-2-3- Extraction et analyse des flavonoïdes

III-2-3- 1- Extraction des flavonoïdes (MO.C.SN.009)

Les flavonoïdes sont extraits à partir de poudre d'armoise blanche et à l'aide d'un alcool (méthanol). On met 30g de la poudre végétale dans 200 ml de méthanol et on laisse macérer pendant 72 heures.

Après filtration à l'aide d'un papier filtre, l'extrait méthanolique doit être évaporé (par rota- vapeur) et le reste doit être traité par 50 ml d'eau chaude. (**Figure 24, ANNEXCE II**)

Après refroidissement, on met en œuvre une série d'extraction liquide- liquide par des solvants non miscibles à l'eau : le chloroforme (trichlorométhane) qui élimine les composés

non polaires (chlorophylle, lipide,...etc), puis l'éther di éthylique qui extrait les génines libres, ensuite l'acétate d'éthyle qui entraîne les monosides, et par le butanol qui entraîne la majorité des hétérosides (biosides, triosides,...etc.)

Les différentes étapes de l'extraction des flavonoïdes sont illustrées dans le schéma suivant.

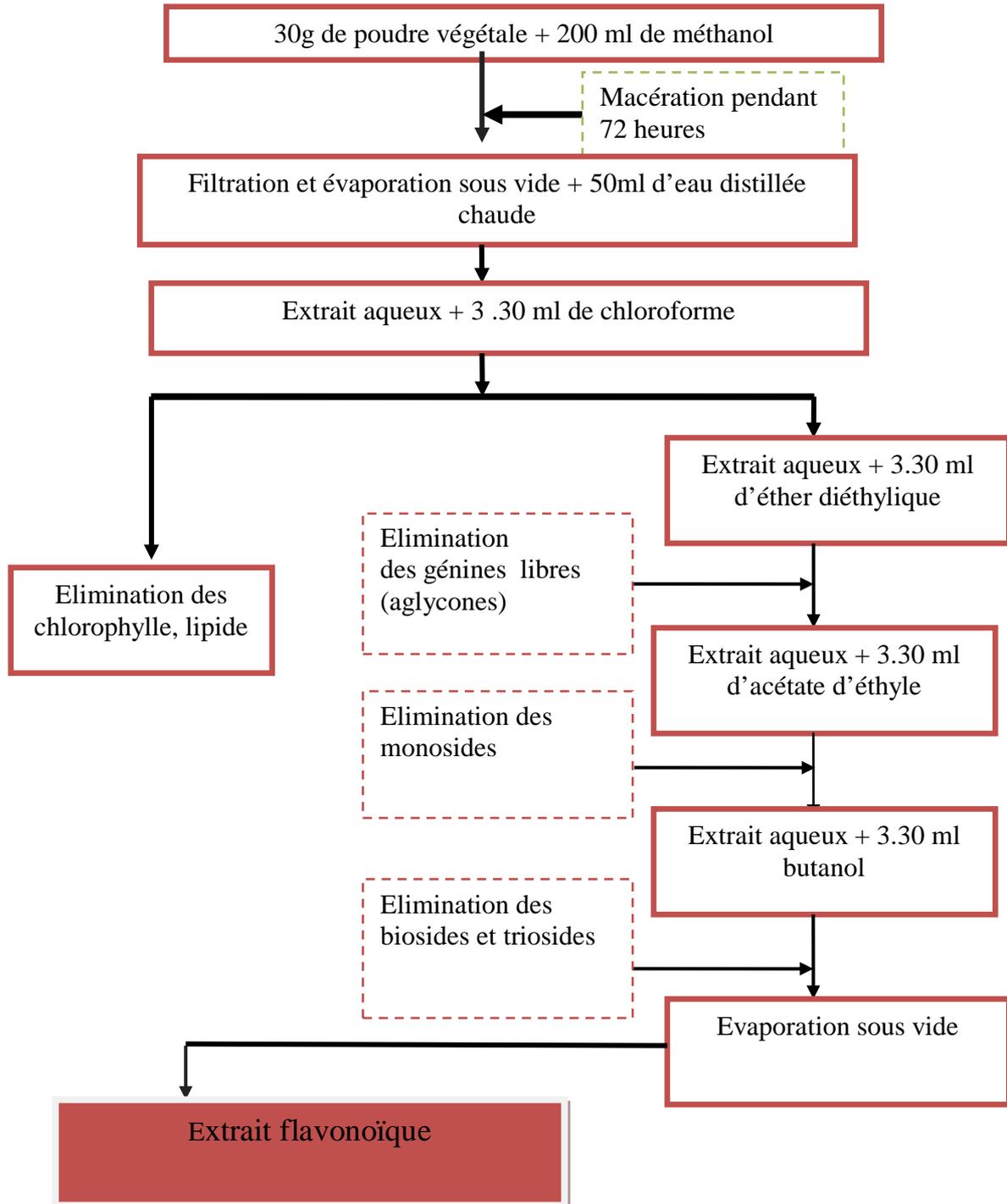


Figure 9 : Etapes d'extraction des flavonoïdes

III-2-3-2- Détermination du rendement des flavonoïdes

Le rendement des flavonoïdes est calculé par la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{Masse du (ballon + extrait)} - \text{masse de ballon vide. } 100}{\text{Masse de la prise en d'essai}}$$

III-2-3-3- Analyse d'extrait flavonoïque par la chromatographie sur couche mince (CCM)

- **Principe de la chromatographie**

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique qui permet de séparer différents composés d'un mélange homogène et de les identifier. Elle permet également de vérifier la pureté d'une substance.

Le mélange homogène, véhiculé par un solvant inerte appelé éluant, compose la phase mobile qui progresse par migration dans un milieu poreux inerte constituant la phase fixe (PIERRON, 2011).

- **Mode opératoire**

- **Chambre de développement (cuve) utilisée**

Un récipient habituellement en verre, de forme variable, son fond formé par deux gouttières, fermé par un couvercle étanche après avoir verser l'éluant dans le récipient; fermer le couvercle et laisser reposer pendant 30 min pour que le système se sature de vapeur de solvant (VERNIN, 1970). La qualité de la cuve ne saurait être négligée car elle peut avoir une influence sur le degré de séparation (MERCIER, 1983).

➤ Phase stationnaire

Elle est formée d'une couche d'environ 0,25 µm de gel de silice (60 F₂₅₄) coulée sur un support en aluminium ou en verre de 20x20 cm.

