

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

Université de Blida1

Faculté des Sciences de la 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 des activités biologiques de l'extrait aqueux des fruits et des feuilles du Cynanque à feuilles d'olivier (*Solenostemma argel*)

Présenté par :

Soutenu le : 27/10/2014

M^{elle} Brenkia Afifa

M^{elle} Tabbouche Soumaya

Devant le jury :

M ^r . Bessaad A.	Maitre de Conférences (B)	USDB	Président
M ^{me} . Chebata N.	Maitre Assistante (A)	USDB	Examinatrice
M ^{me} . Zerkaoui A.	Maitre Assistante (A)	USDB	Examinatrice
M ^{me} . Amedjkouh H.	Maitre Assistante (A)	USDB	Promotrice

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

A mes très chers parents qui ont toujours été près de moi, qui m'ont toujours entourée de leur tendresse et de leur amour, que j'espère ne jamais les décevoir. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez fait pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère grand-mère qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi,
et à la mémoire de mon grand père adoré.

A mes très chères sœurs : Amel, Ratiba, Zineb ; à mon cher frère Abdelaziz et à mes beaux frères : les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A ma très chère nièce kaouthar que j'aime beaucoup.

A ma tante Fatiha, et tous mes chers oncles, tantes et cousines chez qui j'ai toujours trouvé la force d'aller vers l'avant.

A ma très chère binôme Afifa, et toutes sa famille.

A toute ma famille et à tous mes chers amis.

Soumaya

Dédicace

A cœur veillant rien d'impossible, à conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre, tout vient à point à qui sait attendre

Malgré les obstacles qui s'opposent, en dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout notre unique et seul atout

Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys, Je prie dieu pour que cette soutenance

Soit signe de persévérance et que je serais enchantée par mon travail honoré

Que je dédie :

A la mémoire de mon grand-père qui ma toujours aimé et comblé par ses bénédictions, que dieu le tout puissant l'accueille en son vaste paradis.

A mes très cher parents qu'ils voient en ce travail le tout premier fruit de leurs énormes sacrifices consentis pour ma réussite, vous qui m'avez appris à être dans le droit chemin, vous demeurez à tout jamais un model pour moi, J'espère que je serais à la hauteur de ce que vous attendez de moi, je vous aime aujourd'hui plus qu'hier mais bien moins que demain, que Dieu vous procure la santé et vous protège.

A mon agréable et aimable unique frère ABDECHAFI.

A mes grands-mères et grand père, que dieu les gardent.

A tous mes oncles et tantes.

A tous mes cousins et cousines.

A ma très chère binôme Soumaya et Sa famille, je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité

A mon adorable amie et sœur Nabila, je te souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A mon meilleur ami Hamza avec qui j'ai partagé des moments de joie, de bonheur et de folie et qui ma soutenu jusqu'au bout et que je remercie énormément

A mes amis Belkacem , Chaouki , Racha et Rym, Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frère et sœurs, et des ami sur qui je peux compter

Afifa

Remerciement

Nous remercions tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience pour achever ce travail.

C'est pour nous, un agréable devoir de remercier, au terme de ce travail, tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont participé à sa réalisation. C'est avec une profonde gratitude que nous remercions :

***Mlle AMEDJKOUH H.**, pour nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Ses précieux conseils, son permanent, sa qualité d'écoute ainsi que sa confiance qui nous ont été inestimables et nous ont permis de mener cette recherche, dans les meilleures conditions. Nous sommes reconnaissantes pour sa patience et ses conseils durant notre parcours universitaire qui ont toujours été très fructueuses. Nous la remercions également pour la qualité de son enseignement et pour la précision scientifique qu'elle nous transmettait durant nos études universitaires.*

Ce travail n'aurait pas été le même sans le soutien scientifique et les discussions enrichissantes avec les membres de jury de thèse, nous voudrions citer:

***M^r BESSAAD A.**, pour avoir accepté la présidence de ce Jury ; ses conseils vont nous permettre de finaliser ce travail, qu'il trouve ici nos expressions les plus respectueuses.*

***M^{me} CHEBATA N.**, pour l'honneur qu'elle nous fait en faisant partie de ce jury. Nous sommes très reconnaissantes pour son soutien, pour sa présence. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde et respectueuse reconnaissance.*

***M^{me} ZERKAOUI A.** pour avoir accepté de juger ce travail. Nous lui remercions pour sa sympathie et sa bienveillance et pour ces remarques pertinentes et ces discussions fructueuses qui vont enrichir ce travail Recevez ici l'expression de notre profonde gratitude.*

Nous adressons encore nos remerciements à toute l'équipe du service microbiologie, physico-chimie et pharmacotoxicologie du complexe Antibiotical Saidal Médéa, en particulier :

***M^r Mustapha, M^{me} Neggab I., M^r Kheireddine, M^r Ben Omayer, M^r Hentabli, M^{me} Bekhti et Mr Boukhatem** pour leur sympathie, leurs conseils et leurs aides, ils ont contribué par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.*

Nous tenons tout particulièrement à remercier docteur Oueld Rouis, responsable du laboratoire d'analyse médicale à Blida, et Docteur Lessouad, chef de service du laboratoire de CTS de Tipaza, de nous avoir accueillies au sein de leurs laboratoires. Merci également à tous leurs effectifs pour l'aide qu'ils nous ont fourni.

Enfin, nous tenons également à remercier tous ceux qui nous ont soutenu et participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Résumé

Le présent travail est une contribution à l'étude phytochimique et la mise en évidence de quelques activités biologiques des fruits et feuilles du cynanque à feuilles d'olivier (*Solenostemma argel*), de la sous famille des Apocynaceae.

Un screening phytochimique a permis la mise en évidence de différents groupes chimiques de métabolites secondaires : les flavonoïdes, les anthocyanes, les Tanins (catéchiques et galliques), les Saponines, les composés réducteurs et les mucilages.

Le test limite de la toxicité de l'infusé des feuilles et des fruits à une concentration de 2g/Kg, mené sur des souris a montré que les fruits et les feuilles de *Solenostemma argel* sont relativement considérée non toxique. Le pouvoir antimicrobien des extraits aqueux des fruits et feuilles par la méthode de diffusion en milieu gélosé, ce test montre que *Solenostemma argel* possède un pouvoir antimicrobien modéré sur certaines souches bactériennes utilisées (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia Coli*, *Serratia marcesens*, *Morganilla morganii*, *Salmonela thyphimurium*), et aucun effet sur la souche fongique *Candida albicans*.

L'extrait aqueux à 10% des fruits réduit l'œdème de la patte de souris, induit par la carraghénine à 0,1%, avec un pourcentage d'inhibition totale plus élevé (75,40%) par rapport à celui du Diclofenac de Sodium (71,79%) et suivit par celui de l'extrait aqueux des feuilles (69,93%).

La formulation des crèmes cicatrisantes à base de fruits et à base de feuilles et l'étude de son effet sur les lapins a montré que notre plante possède une très bonne activité cicatrisante en comparant par la crème de référence Madécassol.

Les extraits aqueux à 10% des fruits et des feuilles de *Solenostemma argel* ont présenté une bonne activité antioxydante par la méthode de réduction du fer (FRAP) et de piégeage du radical libre DPPH, avec des IC₅₀ (concentration correspondant à 50% d'inhibition) respectives : 1,18mg/ml et 1,38 mg/ml pour les fruits et les feuilles.

Mots Clés : *Solenostemma argel*, screening phytochimique, activité antimicrobienne, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante, activité cicatrisante.

Abstract

The present work is a contribution to the phytochemical study and the highlighting of some biological activities of arguel fruits and leaves (*Solenostemma argel*), which is included in the under family Apocynaceae.