La plaque est activée après un passage à l'étuve à 105°C pendant 15 min pour libérer les pores de la plaque, un trait est tracé à 1 cm de bord inférieur pour marquer le départ, un second trait est tracé à 10 cm du premier trait (trait inférieur).

Après avoir préparé la plaque, on dépose 30 µl de notre extrait flavonoïque et les extraits de références (**Apigénine, Quercétine, Lutéoline**), après que la plaque est déposée dans la cuve, on ferme le couvercle, le solvant va migrer jusqu'à atteindre le trait supérieur (environ 2 heures).

➤ Phase mobile pour séparer les flavonoïdes par CCM

La phase mobile que nous avons utilisé est un mélange de :
10 ml de l'eau distillée, 30 ml de l'acide acétique et 3 ml de l'Acide chlorhydrique concentré (97 %). Après que le solvant parcourt une distance de 10 cm, la plaque doit être levée, séchée sous la hotte (**MARTINI et SEILLER., 1992**). (**Figure 26, ANNEXCE II**)

➤ Révélation physique sous UV

La révélation physique se réalise à la lumière UV 360 nm afin de détecter les taches fluorescentes. Le facteur de rétention (R_f) est calculé à partir du centre de ces spots. (**Figure 27, ANNEXCE II**)

➤ Révélation chimique

On pulvérise ensuite du chlorure d'aluminium en solution (FeCl₃) à 5 % dans du méthanol. On attend 10 minutes, puis on observe à nouveau sous UV.

Les taches correspondant aux Flavones et aux flavonols apparaissent alors dans une couleur pouvant aller du jaune verdâtre pâle à l'orange. Les taches colorées sont entourées au crayon (MARTINI et SEILLER, 1992).

- **Facteur de rétention (Rf)**

Pour que l'interprétation des chromatogrammes en CCM soit possible, il est nécessaire de calculer le **Rf** qui est déterminé par le rapport de distance après migration et la distance du front de solvant.

Le calcul de Rf (Retardation Factor ou facteur de rétention) se fait par la formule suivante :

$$\mathbf{Rf = Di / D}$$

Di : La distance parcourue par le composé.

D : La distance parcourue par le front du solvant.

III-2-4 - Etude des activités biologiques

III-2-4-1- Evaluation de l'activité anti microbienne de L'extrait flavonoïque « *in vitro* »

III-2-4-1-1- Etude qualitative : détermination de l'effet inhibiteur de l'extrait flavonoïque.

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. , nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose appelés Antibiose. Les tests ont été réalisés au niveau du CRD – SAIDAL.

La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée auparavant par la Pharmacopée Européenne, 2002 et par plusieurs chercheurs (CHAO *et al.*, 2000 ; OZCAN *et al.*, 2003).

- **Principe**

La méthode d'Aromatogramme consiste à déposer un disque stérile en cellulose (dans notre cas : disque de 9 mm de diamètre) imprégné d'une quantité bien définie de l'extrait flavonoïque à tester sur la surface d'une boîte de pétri et ensemencée avec le micro-organisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre « en mm » de la zone claire autour du disque, appelée : la zone d'inhibition (**Figure 10**).

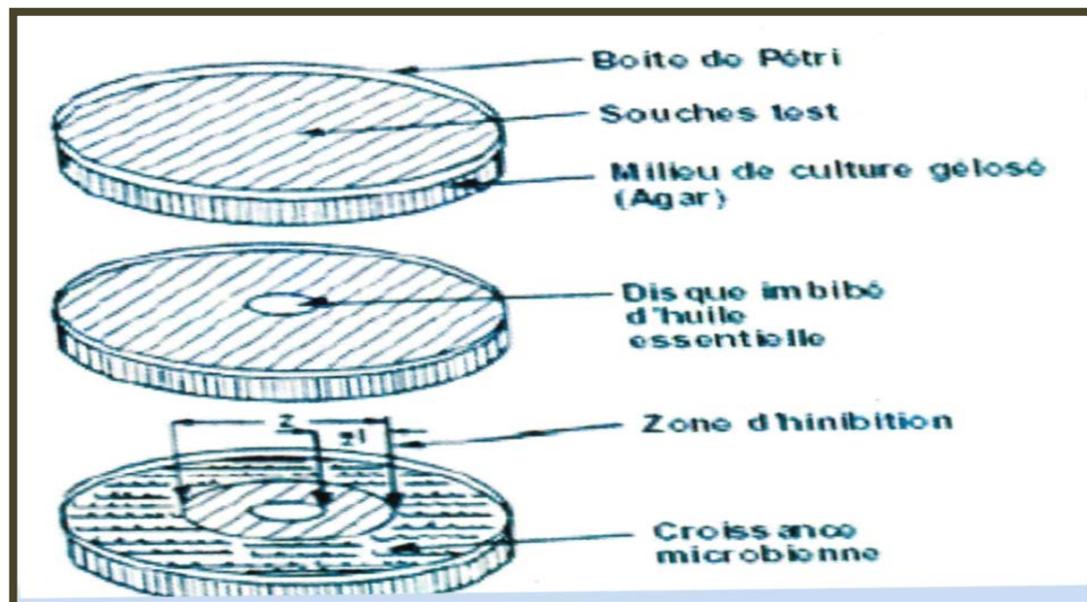


Figure 10 : Principe de la méthode de diffusion par disque (PIBIRI, 2006)

- **Mode opératoires**

- ❖ **Préparation de la première couche de milieu**

On fait fondre les milieux Mueller – Hinton (MH) et Sabouraud (SAB) dans un bain marie à 95°C, après on verse aseptiquement une première couche des deux milieux.

Dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier sur paillasse.

❖ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18 h pour les bactéries et de 48h pour les levures, on a réalisé des suspensions troubles en prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex.

On réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm. On estime la densité optique qui doit être 0.5 pour la bactérie et 1.5 pour les levures. Les valeurs citées ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 à 10^8 germe / ml pour les bactéries.

Si une des valeurs de la densité optique trouvée à la première lecture n'est pas comprise aux valeurs citées, on l'ajuste notre inoculum soit, en ajoutant de l'eau physiologique (NaCl à 9%), si elle est inférieure en ajoutant des colonies.

A chaque fois une nouvelle lecture est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé suivant sa préparation.