A phytochemical screening allowed the identification of different groups of secondary metabolites: flavonoids, anthocyanins, tannins (catechic and gallic), saponins, reducing compounds and mucilages.

The limit test of the toxicity of the infused has a concentration of 2g / Kg, led on mice showed that fruits and leaves of *Solenostemma argel* are relatively considered not toxic. The antimicrobial power of the aqueous extract of the fruits and leaves by the method of agar diffusion, shows that *Solenostemma argel* has a moderate antimicrobial activity on some used stumps (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcesens*, *Morganilla morganii* *Salmonell typhimurium*), and no effect on the fungal strain *Candida albicans*.

The aqueous extract 10 % of fruits reduced the edema of the leg of mouse, induced by the carragenine 0,1% , with a higher percentage of total inhibition (75,40%) compared to that of Diclofenac de Sodium (71,79%) and followed with that of the aqueous extract of the leaves (69,93%).

The formulation of healing creams with fruits and with leaves and the study of its effect on rabbits showed that our plant possesses a very good healing activity while comparing with the cream of reference Madecassol.

The aqueous extracts 10% of the fruit and the leaves of *Solenostemma argel* presented a good antioxidant activity by the method of reduction of iron (FRAP) and scavenging of free radical DPPH, with IC50 (concentration for 50% inhibition) respectively: 1,18mg /ml and 1, 38 mg /ml for fruit and leaves.

Keywords: *Solenostemma argel*, phytochemical screening, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, healing activity.

المخلص

يعتبر هذا العمل مساهمة في دراسة التركيبية الكيميائية و الكشف عن بعض الانشطة البيولوجية للمستخلص المائي لاوراق و ثمار نبات الحرجل الذي ينتمي لعائلة الابوسيناسي

سمح الفحص الفيتو كيميائي بالتعرف على مجموعات كيميائية مختلفة من المركبات الثانوية
كشفت اختبار السمية الاولى ان اوراق و ثمار الحرجل غير سامين اما دراسة فعالية المستخلص المائي بطريقة الانتشار في الوسط الجليكوزي اظهرت ان نبات الحرجل فعال بدرجات متفاوتة ضد بعض المكروبات

Klebsiella pneumoniae, Escherichia Coli, Serratia marcesens, Morganilla morganii, Salmonell thyphimurium

واظهرت دراسة خاصة مضاد الالتهاب ان المستخلص المائي يخفض بنسبة كبيرة الالتهاب لدى الفاران الناجم عن حقن الكراجينين بنسبة 75.40 بالنسبة للثمار و بنسبة 69.63 بالنسبة للاوراق

من جهة اخرى تم اعداد مرهم لتضميد الجراح وكذا تجربته على الارانب. حيث اظهر ان نبات الحرجل يملك قدرة شفائية عالية.

Liste des figures

Figure 1 : Structure de base des terpènes (isoprène).....	P5
Figure 2 : Structure d'une flavone	P8
Figure 3 : Structure générale de deux tannins végétaux	P10
Figure 4 : Principales classes d'alcaloïdes.....	P11
Figure 5 : Structure générale des saponines.....	P11
Figure 6 : Aspect générale de <i>Solenostemma argel</i>	P13
Figure 7 : Feuilles de <i>Solenostemma argel</i>	P13
Figure 8 : Inflorescence de <i>solenostemma argel</i>	P14
Figure 9 : Fleur de <i>Solenostemma argel</i>	P14
Figure 10 : Fruits immature de <i>Solenostemma argel</i>	P14
Figure 11 : Fruits mature de <i>Solenostemma argel</i>	P14
Figure 12 : Graines de <i>Solenostemma argel</i>	P14
Figure 13 : Répartition géographique de <i>Solenostemma argel</i>	P15
Figure 14 : Souris albinos	P17
Figure 15 : Lapin albinos	P17
Figure 16 : Poudre végétale des fruits et des feuilles de <i>solenostemma argel</i>	P19
Figure 17 : Protocole expérimentale du test limite de toxicité.....	P23
Figure 18 : Protocole expérimentale de l'activité antimicrobienne	P25
Figure 19 : Lecture des résultats de l'activité antimicrobienne	P26
Figure 20 : Protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire.....	P28
Figure 21 : Contrôle microbiologique de la crème cicatrisante	P32
Figure 22 : Protocole expérimentale de l'évaluation de l'activité cicatrisante in vivo	P34
Figure 23 : Forme réduite du radical DPPH.....	P36
Figure 24 : Evolution moyenne de l'inflammation des PPG des souris.....	P43
Figure 25 : Inhibition de la lipooxygénase et de la cyclooxygénase sous l'action de différents flavonoïdes.....	P46
Figure 27 : Evolution de la cicatrisation avec le temps	P48
Figure 28 : Pouvoir réducteur des extraits aqueux et de l'acide ascorbique	P50
Figure 29 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'extrait aqueux des fruits.....	P51
Figure 30 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'extrait aqueux des feuilles.....	P51
Figure 31 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.....	P52

Liste des Tableaux

Tableau I : Principaux acides hydroxybenzoïques.....	P6
Tableau II : Principaux acides hydroxycinnamiques.....	P7
Tableau III : Principaux types de coumarines	P7
Tableau IV : Structure des principales classes de flavonoïdes	P9
Tableau V : Situation géographique de la station de récolte obtenue par GPS.....	P17
Tableau VI : Les caractéristiques du matériel animal utilisé.....	P18
Tableau VII : Description et pouvoir pathogène des souches testées.....	P 18
Tableau VIII : La répartition des lots de souris pour le test de l'effet anti-inflammatoire..	P27
Tableau IX : Composition des crèmes dermiques cicatrisantes à base de feuilles et à base de fruits de <i>Solenostemma argel</i>	P29
Tableau X : Echelle de cotation de l'effet cicatrisant	P35
Tableau XI : Résultat du taux d'humidité de la matière végétale.....	P38
Tableau XII : Résultats du screening phytochimique.....	P38
Tableau XIII : Résultat du test limite de toxicité des extrait aqueux.....	P40
Tableau XIV : Résultat du test de l'activité antimicrobienne	P40
Tableau XV : Evolution des épaisseurs moyennes de PPG des souris de chaque lot	P43
Tableau XVI : Pourcentage d'augmentation de l'œdème des PPG des souris.....	Annexe III
Tableau XVII : Pourcentage de réduction des œdèmes moyens	P44
Tableau XVIII : Etude Statistique de l'activité anti-inflammatoire.....	Annexe III
Tableau XIX : Evolution de l'œdème chez les lapins	P47
Tableau XX : Evolution de la profondeur des plaies chez les lapins	P48
Tableau XXI : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH.....	P50
Tableau XXI : IC50 du standard, de l'extrait aqueux des feuilles et l'extrait aqueux des fruits.....	P52

Sommaire

Introduction	p1
Etude bibliographique	
I. Plantes médicinales et phytothérapie	p2
I.1. Historique	p2
I.2. Définitions	p2
I.2.1. Plantes médicinales	p2
I.2.2. Phytothérapies	p3
I.3. Différents types de phytothérapie	p3
I.4. Cueillette et conservation des plantes médicinales	p4
I.5. Propriétés et mode d'utilisation	p4
I.5.1. Infusion	p4
I.5.2. Décoction	p4
I.5.3. Macération	p5
I.5.4. Teinture	P5
I.5.5. Cataplasme	P5
I.6. Principes actifs des plantes médicinales	P5
I.6.1. Les terpènes	P5
I.6.2. Les composés phénoliques	P6
I.6.3. Les alcaloïdes	P11
I.6.4. Les glucosides	P11
II. Généralités sur la plante étudiée	P12
II.1. Introduction	P12
II.2. Classification	P12
II.3. Synonymes et noms vernaculaires	P12
II.4. Description botanique	P13
II.5. Distribution géographique et écologie	P15
II.6. Utilisation traditionnelle	P15
I.9. Utilisations traditionnelles	