❖ Préparation de deuxième couche du milieu

On fait fondre les deux milieux Mueller – Hinton (MH) et Sabouraud (SAB), on les laisse refroidir jusqu'à une température de 45°C et on transvase 50 ml de chaque milieu dans des flacons stériles. On ensemence les milieux avec 200 µl de chaque suspension et on agite manuellement, puis on dépose rapidement 4 ml de chaque milieu ensemencé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée.

On étale immédiatement la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et on laisse solidifier sur la paillasse.

❖ **L'extrait utilisé**

Pour l'étude de l'activité anti microbienne, l'extrait flavonoïque utilisées à l'état pur dans la technique de l'aromatogramme.

❖ **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, on mit en contact le disque stérile et l'extrait testé, le disque est imbibé par capillarité, et posé sur la surface de géloseensemencée, on laisse diffuser pendant 30 min. Et enfin, incubé à 37°C pendant 24h pour les bactéries, et 25 °C pendant 48 h pour les levures.

❖ **Lecture des résultats**

- *zone claire autour du disque* : présence d'une activité inhibitrice de l'extrait flavonoïque .
- *Absence de zones claires autour du disque* : pas d'effet inhibiteur de l'extrait flavonoïque.

La comparaison de nos résultats avec ceux de **MOREIRA et al., 2005** (**Bactérie Non sensible (-)** pour le diamètre moins de 9 mm ,**Bactérie sensible (+)** pour un diamètre entre 10-15 mm .**Bactérie très sensible (+ +)** pour un diamètre entre 16-20 mm .**Bactérie extrêmement sensible (+++)** pour le diamètre plus que 20 mm)

III-2-4-2- Mise en évidence de l'effet Anti-inflammatoire d'extrait flavonoïque

Cette étude a été effectuée au laboratoire de pharmaco-toxicologique CRD du groupe SAIDAL, suivie de leur protocole.

La mise en évidence de l'effet anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode de Levy, cité par (**WINTER et al., 1962**).

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème après administration du produit anti- inflammatoire à tester par rapport au produit de référence correspondant.

Le principe est en général de ce test consiste à induire chez l'animal de laboratoire un produit inflammatoire, qui sera antagonisé par des substances censées être douées d'une activité anti-inflammatoire, administrées préalablement (extrait de plante médicinale).

- **Mode opératoire**

Le test consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait flavonoïque de l'*Artemisia herba alba* Asso. à une dose de 200 mg/kg sur l'œdème des pattes postérieures provoquée par l'injection d'une solution de Carraghénine à 1 % chez les souris. L'injection de Carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte des souris provoque une réaction anti-inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire (l'extrait flavonoïque à une concentration de 0,15 mg/ml)

L'injection par voie intra-péritonéale (IP) de la Carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris provoque une réaction qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire.

Des souris albinos adultes de sexe déférent pesant (20-22g) avec l'accès libre à l'eau mais ayant été jeunés au cours de la nuit (18h) sont répartis en 03 lots de 6 souris.

- **Au temps T_0** : administration par voie orale (gavage) aux 03 lots les suspensions suivantes :
- ❖ **Lots traité par produit de référence** : les souris gavées avec 0.5 ml d'un produit anti-inflammatoire (Diclofénac) d'une dose de 3,75mg/kg (1 comprimé de 75 mg dans 500 ml d'eau physiologique).
- ❖ **Lots témoin** : les souris reçoivent un volume de 0.5 ml par gavage de l'eau physiologique.
- ❖ **Lots traité par l'extrait flavonoïque** : souris gavées avec 0.5 ml à une dose 200 mg /kg. (**Figure 28, ANNEXE II**)

➤ **A temps T₀ + 30 min**

Injection par voie IP de la solution Carraghénine à 1 % sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche sous un volume de 0.025 ml à tous les souris en expérience. (Figure 29, ANNEXE II)

A temps T₀+ 04 H

Sacrifier les animaux par di éthyle éther

Couper les pattes postérieures à hauteur d'articulation.

➤ **La lecture**

Le poids des pattes postérieures gauches et droites des animaux de 3 lots a été mesuré à l'aide d'une balance analytique.

➤ **Expression des résultats**

- Calculer les moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et la patte droite de chaque lot.
- Calcule le % d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) par la formule suivante :

$$\%d'œdeme = \frac{\text{Moyenne des poids des pattes gauche} - \text{moyenne des poids des pattes droite} \cdot 100}{\text{Moyenne des poids des pattes droites}}$$

Calculer le %de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins

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

III-2-4-3- Evaluation de l'effet antioxydant de l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. (*In vitro*)

La mise en évidence de cette activité a été réalisée avec le test DPPH au niveau de laboratoire de PFE de l'université SAAD DAHLEB DE BLIDA.

- **But**

Evaluer la capacité de l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. à piéger les radicaux libres à l'aide d'un composé synthétique de radicaux libres DPPH.

- **Principe**

La capacité antioxydante peut être aussi mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette. Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piégeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration (jaune) dans la solution initiale (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

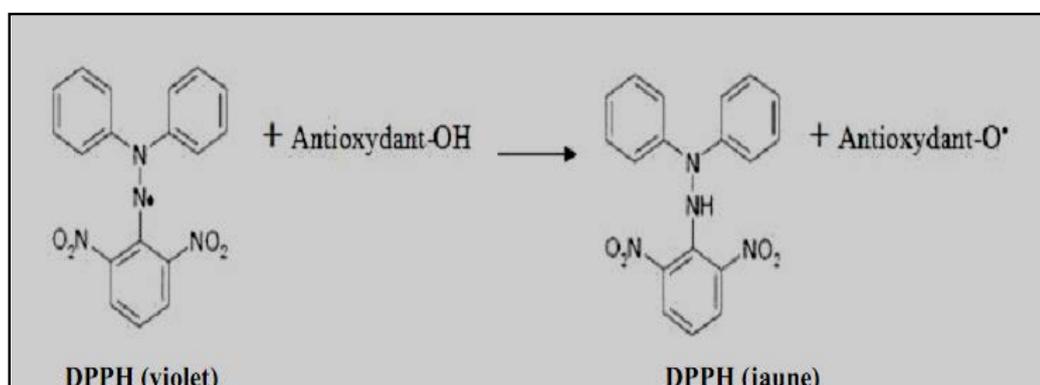


Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995)

• Mode opératoire

Le teste de DPPH à été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV – visible de type PERKI ELMER LAMBDA 25 à longueur d'onde de 517nm.