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel.....	p17
I.2. Méthodes.....	p19
I.2.1. Préparation de la poudre végétale.....	p19
I.2.2. Détermination du taux d'humidité.....	p19
I.2.3. Screening phytochimique.....	p20
I.2.4. Etude toxicologique.....	p22
I.2.5. Etude des activités biologiques.....	p24
I.2.5.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	p24
I.2.5.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	p26
I.2.5.3. Evaluation de l'activité cicatrisante.....	p29
I.2.5.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	p35

II. Résultats et discussions

II.1. Résultats du taux d'humidité de la matière végétale.....	P38
II. 2. Résultats du screening phytochimique.....	P38
II.3. Résultats de l'étude toxicologique.....	p40
II.4. Résultats de l'étude des activités biologiques.....	p40
II.4.1. Résultat de l'activité antimicrobienne.....	p40
II.4.2. Résultat de l'activité anti-inflammatoire.....	p43
II.4.3. Résultat de l'activité cicatrisante.....	p46
II.4.4. Résultat de l'activité antioxydante.....	p49
Conclusion.....	p54
Références bibliographiques.....	p56

Introduction

Au travers les âges, l'homme a pu compter sur les plantes pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux (**Roux, 2005**), leur utilisation a longtemps été guidée par la tradition. La phytothérapie renait ces derniers temps avec une approche plus scientifique. Elle se base sur des études, des analyses et des expérimentations (**Svoboda et Svoboda, 2000 ; Cazaubon, 2005**). D'autant plus, l'être humain se montre de plus en plus réticent à l'emploi des molécules chimiques. Il y a donc un réel besoin de trouver des méthodes alternatives. Pour cela, l'évaluation des propriétés thérapeutiques des plantes, constitue une tâche très intéressante et utile, particulièrement pour les plantes d'une utilisation rare, moins fréquente ou non connue dans la médecine et les traditions médicinales. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (**Bahorun, 1997**).

Dans les régions arides, plus spécialement le Sahara centrale, la flore et son utilisation sont restées pendant longtemps connues que par les Touaregs ou par des militaires ; ces plantes ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. À côtés des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme, en particulier dans le domaine pharmacologique (**Marouf et Joel, 2007**).

Solenostemma argel, est une plante endémique de l'Ahaggar, connue par les Touaregs sous le nom d'Aghellachem, c'est une espèce appartenant à la famille des Asclepiadaceae, connue pour sa richesse en métabolites secondaires qui sont nécessaires à la fabrication de produits pharmaceutiques importants (**Sayadat et Shaza, 2009**). Cependant, elle demeure très peu connue comme plante médicinale.

Dans cette optique, et dans le cadre du projet de recherche entrepris par le Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides « L.R.Z.A », notre travail a pour objectifs :

- Mettre en évidence certaines familles de métabolites secondaires contenus dans les fruits et les feuilles de *Solenostemma argel*, tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes et les saponines par un screening phytochimique
- Le test de toxicité de l'extrait aqueux des feuilles et des fruits de *Solenostemma argel*
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux par diffusion sur gélose.
- L'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux.
- L'évaluation de l'activité cicatrisante des crèmes formulées à base de fruits et des feuilles de *solenostemma argel*.
- L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction du fer (F.R.A.P) et par la méthode du piégeage du radicale libre 2, 2'- diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH).

Partie Bibliographique

I. Plantes médicinales et phytothérapie

I.1. Historique

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires (**Carillon, 2000**).

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 recense jusqu'à 250 espèces de plantes avec des suspensions, des décoctions et des onguents (**Clarac, 2008**).

Au moyen âge, tant les civilisations occidentales qu'arabes se soignaient par les plantes ; au XV^e siècle, Paracelse, le célèbre médecin alchimiste, avança la « théorie des signatures » selon laquelle chaque plante porte en elle ou sur elle la signature de la maladie qu'elle guérit ; à partir du XIX^e siècle la plante médicinale est abandonnée au profit de la chimie moderne, cependant quelques irréductibles s'accrochent à leur croyance en les bienfaits de la phytothérapie ce qui permet sa renaissance au cours du XX^e siècle (**Winckle, 2006**).

Ce savoir traditionnel ancestral transmis de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'information extrêmement précieuse pour tous les chercheurs de l'industrie pharmaceutiques (**Fouché et al., 2000**).

I.2. Définitions

I.2.1. Plantes médicinales

Les plantes sont dites médicinales lorsqu'un de leurs organes (feuilles, fleurs, racines, tiges, graines, fruits) possède des activités pharmacologiques ou possède au moins une partie ayant des propriétés médicamenteuses (**Bruneton, 1999**).

En d'autres termes, ce sont des végétaux connus pour leurs pouvoirs à agir sur certains maux 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 galéniques, soit encore sous forme de principes actifs comme matière première pour l'obtention de médicament (**Ragot, 2001 ; Babulka, 2007**).

I.2.2. Phytothérapie

Le mot phytothérapie vient du grec phyto : plante, et thérapie : soin, c'est une thérapeutique qui utilise les plantes ou les formes galéniques dérivées de plantes excluant les principes d'extraction purs isolés des plantes (**Mathieu et Fonteneau, 2008**) ; elle concerne donc le traitement des maladies par les plantes ou par leurs extraits (**Milpied, 2009**) .

I.3. Différents types de la phytothérapie

I.3.1. Aromathérapie : elle se définit comme l'utilisation médicale des huiles aromatiques (huiles essentielles) (**Milpied, 2009**) , qui peuvent être appliquées directement sur la peau, ajoutées à des bains, inhalées par fumigation, ou diffusées dans une pièce , elles possèdent des effets psychologiques , physiologiques et cellulaires qui peuvent être relaxants ou stimulants en fonction de la chimie de l'huile utilisée (**Ernst et Pittler, 2005**).

I.3.2. Gemmothérapie : c'est une médecine non conventionnelle qui utilise des tissus embryonnaires végétaux en croissance tels que les jeunes pousses, bourgeons, radicelles préparées par la macération dans un mélange d'eau, de glycérine et d'alcool (**Tchoumak , 2012**).

I.3.3. Herboristerie : Elle correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs), la préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale (**Strang, 2006**).

I.3.4. Homéopathie : C'est une technique curative et préventive obéissant à deux règles précises : le principe de Similitude et l'utilisation de doses infinitésimales (**Benabdallah, 1992**), toute substance qui administrée à un être humain en bonne santé, provoque certains symptômes devient après dilution et dynamisation capable de guérir des symptômes analogues chez un malade, ainsi l'ipéca, à dose pondérale est vomitif mais après dilutions et dynamisation sera conseillée pour traiter les nausées et les vomissements (**Roux et Catier, 2007**).

1.3.5 Phytothérapie pharmaceutique : c'est une technique qui utilise des produits d'origine végétale obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant, ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide, ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules ou de lyophilisats (Zeghad, 2009).

I.4. cueillette et conservation des plantes médicinales

L'action des plantes médicinales dépend de la période et du moment de leur récolte, de leur séchage ainsi que de leur conservation ; L'époque de la collecte, dans la nature ou dans une culture, est déterminée par la teneur de la plante en matière actives au cours de son cycle végétatif (Volak, 1987). Il est essentiel qu'elle conserve le maximum de ses principes actifs (Valnet, 1983).