Selon **KIM *et al.*, 2003**. Le protocole d'activité anti oxydant sera évalué comme suit :

- Dissoudre 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.
- Préparer la solution de l'extrait flavonoïque de l'armoise blanche : 100mg de l'extrait flavonoïque dans 10 ml de méthanol (solution mère).
- La solution mère subira des dilutions pour avoir des déférentes concentrations de l'ordre milligramme.
- Dans des tubes secs et stériles, on mélange 1.5 ml de la solution DPPH et 1.5 ml de solution extrait flavonoïque méthanol pour chaque concentration.
- Un contrôle négatif est composé de 1.5 ml de solution DPPH et de 1.5ml de méthanol
- Les tubes sont mis dans un endroit sombre, et à la température ambiantes pendant 30 minutes.
- La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance ce à 517 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Un contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : acide ascorbique.
- Le pouvoir d'inhibition est calculé par une formule spécifique, et le pourcentage d'activité (I%) est donné par la formule suivante.

$$I \% = [Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}} / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100.$$

I % : Pouvoir d'inhibition des radicaux libres

Abs : absorbances à la longueur d'ondes de 517 nm

Abs_{contrôle} : absorbances de la solution méthanol – DPPH à 517 nm

Abs_{échantillon} : absorbances des échantillons

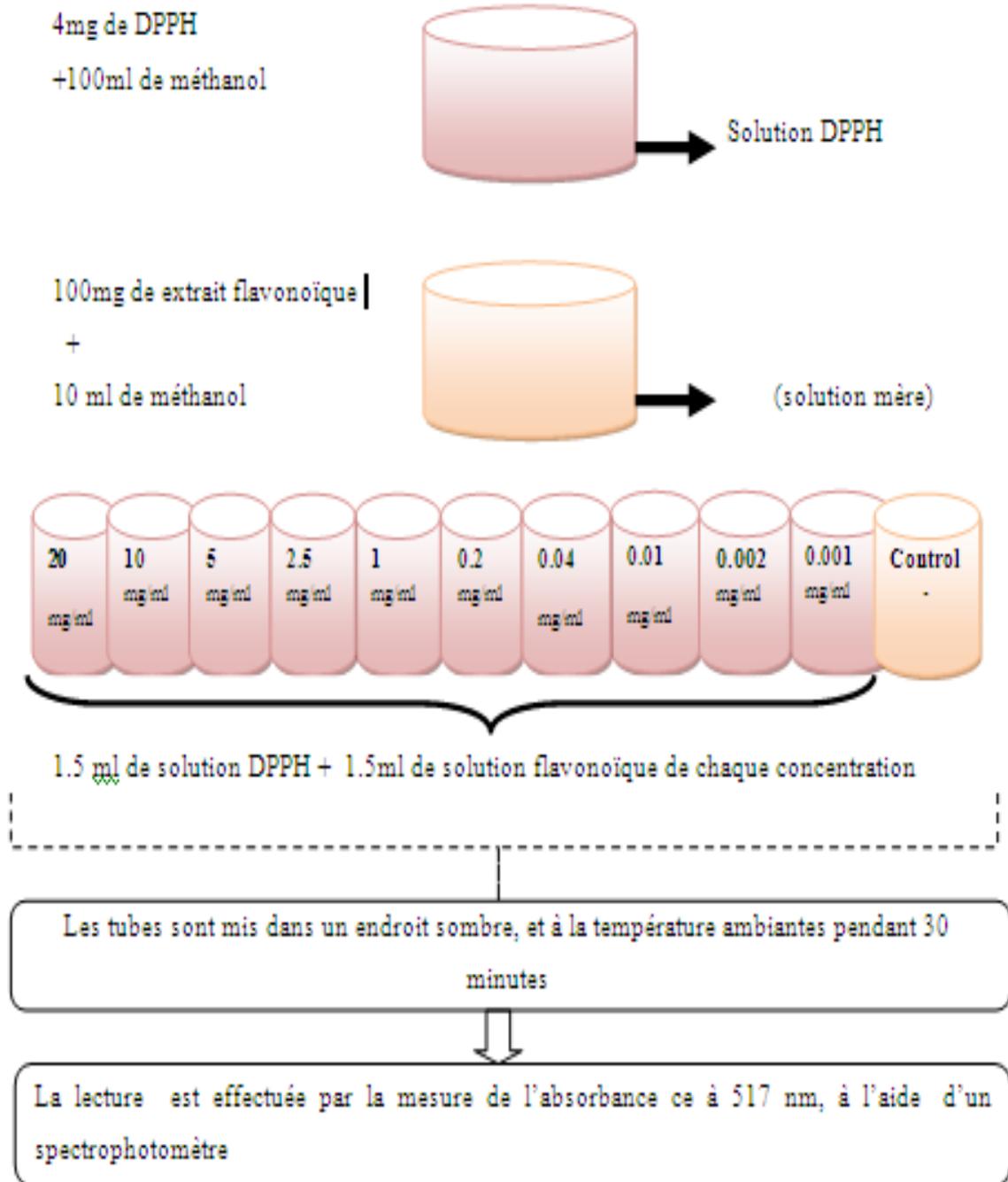


Figure 12 : Protocole d'activité anti oxydante (KIM *et al.*, 2003)

II-2-4-4- Etude de la toxicité aiguë

La DL_{50} est alors déterminée par la méthode de *MILLER et TAINTER., 1944.*

- **But**

A fin de vérifier tout éventuel risque de toxicité des extraits préparés, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité, pour cela nous avons testé, sur les souris mâles, différentes concentrations de l'extrait flavonoïque de l'*Artemisia herba alba* Asso.

- **Principe**

Le principe de ce test Consiste à dose létale 50 (DL_{50}), c'est -à-dire la dose capable de tuer, par voie d'administration choisie, la moitié des animaux mise en expérience.

L'observation des effets toxiques de l'extrait aqueuses des flavonoïdes sur les animaux en l'occurrence le nombre de mortalité se fait tous les jours qui suivent l'administration, pendant 14 jours.

- **Mode opératoire « MO. C.LP.016 »**

Les animaux de chaque lot sont maintenus a jeun pendant 18 heures, la veille de l'essai. Nous avons utilisé plusieurs lots d'animaux repartis d'une manière homogène (5 lots de 6 souris chacun), Au quels nous avons administrés séparément des doses 0,2 g/kg - 0.5 g/kg - 1 g/kg – 1.5 g/kg – 2 g/kg.