La cueillette doit se faire préférentiellement par temps sec après le lever du soleil et après la disparition de la rosée ; il faut aussi que les fleurs soient cueillies avant leur complet épanouissement (Valnet, 1983; Beloued, 2001). Pour une conservation optimale de la plante, il faut qu'elle soit débarrassée de toutes les parties mortes (Beloued, 2001). Le séchage et la conservation doivent se faire dans un endroit approprié c'est-à-dire sombre, abrité et bien aéré où la température ne doit pas dépasser les 37 °C (Nogaret-Ehrhart, 2006).

I.5. Propriétés et mode d'utilisation

La préparation d'un médicament à partir d'une plante contenant une substance chimique bénéfique varie suivant la plante et la nature de la substance (Nogaret-Ehrhart, 2006).

I.5.1. Infusion : Elle est préparée en versant de l'eau bouillante sur des plantes fraîches ou sèches (Frély, 2006). Le mélange est laissé pour 15 à 20 minutes puis filtré à l'aide d'un linge propre (Nogaret-Ehrhart, 2006). L'infusion s'utilise pour les substances fragiles pouvant être détruites par une température trop prolongée ou éliminées par la vapeur (Berton, 2001).

I.5.2. Décoction : Elle est préparée en mettant les plantes dans de l'eau bouillante, le mélange est porté à l'ébullition 5 à 15min ; il est déconseillé de faire bouillir les plantes aromatiques car les essences s'évaporent (Berton, 2001). Cette méthode s'applique essentiellement aux parties souterraines de la plante (racines), ainsi qu'à l'écorce car ces structures libèrent difficilement leurs principes actifs lors d'une infusion (Nogaret-Ehrhart, 2006).

I.5.3. Macération : Elle permet d'obtenir la solution la plus concentrée en laissant la plante en contact de l'eau à froid pendant quelques heures, voire quelques jours (Frély, 2006). Elle est employée surtout pour des substances trop facilement transformables par la chaleur (Bernadet, 1983), et également pour éviter d'extraire les tanins (Raynaud, 2005).

I.5.4. Teintures : Elle Consiste à faire macérer une plante dans l'alcool et l'eau, ce qui permet d'extraire plus de principes actifs de la plante (Lacoste, 2012). Les teintures présentent deux avantages majeurs: leur conservation qui peut s'étendre à une durée de trois années et l'absorption rapide par l'organisme de leurs principes actifs (Nogaret-Ehrhart, 2006).

I.5.5. Cataplasme : C'est une application externe de la plante fraîche ou cuite, sous bondage ou compresses, Leur application se prolonge de quelques minutes à quelques heures (Berton, 2001).

I.6.Principes actifs des plantes médicinales

Les principes actifs sont des composants importants de la plante, qui lui confèrent son caractère médicinale ; ils interviennent dans son identification et sa caractérisation, et lui permettent d'agir dans les fonctionnements d'un organisme, d'un organe ou d'un métabolisme (Fuinel, 2002). Les principes actifs des plantes sont de deux types :

- Les produits issus de métabolisme primaire (essentiellement des saccharides).
- Le second type de substances se compose de produits du métabolisme secondaire (Volak et Stodola, 1983).

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006).

I.6.1. Les terpènes

Le nom de terpènes vient à l'origine de la térébenthine, l'huile volatile des pins, ce terme a été utilisé de façon plutôt imprécise pour tous les composés huileux volatils insolubles dans l'eau ayant en général une odeur de résine végétale (Clayden et al., 2002). Les terpènes sont des composés naturels résultant de la polycondensation d'unités isopréniques (Figure 1) en C5 (2-méthylbutyle) (Santelli, 2012).

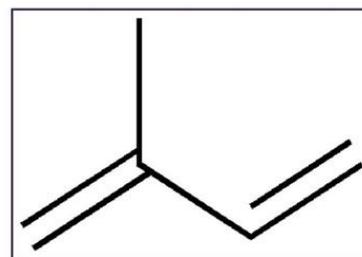


Figure 1: Structure de base des terpènes (isoprène) (Santelli, 2012)

ce sont des métabolites universels trouvés dans tous les organismes vivants ; plus de 33000 composés terpéniques ont été découverts, parmi lesquels nous distinguons : les hémiterpènes en C₅, les monoterpènes en C₁₀, les sesquiterpènes en C₁₅, les diterpènes en C₂₀, les sesterterpènes en C₂₅, les triterpènes en C₃₀, les tétraterpènes en C₄₀ et les polyterpènes en C_n (Santelli, 2012).

I.6.2. Les composés phénoliques

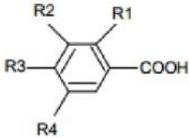
I.6.2.1. Les acides phénoliques

Se définissent par l'existence d'un seul noyau benzéique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, ils se trouvent en général à l'état combiné (sous forme d'esters ou glucosides) (Gayon, 1968), ils incluent les acides benzoïques, les acides cinnamiques et les coumarines (Sauvion *et al.*, 2013).

a) Acides hydroxybenzoïques

Ils ont une structure générale de C₆-C₁, les variations de structures de différents acides benzoïques se situent dans l'hydroxylation et la méthylation du noyau aromatique (Hakkinen, 2000). Ils peuvent être présents sous forme de combinaisons avec des sucres ou des acides organiques généralement de type ester, dont ils sont libérés par hydrolyse alcaline (Gayon, 1972). Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau I :

Tableau I: Principaux acides hydroxybenzoïques

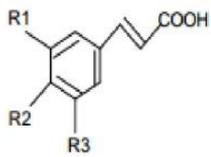
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

(Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

b) Acides hydroxycinnamiques

Ils ont une structure générale de C₆- C₃ et existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques ; les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau II représente les principaux acides hydroxycinnamiques (Macheix et Fleuriet, 1990 ; Hakkinen, 2000).

Tableau II : Principaux acides hydroxycinnamiques

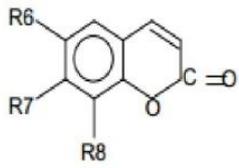
Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

(Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

c) Les coumarines

Présentes dans de nombreux végétaux, les coumarines ont une structure de base (C₆-C₃) dérivant des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale, elles sont produites en grandes quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique (Collin et Crouzet, 2011). Le tableau III résume les principaux types de coumarines.

Tableau III : Principaux types de coumarines

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH ₃	OH	H	Scopolétol
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

(Macheix et al, 2005)

I.6.2.2. Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés du phénylpropane avec une composition de base C6-C3-C6, le squelette originale est une flavone (**Hopkins, 2003**), constitué de deux unités aromatiques, deux noyaux benzénique (A et B), reliés par un noyau central hétérocyclique pyrane totalement réduit (C) (**Figure 2**) (**Shohaib et al., 2011**). Il existe environ 12 groupes connus de flavonoïdes qui ne diffèrent les uns les autres que par l'état d'oxydation de ce noyau hétérocyclique, les trois des principaux groupe sont les flavones, flavonols et anthocyanes (**Hopkins, 2003**).