Nous avons administré 0,5 ml de chaque dose de l'extrait flavonoïque aux souris par gavage à l'aide d'une sonde gastrique.

Les souris sont privées la nourriture pendant 4 heures après l'administration du produit.

Les résultats de chaque lot sont appréciés en pourcentage de mortalité.

- **Détermination de la DL_{50}**

La méthode généralement de celle de Miller et Tainter dont le but est de tracer une droite de régression approximative en portant sur une feuille de papier log-prob le pourcentage de mortalité en fonction de la dose administrée .

- effectuer les corrélations suivant pour les pourcentages extrêmes 0% et 100%.

$$0\% = 0.5/n \cdot 100$$

$$100\% = (n - 0.5) / n \cdot 100$$

n= nombre d'animaux utilisé par lot.

- Tracer la courbe de façon que la droite passe par le maximum de point.

- Déterminer graphiquement la DL_{50} .

Chapitre IV
Résultat
Et
Discussion

IV-1 Tests phytochimiques

Les résultats du screening chimique de l'Armoise blanche « *Artemisia herba alba* Asso. » sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Résultats de l'étude photochimique

Métabolite	Coloration	Résultat
Anthocyane	Pas de coloration	-
Leuco anthocyanes	Coloration noire	-
Tanins	Coloration bleue à noire	+
Tanins galliques	Coloration bleu à noire	+
Flavonoides	Coloration rouge orangé	+
Quinones libres	Coloration verte	-
Quinones combinés	Coloration verte	-
Alcaloïdes	Pas Précipité, séparation de deux phases	-
Senosides	Coloration marron	-
Glucosides	Coloration verte	-
Coumarines	Trouble	+

+ : présence - : absence

Le screening chimique des parties aériennes de l'*Artemisia herba alba* Asso., a révélé la présence des composés chimiques, des substances poly phénoliques (tanin gallique et flavonoïdes), et des coumarines, et l'absence totale des anthocyanes, des leucoanthocyanes, des quinones, des alcaloïdes, des sésosides et des glucides.

Les investigations phytochimiques données par **SAN *et al.*, 1991 ; AHMED *et al.*, 1990**, ont montré que le genre d'*Artemisia* riche en sesquiterpènes, en monoterpènes, en flavonoïdes et en coumarines, en revanche d'autres études phytochimiques réalisées par **MAKHOULFI *et al.*, 2014 ; KHIREDDINE, 2012**, sur l'*Artemisia herba alba* Asso. ont signalés la présence des flavonoïdes, des tanins, des saponosides et des quinones.

Selon **FALLEH *et al.*, 2008**, la distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, l'exposition solaire, la sécheresse et la salinité), stimulent aussi la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols.

Par ailleurs **AHMED, 1990 ; SINGH *et al.*, 1988**, ont montré que les flavonoïdes et les coumarines confèrent une qualité biologique caractérisée par des multiples activités biologiques comme anti- malaria, anti- virale, anti- tumoral, anti- coagulant et anti- spasmodique.

Selon **BOUCHET *et al.*, 2000**, La richesse d'*Artemisia herba alba* Asso. en tanins peut être prescrite comme anti – diarrhéique ou comme régulateur des fonctions gastro-intestinales.

IV- 2 Humidité

Le taux d'humidité déterminé par l'appareil de DEAN et STARCK a montré que notre plante possède une teneur en eau égale à 4.949 %, ce résultat est inférieure à 12 % (**Norme de pharmacopée européenne, 2005**)

IV-3 Rendement en flavonoïde

L'extrait des flavonoïdes récupéré est de consistance dense et avec une couleur marron foncée. Son rendement trouvé est de 0,366%. Ce résultat est très proche celui obtenu par **KHIREDDINE, 2012.**) avec un rendement de 0.0201 % .

IV-4 Résultats d'analyse les flavonoïdes par chromatographie sur couche mince

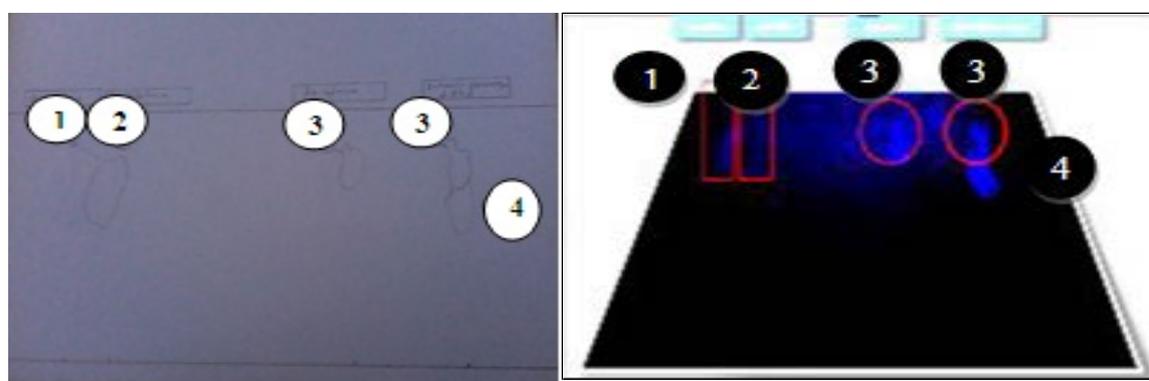
Les résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM) d'extrait flavonoïque ont révélé deux spots avec des rapports frontaux différents 0.54 et 0.74. la comparaison des rapports frontaux de notre produit avec ceux des étalons (Apigénine , Lutéoléine et Quercétine) (voir Tableau V , figure 13) a montré que notre extrait possède deux composés chimiques : Apigénine(tâche de couleur jaune verdâtre) , et le deuxième composé (tâche de couleur mauve) dont le nom inconnu. Cependant on note l'absence de la Quercétine et de Lutéoléine .

Tableau IV : Représentation des R_f (s) obtenus par chromatographie sur couche mince

Spots	Rf d' <i>Artemisia herba alba</i> Asso.	Couleur	Rf des produits de référence	Nom des produits de référence
1			0,38	Quercétine
2			0,58	Lutéoléine
3		Jaune	0,74	Apigénine
4	0.74	verdâtre		
	0.54	Mauve	0.50	Non identifier

(A)

(B)



Figures 13: Résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM) d'extrait flavonoïque l'*Artemisia herba alba* Asso. : (A) La CCM à l'œil nue, (B) la CCM sous la lampe UV.