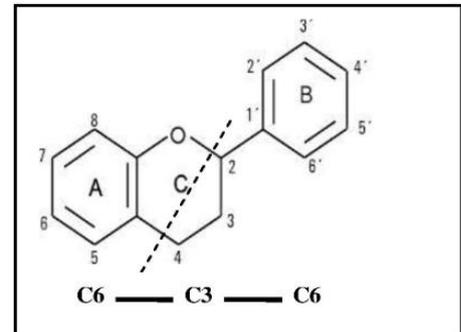


Figure 2 : structure d'une flavone (**Ranganna, 1986**)

a) Les flavones

Les flavones se caractérisent par la présence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, elles sont abondantes chez les plantes supérieures sous forme aglycones ou glycosylées, Certaines comme la lutéoléine sont en partie responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets (**Macheix et al., 2005**).

b) Les flavonols

Les flavonols se caractérisent par une liaison insaturée entre les carbones 2 et 3 et par une fonction hydroxyle en position 3 (3-hydroxyflavone) du cycle C, les flavonols sont très répandus dans le règne végétal; de ce fait, ils sont abondants dans l'alimentation, nous citerons le kaempférol, la quercétine, la morine et la myricétine (**Aherne et al., 2002**), ils peuvent participer à la couleur jaune de certaines fleurs (primevère, chrysanthème jaune, fleur du cotonnier) et se retrouvent principalement sous forme glycosylée dans les fruits et les légumes (**Dawidar et al., 1974**).

c) Les anthocyanes

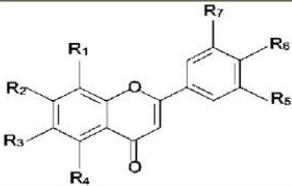
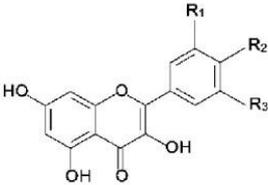
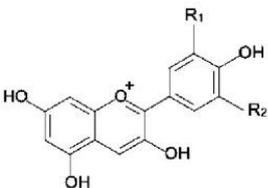
Ce sont des pigments colorés produits par les angiospermes responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines, ils forment une vaste famille de molécules aux formules chimiques très diverses (du bleu au rouge en passant par le mauve et l'orange), dépendent de leur structure et du pH du milieu intracellulaire, les anthocyanes sont synthétisées par les cellules épidermiques ou sous-épidermiques de différents organes (**Samouelian et al., 2009**).

I. Généralités sur la plante étudiée

Les anthocyanes sont les 3-O-glycosides des dérivés polyhydroxylés et polyméthoxylés des sels de flavylium (ou 2-phénylbenzopyrylium), 90% des anthocyanes sont construites autour de six anthocyanidines naturelles qui sont la pélargonidine, la cyanidine, la péonidine, la pétunidine, la malvidine et la delphinidine (**Andersen et al., 2006**).

Les structures des principales classes de flavonoïdes sont résumées dans le **Tableau IV**

Tableau IV : Structure des principales classes de flavonoïdes

	Structure chimique	Exemples	
Flavones		R1 = R2 = R3 = R4 = R6 = OCH3 ; R5 = R7 = H R1 = R7 = H ; R2 = R3 = R4 = R5 = R6 = OCH3 R1 = H ; R2 = OH R1 = R2 = OH	: Tangéretine : Sinensétine : Apigénine : Lutéoline
Flavonols		R1 = R3 = H ; R2 = OH R1 = R2 = OH ; R3 = H	: Kaempférol : Quercétine
anthocyanes		R1 = OH ; R2 = H R1 = R2 = H R1 = OCH3 ; R2 = H R1 = R2 = OH R1 = OCH3 ; R2 = OH R1 = R2 = OCH3	: Cyanidine : Pélargonidine : Péonidine : Delphinidine : Pétunidine : Malvidine

(Ranganna, 1986)

I.6.2.3. Les tannins

Ce sont des composés phénoliques, solubles dans l'eau (**Bruneton, 1993 ; Guignard, 2000**) et les solvants polaires (**Hagerman, 2002**), de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 daltons (**Paris, 1980; Bruneton, 1993 ; Bruneton, 2001**). Ils sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Scalbert, 1991**). La structure chimique des tannins présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques qui leur confèrent la propriété de former des complexes avec des macromolécules telles que des protéines et des hydrates de carbones, ou encore avec des ions métalliques (**Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992 ; Bravo, 1998**) ; Ces substances hydrosolubles de composition chimique variable

présentent un caractère commun ; celui de coaguler les albumines, les métaux lourds et les alcaloïdes. Ils sont classés en deux catégories (**Figure 3**).

a) Les tannins hydrolysables :

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol ; Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).

b) Les tannins condensés (Proanthocyanidines)

Ils se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes ; il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Ils ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux (**Bruneton, 1999**).

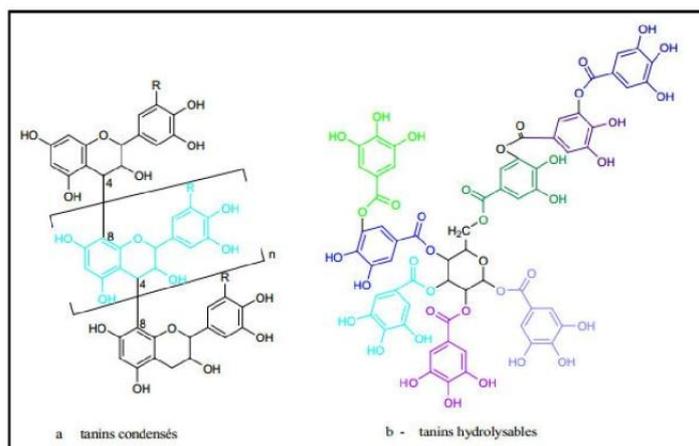


Figure 3: structures générales des deux types de tanins végétaux (**Harborne, 1988**)

I.6.2.4. Les quinones

Ce sont des noyaux aromatiques avec deux substitutions cétones. Ces composés, étant colorés, sont responsables de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connus pour se complexer de manière irréversible avec les nucléophiles des acides aminés dans les protéines. Par conséquent, les quinones inactivent les protéines et altèrent leur fonction (**Arif et al., 2009**).

I.6.3. Les alcaloïdes

Ce sont des composés organiques azotés, plus ou moins basique, d'origine naturelle le plus souvent végétale ; de structures très variées, habituellement mono ou polycycliques. L'azote est le plus souvent intracyclique et entre dans la formation d'un noyau déterminant la classification, dont les principales classes sont la tropane, la quinolizidine, l'isoquinoléine, l'indole et la quinoléine (**Figure 4**) (**Gazengel et Orecchioni, 2013**).

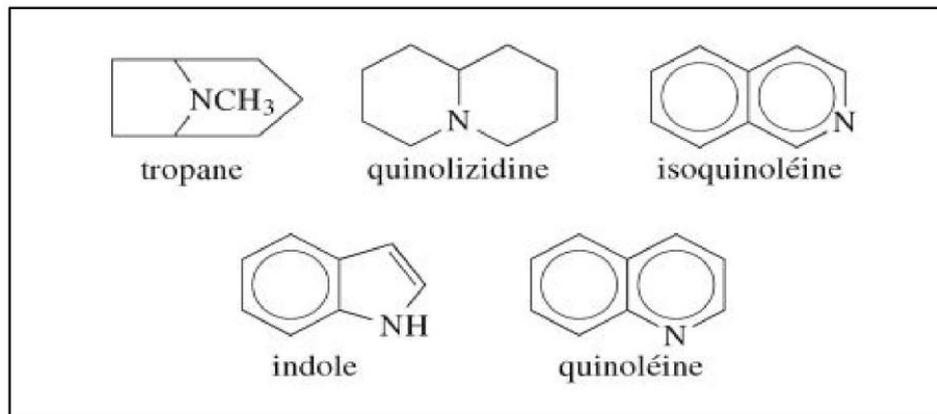


Figure 4: principales classes d'alcaloïdes (**Gazengel et Orecchioni, 2013**).