1:Quercétine**2:** Lutéoléine **3:**Apigénine **4:** Non identifier

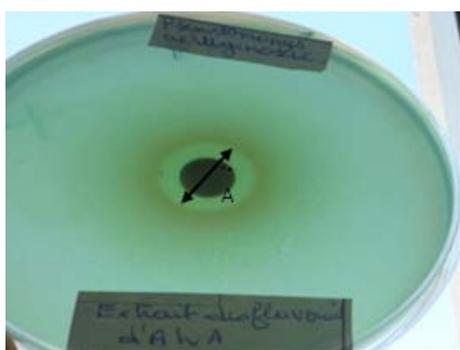
Notre résultat concorde avec ceux de **NABILE *et al.*, 1985 ; BOUDJELAL, 2013** qui ont signalé que le genre d'*Artemisia* est riche en flavones (Apigénine)

Selon **CATHERINE, 1996 ; MERKEN et BEECHER, 2000**, les flavones(Apigénine) et les flavonoles (Quercétine) en générale ne se trouvent pas ensemble dans la même extrait flavonoïque.

POLYPHENOLS	ACTIVITES
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémeuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Antiinflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes

IV - 5 Activité antimicrobienne

Les résultats relatifs aux diamètres des zones d'inhibitions de l'effet d'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. sur les souches choisies sont représentés et le tableaux VI (voir annexe II), dans figure 14, photo 15.



1- *Pseudomonas aeruginosa*

A=16mm



2- *Escherichia coli*

B=14mm



3- *Bacillus subtilis*

C= 11mm.



4- *Staphylococcus aureus*

D= 14 mm



5- *Candida albicans*

E= 09 mm



6- *Saccharomyces sp*

F= 09 mm

Figure 15: Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait flavonoïque

La comparaison de nos résultats avec ceux de **MOREIRA et al., 2005** a révélé que les *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus sensibles à l'encontre de notre extrait avec un diamètre d'inhibition de **16 mm**, suivis par les *Staphylococcus aureus* et les *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de **14 mm**, .Par contre les levures *Candida albicans* et *Saccharomyces sp* se sont avérées les plus résistantes vis-à-vis de notre extrait flavonoïque avec un diamètre d'inhibition de 09 mm.

L'Armoise est très riche en flavonoïdes **KHIREDDINE, 2012**, ce qui explique son effet antibactérien. En plus les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreuses composés flavonoïque (Apigénine, kaempferol et autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram (-) (*Escherichia coli*) et à Gram (+) (*Staphylococcus aureus*) (**ULANOWSKA et al. 2007**).

En outre d'autres travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (**FALLEH et al., 2008 ; HAYOUNI et al., 2007 ; KONE et al., 2004**), Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et des bactéries Gram (+).

Les bactéries Gram (-) est imperméable à la plupart des molécules car elle possède une couche additionnelle à la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides. Seulement, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Dalton (**SARNI -MANCHADO et CHEYNIER, 2006**).

IV- Résultat de l'activité anti inflammatoire

Les résultats d'épaisseur des pattes gauches et droites, le pourcentage de la réduction de l'inflammation obtenue de tous les lots de souris sont présents en **Tableau VX**, ANNEXES II.

A- Variation du poids des pattes postérieure gauche et droite pour chaque lot..

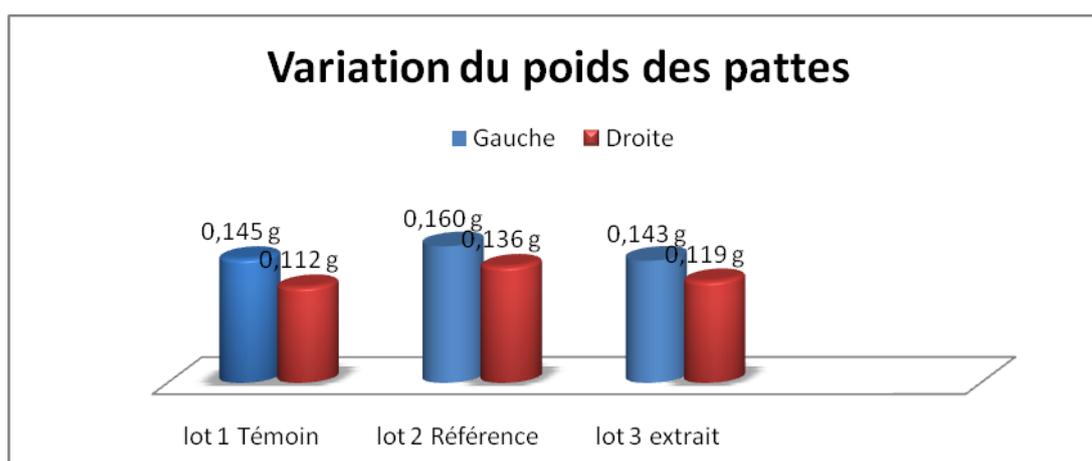


Figure 16 : variation du poids des pattes postérieures gauche et droite pour chaque lot.

Nous avons observé une augmentation de moyen de poids des pattes postérieures gauches des trois lots (lot témoin, lot de référence et lot d'extrait) par rapport à celui des pattes postérieures droites dont les poids respectives sont 0,145 - 0.160 et 0.143 (**figure 16**)

Cette différence s'explique par la présence d'un œdème au niveau des pattes postérieures gauches, ce qui confirme l'effet pro-inflammation de la Carraghénine.