I.6.4. Les glucosides

Ce sont des produits résultants du métabolisme secondaire des plantes, constitués de deux fractions, l'une, le plus souvent inactive exerce un effet favorable sur la solubilité du glucoside et son absorption; la seconde fraction qui est la plus active, dénommée aglycone détermine l'effet thérapeutique (**Volak et al., 1987**). Les saponines font partie des glucosides les plus importantes :

- **Les saponines**

Elles constituent une vaste famille de glycosides triterpéniques ou stéroïdiens qui se trouvent dans de nombreuses plantes ; Ce sont des substances non volatiles (**Lasztity et al., 1998 ; Oleszek, 2002; Hostettmann et Mardton, 2005**) ; solubles dans l'eau et forment des solutions mousseuses. Elles sont composées de deux parties (**Figure 5**) : Une partie hydrophile, formée d'un ou de plusieurs sucres et une partie aglycone et lipophile (dite saponogénine), qui est soit un résidu de triterpène, soit un résidu de stéroïde (**Dacosta, 2003**).

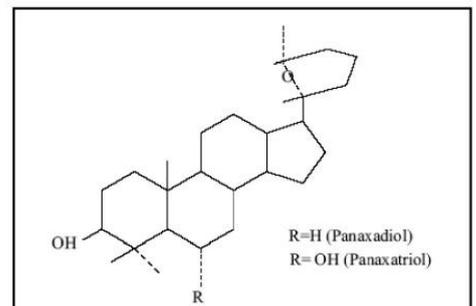


Figure 5 : Structure générale des saponines (**Packer, 2001**)

II. Généralités sur *Solenostemma argel*

II.1 Introduction

Le cynanque à feuille d'olivier (*Solenostemma argel*) appartient aux asclépiadaceae (Ozenda, 2004), une sous-famille dans les apocynaceae (Endress et Bruyans, 2000), cette famille comprend de nombreuses plantes spontanées connues pour contenir des métabolites secondaires tel que les saponines, les glycosides, les tanins, les coumarines, les flavonoïdes, les acides phénols et les terpenoïdes qui sont nécessaires à la fabrication de produits pharmaceutiques importantes (Aeri, 2007 ; Sayadat et Shaza, 2009) .

II.2 Classification

La classification adoptée est basée sur le système APGIII (Angiosperm phylogenic Group) établie en 2009 (Chase et Reveal, 2009).

◆ Règne	Plantae
◆ Embranchement	Spermaphytes
◆ Sous embranchement	Angiospermes
◆ Classe	Lamiidée ou Euastéridées I
◆ Ordre	Gentianales
◆ Famille	Apocynacées
◆ Sous famille	Asclépiadacées
◆ Genre	<i>Solenostemma</i>
◆ Espèce	<i>Solenostemma argel</i> (Del.) Hayne

II.3 Synonymes et noms vernaculaires

- **Synonymes**

Solenostemma argel possède trois synonymes :

Cynanchum argel , *cynanchum oleifolium* (Hanelt et Kilian, 2001) et *solenostemma oleifolium* (Nectoux et al., 1953 in Boulos, 2000)

- **Noms vernaculaires**

Plusieurs noms sont attribués à *Solenostemma argel* nous citons :

En arabe : Hargel الحرجل (Boulos, 1983).

En Tamahaq : Arellachem (Hammiche et Maiza, 2006).

En français : cynanque à feuille d'olivier ou Arguel de Nubie (Laissus, 1995).

II.4. Description botanique

Solenostemma argel fait partie d'une importante famille tropicale, peu représentée au Sahara septentrional, mais compte déjà une dizaine d'espèces dans le Sahara central (Ozenda, 2004) où environ 1700 espèces ont été décrites (Bonnier, 1990). Ce sont généralement des arbres, arbustes, lianes, herbacées, succulentes (Quezel et Santa, 1963) à tissu sécrétant un latex (Ozenda, 2004).

II.4.1 Tiges

C'est une plante de port très variable (Ozenda, 2004), suffrutescente pouvant dépasser un demi-mètre (Figure 6), à tiges glauques, peu ramifiées, en touffes (Amblard-Pison, 1996).

II.4.2 Feuilles

Les feuilles sont grandes lisses lancéolées, pubescentes, verticillées par 4, à nervure médiane jaune, brièvement pétiolées opposées et un peu épaisses (Figure 7), d'une couleur vert amande (Benchelah et al., 2004 ; Khandelwal, 2008 ; Orbigny, 2009); renfermant un latex fortement purgative (Golse, 1955).

II.4.3. Inflorescence et fleur

L'inflorescence est blanche, en cyme ombelliforme très denses à l'aisselle des feuilles supérieures (Figur 8) (Quezel et Santa, 1963 ; Benchelah et al., 2004 ; Ozenda, 2004). Les fleurs sont regroupées, régulières de près de 1cm de long, pentamère (Ozenda, 1977; Amblard-Pison, 1996 ; Ozenda, 2004), la corolle est blanche à pétales dressées, étroites (Figure 9) et d'une odeur très forte, couronne staminale à cinq lobe entourant la base de gynostège (Ozenda, 2004 ; Batanouny, 2005). Les étamines elles même sont soudées en partie à la région stigmatique de l'ovaire et l'ensemble forme le gynostège, le pollen n'est pulvérulent mais aggloméré sous forme de masse correspondant chacune au contenu d'une loge d'anthere, le pistil comprend deux carpelles libres dans leur partie ovarienne et soudés entre eux au niveau du gynostège (Ozenda, 2004).



Figure 9 : Fleur de *Solenostemma argel*

II.4.4 Fruits

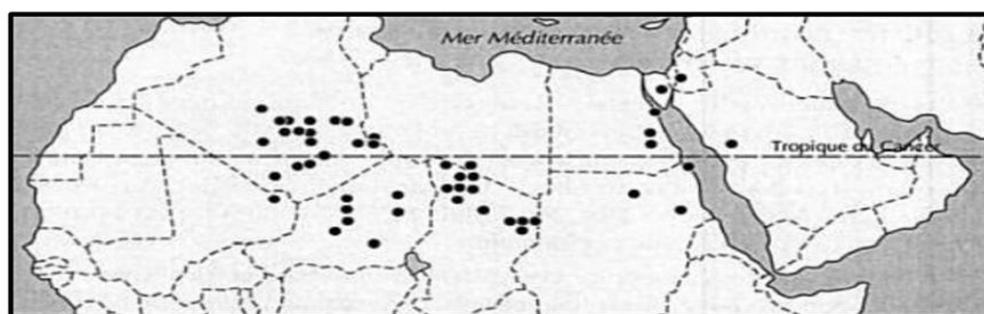
Les fruits sont des follicules épais, pyriforme de 5cm de long et 1.5 – 2 cm de large, de couleur verte avec des tâches violettes (**Figure 10**) à surface lisse (**Ozenda, 2004 ; Batanouny, 2005**). Après maturation, ils prennent une couleur noirâtre (**Figure 11**) et libèrent des graines à aigrette, pyriformes, arquées, couvertes de rugosités et de ponctuations (**Figure 12**) (**Sitouh, 1989 ; Amblard-pison, 1996**).

II.4.5 Système racinaire

Solenostemma argel possède un système racinaire pivotant avec des racines principales qui peuvent atteindre 2m de long ; la longueur du système racinaire est en fonction du substrat pédologique et de la profondeur des réserves hydriques, liés aux facteurs écologiques de son aire de répartition (**Benzid, 2012**)

II.5. Distribution géographique et écologie

Solenostemma argel est une plante venant du Tibesti, poussant au pied des éboulis rocheux (**De pommerol, 1999**), elle est assez répandue au Sahara centrale et remonte au nord jusqu'au Tadmait (**Figure 13**) (**Ozenda, 2004**). Elle est naturellement peu exigeante et s'accommode aux sols caillouteux des oueds et pierreux des regs (**Tarbut, 1935**) et pousse dans des conditions extrêmement sèches avec des averses annuelles autour de 50mm à 100mm (**Batanouny, 2005**). Elle affectionne les petits ravins, les pentes rocheuses qui bordent les oueds, ainsi que le lit des oueds, elle est présente en Algérie méridional (Hoggar), au Mali, au Niger (Air), en Lybie, au Tchad (Tibesti, Ennedi), au Soudan, en Égypte-sud de la mer morte et en Arabie Saoudite (**Giazzi, 1996**).



● *Solenostemma argel*

Figure 13 : répartition géographique de *solenostemma argel* (**Lebrun, 2001**)

I.7.6 Utilisation traditionnelle

Solenostemma. argel est une plante aux usages multiples : antiseptique, anti-inflammatoire et fébrifuge (**Coudou-David, 2012**), elle est employée en décoction dans du lait ou en infusion pour traiter les affections de l'appareil respiratoire (**Carvalho et Gillet, 1960**). Elle est susceptible de soigner le diabète et la jaunisse, elle se boit en infusion contre les rhumatismes et les infections urinaires et en décoction pour soigner la toux (**Carvalho et Gillet, 1960 ; Amblard-pison, 1996 ; El-Kamali et Khalid, 1996**). Elle est aussi employée pour certaines maladies du foie, des reins, des allergies et comme parfum dans le traitement de la rougeole; une infusion des feuilles est utilisée pour les crampes gastro-intestinales, le mal de ventre et les coliques, elle est efficace comme antisiphilitique si elle est utilisée pendant une période prolongée (40-80 jours) (**Boulos, 1983 ; Hammiche et Maiza, 2006**). Après séchage sous la cendre pendant une minute, la plante est secouée, nettoyée puis placée dans la théière avec de l'armoise ou une autre plante pour dégager les sinus (**Gillet, 1968**). Parmi les maladies les plus fréquentes chez les Touaregs, les rhumatismes, les myalgies et les névralgies dans le domaine sciatique ; ces affections sont d'ailleurs désignées par les Touaregs sous le nom de 'Tesmedée', qui signifie maladie du froid ; Les touaregs utilisent les propriétés thérapeutique de *Solenostemma argel* de différentes manières : après récolte de la plante , elle est séchée dans un endroit abrité , puis mélanger avec des dattes ou avec la bouillie de farine (Alioua ou Esink) , après que le malade prend ce remède, se met à l'abri du vent et se couvre entièrement jusqu'à ce qu'il soit en sueur ; il fait ensuite une onction avec le beurre fondu (**Benzid, 2012**). Pour la bronchite, ils emploient la plante dans une marmite en métal avec de l'eau chauffé en y plongeant des cailloux retirés du feu ; le malade se couvre et respire au-dessus de la marmite, la vapeur qui s'élève le fait éternuer chassant les mucosités du nez, il consomme des aliments chauds additionnés de poivre, se couvre de ses vêtements et s'endort (**Foley, 1995**). En usage externe, le latex visqueux des tiges aide à la cicatrisation des plaies (**Coudou - David, 2012**), il est aussi appliqué comme collyre par l'utilisation d'une goutte dans l'œil pour dégager les sinus et ; les branches servent à désinfecter l'eau des ruisseaux ou des bassins (**Auzias et Abourdette, 2011**). *Solenostemma argel* est aussi souvent utilisée pour supprimer les douleurs d'accouchement en donnant aux femme pendant les deux mois qui suivent l'accouchement une bouillie appelée 'Elliwa', dans cette nourriture liquide diverses plantes sont introduites (Taguq : *Artemesia* , Tafiltast : *Myrtus nivelli* et l'aghellachem : *Solenostemma argel*) (**Chastanet, 2002**) .

I. Matériel et Méthodes

Notre expérimentation a été réalisée durant une période s'étalant du mois de Mai jusqu'au mois de Septembre 2014, au niveau :

- Du laboratoire de PFE du département de biologie de l'université de Blida 1.
- Des laboratoires de semi analyse, physico-chimie et microbiologie, ainsi qu'au niveau du service toxicologie et pharmacologie de la filiale **ANTIBIOTICAL** de l'entreprise de fabrication des produits pharmaceutiques **SAIDAL** à Médéa.
- Centre de transfusion sanguine (CTS) de Tipaza, service laboratoire.
- Laboratoire d'analyse médicale Dr Ouled Rouis, Blida

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

L'étude phytochimique et biologique a porté sur les fruits et feuilles de l'espèce *Solenostemma argel* récoltés en mois de Décembre 2013 dans la station Ain Zbib à Tamanrasset (**Tableau V**).

La reconnaissance et l'identification de la plante a été réalisée par l'équipe de recherche de l'institut national de la recherche forestière (I.N.R.F.) de Tamanrasset.

Tableau V : Situation géographique de la station de récolte obtenue par GPS*

Station de récolte	Altitude (m)	Latitude (nord)	Longitude (est)
Ain Zbib	1458	28° 48-436	05° 57-317

GPS : Global Positioning System

I.1.2. Matériel animal

La toxicité et l'activité anti-inflammatoire ont été testé sur 42 souris Albinos (**Figure 14**) répartis en 7 lots de 6 souris chacun, dans des cages en polypropylène :

- 3 lots pour l'étude de la toxicité
- 4 lots pour l'activité anti-inflammatoire

L'activité cicatrisante a été testée sur 4 lapins Albinos du laboratoire (**Figure 15**).



Figure 14 : Souris Albinos



Figure 15: Lapin albinos

Les caractéristiques du matériel animal sont illustrées dans le **Tableau VI**:

Tableau VI : les caractéristiques du matériel animal utilisé

Animal	Souris Albinos	Lapins Albinos
Race	Swiss	Californien
Poids	20 - 24 g	2300 - 2600 g
Sexe	Males et femelles	Males et femelles
Alimentation	Granules « O.N.A.B » (office nationale de l'alimentation du bétail)	
Boisson	Eau de ville (eau potable)	
Condition d'hébergement :-	20 – 24°C	
- Humidité	50 – 60%	
- Eclairage	10h	

I.1.3. Matériel microbiologique

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur 11 souches bactériennes cliniques provenant des prélèvements au niveau du laboratoire de bactériologie du CTS Tipaza et une souche fongique de référence (**Tableau VII**)

Tableau VII : Description et pouvoir pathogène des souches testées

Type de microorganisme		Espèces
Bactéries	Gram ⁻	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i>
	Gram ⁺	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus_luteus</i>
Levure		<i>Candida albicans</i> ATCC10231

I.1.4. Matériel non biologique

Le matériel utilisé au laboratoire (l'appareillage, la verrerie et les réactifs) est illustré en **Annexe I**

I.2.Méthodes

I.2.1.Préparation de la poudre végétale

Le matériel végétal (feuilles et fruits de *Solenostemma argel*) est séché à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours, puis broyés à l'aide d'un moulin à café, en poudre fine de couleur brune pour les fruits et verte pour les feuilles (**Figure 16**) qui est ensuite conservée à l'abri de la lumière dans des sachets en papiers.

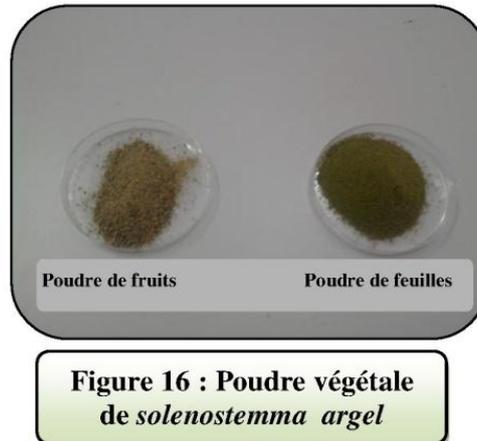


Figure 16 : Poudre végétale de *solenostemma argel*

I.2.2. Détermination du taux d'humidité

I.2.2.1. 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 l'obtention d'une masse constante (Twidwell et al., 2002) .