B - Variation de pourcentage d'œdème des pattes gauches et droite

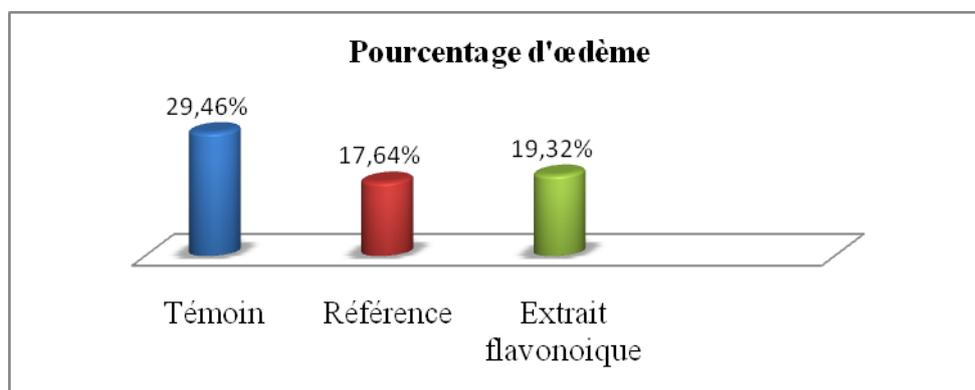


Figure 17 : Variation de pourcentage d'œdème des pattes gauches et droites

Après ½ heure, les souris des trois lots reçoivent une injection de la Carraghénine dans la patte gauche. Une réaction immédiate et persistante a été constituée. Elle consiste en l'apparition d'un œdème d'intensité variable selon les 3 lots.

Lot témoin est traité avec l'eau physiologique. C'est le lot qui a présenté le pourcentage d'œdème le plus élevé (29,46 %) en comparaison avec les deux autres lots.

C- Variation de pourcentage de réduction d'œdème des pattes gauches et droites

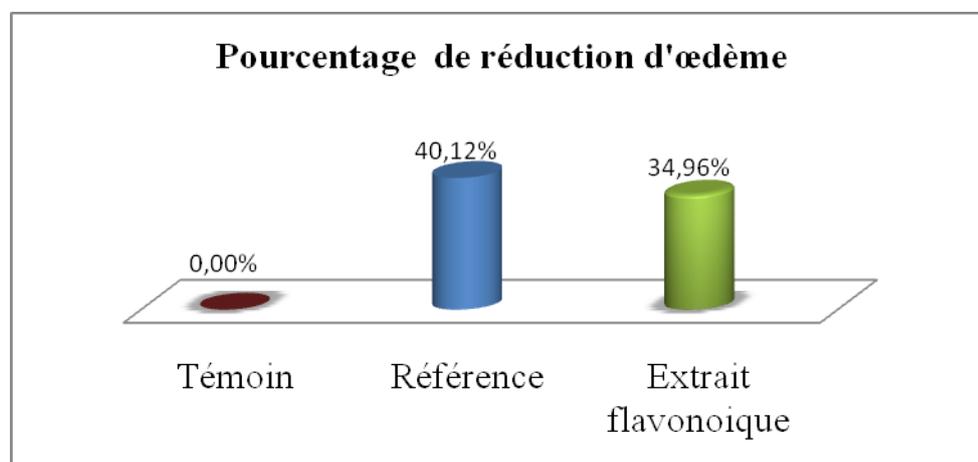


Figure 18 : Variation de pourcentage de réduction d'œdème des pattes gauches et droites.

Après 4 heures du début de l'application du traitement, l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. administré par voie orale avec une dose de 200 mg/kg a induit une réduction d'œdème des pattes postérieures gauche des souris de 34,96 %, ce résultat est proche à celui de Diclofinac® qui est de 40,12 %.

De nombreuses études in vitro ont montré l'activité des flavonoïdes contre les processus inflammatoire et de ce fait contre les maladies inflammatoires et arthrose (HARTONE, 2007 ; WALLE, 2007).

En Chine, en Algérie et dans plusieurs pays Européens, l'extrait des flavonoïdes est employé en usage externe dans les traitements des rhumatismes, de la goutte, des aphtes, des mycoses et contre les piqûres d'insectes et de scorpions (BABA AISSA, 1991).

IV- 7 Activité anti oxydante

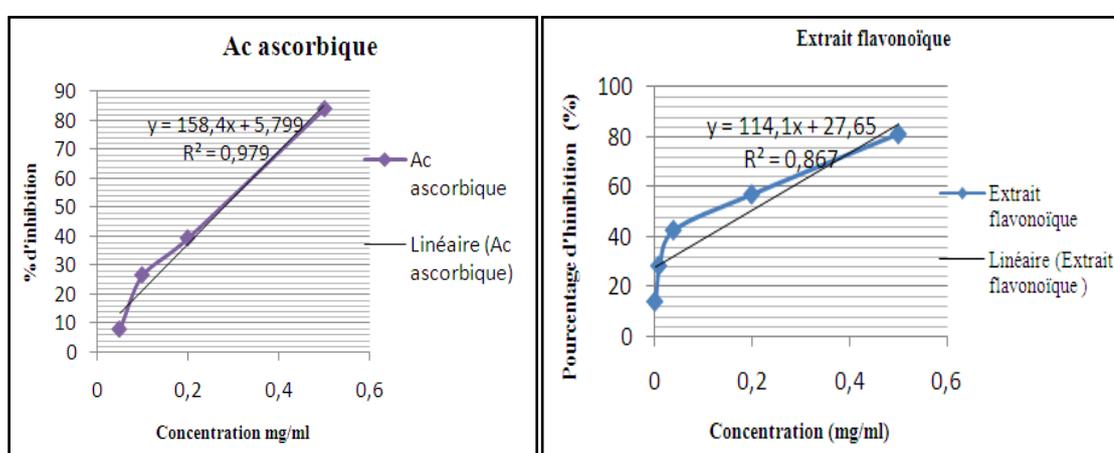


Figure 19 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique et l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso.

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés par (DO) ANNEXE II , Figure 30, Tableau XI .

Les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphényle picryl hydrazine, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogènes (**BRAND-WILLIAMS et al., 1995**).

Le pourcentage d'inhibition (% I) pour chaque extrait méthanoïque a été calculé. La valeur d'IC50 est la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. (**GÜRSOY et al., 2012**).

Les paramètres de calcul de l'activité antioxydante sont résumés dans le **Tableau VI**.

Tableau V : Paramètres de calcul de l'activité antioxydante IC50 (mg/ml)

Témoin positif et échantillons	IC50 (mg/ml)
Extrait flavonoïque	0.195
Acide ascorbique	0.26

L'extrait flavonoïque de l' d'*Artemisia herba alba* Asso. pouvait ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphényl-pi-crylhydrazine jaune-coloré avec un IC50 de 0,195 mg/ml montrant une activité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique qui a donné un IC50 de 0.26 mg/ml. Notre résultat est justifié par la forte propriété antioxydante des flavonoïdes (**KROON et WILLIAMSON, 1999**).

Selon les études fait par **CAO et al., 1997 ; VINSON et al., 1995** , ont montré que les substances phénoliques, comme les flavonoïdes et les acides phénoliques, sont considérablement plus antioxydants que la vitamine C et la vitamine E.

D'autre étude fait par **BOUDJELAL, 2013** sur l'extrait méthanoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. de la région de M'sila montre une forte activité antioxydant avec une IC50 égale 0,56 mg/ml par l'utilisation de test DPPH.

De plus, une autre étude faite sur huile essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso, on utilisant de test DPPH, a montre leur pouvoir anti oxydant (AL-MUSTAFA et AL-THUNIBAT, 2008 ; AKROUT *et al.*, 2010).

Par ailleurs selon BOUDIAF, 2006, Les flavonoïdes expriment les propriétés anti-oxydantes par le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production, la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme.

IV- 8 Etude de la toxicité (le teste de la dose limite)

Les résultats de la toxicité aigüe sont présentés dans la figure 20 et le tableau VII.

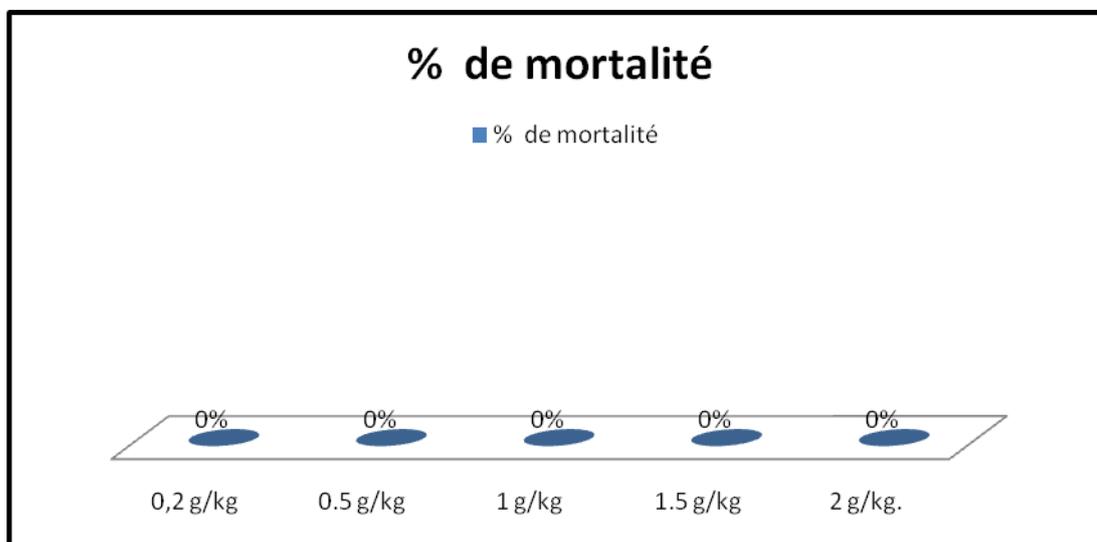


Figure 20 : Pourcentage de mortalité des souris en fonction de la dose en extrait flavonoïque

Tableau VII : Résultats de l'effet toxicologie d'extrait flavonoïque.

Doses g/kg	0,2 g/kg	0.5 g/kg	1 g/kg	1.5 g/kg	2 g/kg.
Nbre d'animaux	6	6	6	6	6
Nbre de morte	0	0	0	0	0
% de mortalité	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
A	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-
Ab	-	-	-	-	-
Σ ab	-	-	-	-	-

Suite à l'administration de l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. nous avons observé au niveau comportemental des souris une diminution de la motricité et difficulté de déplacement, en parallèle aucune mortalité à été observer avec augmentation proportionnellement des doses, ces résultat peut être due au potentiel thérapeutique des flavonoïdes qui n'est pas encore établi à cause de la connaissance limitée de leur absorption La biodisponibilité des flavonoïdes étant en général assez faible (**BRUNETON, 1999**).

Au regard des résultats obtenus, nous constatant que l'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. administré par gavage aux souris est inoffensif pour les doses testées.

D'après **PARIS et HURABELLEM, 1980**, Les flavonoïdes sont des toniques veineux et des protecteurs capillaires, se sont des molécules pratiquement atoxiques et bien tolérées chez l'homme mais leur action est lente.

CONCLUSION

Ces dernières années, de nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes.

Notre travail avait pour objectifs d'évaluer l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoires et antioxydante d'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. et vérifier son effet toxicologique.

Le taux d'humidité dans la matière végétale est de 4.949%. Il est conforme à la norme de la pharmacopée européenne.

Le screening chimique réalisé au sien du laboratoire des substances naturelles de l'unité SAIDAL, a mis en évidence la présence des substances poly phénoliques (tanin gallique et flavonoïdes), et les coumarines , et l'absence totale des anthocyanes, des leuco anthocyanes, des quinones, des alcaloïdes, des sénosides et des glucides dans la poudre des parties aériennes d'*Artemisia herba alba* Asso.

Le rendement d'extrait des flavonoïdes par extraction liquide – liquide des parties aériennes de la plante est de 0.336 %.

La chromatographie par couche mince a montré la présence de l'Apigénine (**flavone**) avec un rapport frontal de 0.74

L'extrait des flavonoïdes d'*Artemisia herba alba* Asso. a révélé une action inhibitrice importante vis-à-vis des Gram-, surtout à l'encontre des *P. aeruginosa*. avec un diamètre d'inhibition de 16

mm, par contre il se montre faiblement actif vis-à-vis des levures *C.albicans* et *Saccharomyce sp.*

L'extrait flavonoïque d'*Artemisia herba alba* Asso. administré par voie orale avec une dose de 200mg/kg possède presque le même effet anti-inflammatoire que celui du produit de référence Diclofinac®, et par la méthode DDPH il se montre douée avec une activité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique soit 0,195 mg/ml.

Et enfin Aucune toxicité aigüe n'a été enregistrée pour toute les souris testées (**DL 50**d'extrait des flavonoïdes est nulle).

Après toute cette étude, on remarque intérêt des flavonoïdes dans notre alimentation et notre santé, des 'étude scientifiques dont se sens est intéressent et peut être développé par :

- Des analyses quantitatives et qualitatives de l'extrait flavonoïque par des techniques scientifiques moderne.
- Evaluer d'autre activité biologique *in vitro* et *in vivo*.
- Isoler les composées des flavonoïdes et testés leurs effets biologiques