I.2.2.2. Mode opératoire

- Sécher les béchers dans l'étuve et les laisser refroidir puis peser leur poids.
- 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.

I.2.2.3. 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
 m_1 : masse de l'échantillon avant séchage en étuve (g).
 m : masse de l'échantillon après séchage en étuve (g).

I.2.3. Screening phytochimique

I.2.3.1. Principe

Ce test phytochimique consiste à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation ; ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

I.2.3.2. Mode opératoire

Nous avons préparé une infusion de 10g de la poudre végétale dans 100ml d'eau distillée bouillante ; Après 15min, le mélange est filtré sur papier filtre et rincé avec de l'eau distillée chaude jusqu'à l'obtention de 100ml de filtrat (**Alaoui-Boukhris, 2009**)

a) Recherche des alcaloïdes

Nous avons mélangé 5 ml d'infusé dans 3ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) et 5ml d'une solution d'iode mercurate de potassium « réactif de Valser Mayer ». En présence des alcaloïdes, la réaction donne un précipité blanc jaune (**Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001 ; Diallo, 2005**).

b) Recherche des composés polyphénoliques

❖ Flavonoïdes

Nous avons préparé une macération de 10g de poudre végétale dans 100 ml d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 1% pendant 24h. L'apparition d'une couleur jaune claire après l'ajout de quelques gouttes d'ammoniac au filtrat obtenu (NH_4OH) indique la présence des flavonoïdes (**Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001**).

❖ Anthocyanes

Nous avons ajouté 5 ml d'infusé à 5 ml d'acide chlorhydrique (HCl) à 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac (NH_4OH) indique la présence d'anthocyanes (**Paris et Moyse, 1969 ; Debray et al., 1971**).

❖ Tanins

Nous introduisons dans un tube à essais 5ml de l'infusé, nous ajoutons goutte à goutte environ 1ml de solution aqueuse diluée de chlorure de fer ($FeCl_3$) à 1% ; en présence de tanins il se développe une coloration verdâtre (tanins catéchiques) ou bleu noirâtre (tanins galliques) (**Rizk et al., 1974 ; Dohou et al., 2003**).

▪ Tanins catéchiques

A 15ml de l'infusé, nous ajoutons 7ml de réactif de Stiasny. La présence de tanins catéchiques se confirme par la formation d'un précipité rouge (**Bekro et al., 2007**).

▪ **Tanins galliques**

A 5ml d'infusé nous ajoutons 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl₃. La réaction est positive lorsque la coloration bleu foncé apparaît (**Bekro et al., 2007**).

❖ **Quinones**

▪ **Quinones libres**

Nous avons mélangé pendant 3h, 2g de poudre végétale humectées par l'acide chlorhydrique (HCl) à 1N, avec 20ml de chloroforme (CHCl₃), le filtrat obtenu est agité avec 5ml d'ammoniac (NH₄OH) ½. La formation d'une coloration rouge en présence des quinones libres (**Bekro et al., 2007**).

▪ **Quinones combinés**

Nous avons porté à reflux, 2g de poudre végétale dans 5ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) 2N pendant 2h; la solution extractive est filtrée puis épuisée par 20ml de chloroforme, la solution chloroformique est évaporée à sec (au bain marie sous hotte ventilée). L'addition de l'ammoniac (NH₄OH) donne une coloration rouge en présence des quinones combinées (**Bekro et al., 2007**).

❖ **Coumarines**

Nous avons porté à reflux 2g de poudre végétale dans 20ml d'alcool éthylique (éthanol : C₂H₆O), pendant 15min puis filtré ; à 5ml du filtrat nous avons ajouté 10 gouttes de la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 10%, et quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) à 10% ; la formation d'un trouble indique la présence des coumarines (**Bruneton, 1999**).

c) **Recherche des glucosides**

Nous avons ajouté quelques gouttes d' d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 2g de poudre végétale ; la formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides (**Dif, 2011**).

❖ **Saponines**

Nous avons agité 10ml de l'infusé agité pendant 15 secondes, puis laissés au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieur à 1 cm indique la présence de saponines (**N'Guessan et al., 2006**).

d) **Recherche des composés réducteurs** 1 ml de l'extrait est chauffé dans un bain marie, puis 200 µl de réactif de Fehling est ajouté à l'extrait. Un test positif est obtenu par la présence d'un précipité rouge brique (**Bekro et al., 2007**).

e) Recherche des mucilages

Nous introduisons 1ml de l'infusé dans un tube à essai, puis nous ajoutons 5ml d'alcool absolu. La formation d'un précipité floconneux blanc montre la présence des des mucilages (**Paris et Moyse, 1976**).

f) Recherche des terpènes

Nous avons mélangé 5ml d'infusé avec 5ml d'acide phosphomolybdique ($H_3Mo_{12}O_{40}P$) et 5ml d'acide sulfurique H_2SO_4 concentré (96%). l'obtention d'une couleur bleu montre la présence de terpène (**Gherib, 1988**).

1.2.4. Etude toxicologique

Avant d'examiner l'activité thérapeutique d'une plante ou de ses constituants, il est nécessaire de connaître sa toxicité (**Meyer, 1977**).

La méthode de détermination de la toxicité des extraits aqueux des fruits et des feuilles de *Solenostemma argel* suivie reprend la ligne directrice 423 de l'OCDE (**Organisation for Economic Cooperation and Development**), c'est : le test limite de toxicité.

a) Principe :

un essai limite de toxicité est effectué en administrant une dose unique de 2g/Kg du poids corporel, à un lot de 6 souris.

b) Mode opératoire :

Pour réaliser ce test 3 lots de 6 souris chacun dont le poids varie entre 20 et 24 g sont préparés :

- Un lot témoin recevant de l'eau distillée
- Deux lots expérimentaux recevant les extrait aqueux des fruits et feuilles à la dose de 2 g/Kg du poids corporel.

La préparation des solutions administrées est indiquée en **Annexe II**.

Les souris sont privées de nourriture 4h avant l'expérimentation, l'eau n'est pas limitée. La solution préparée de la poudre des fruits de *Solenostemma argel* est administrée aux souris du lot expérimental par voie intragastrique (orale) à la dose de 2 g/Kg du poids corporel sous un volume de 0,5 ml par souris.

L'observation d'éventuels effets toxiques en l'occurrence le nombre de mortalité se font tous les jours et ceux pendant 14 jours.

I.2.5.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Le test de susceptibilité des extraits aqueux est effectué selon la méthode de diffusion en milieu solide.

a) Principe

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

b) Mode opératoire

- Les souches bactériennes utilisées sont isolées à partir de prélèvements pathogènes destinés pour les examens cyto bactériologiques des urines (ECBU) et conservées sur la gélose nutritive.
- les boîtes de pétri sont préparées par liquéfaction des milieux de culture au Bain-marie, puis coulées aseptiquement devant la flamme du bec benzène à raison de 33 ml par boîte et laissées refroidir.
- Une suspension bactérienne est préparée en introduisant une colonie bien isolée issue d'une culture à l'aide d'une anse en platine stérile dans 10ml d'eau physiologique contenue dans un tube à essai, la suspension est homogénéisée à l'aide d'un vortex. La turbidité de cette suspension est mesurée à l'aide d'un turbidimètre et ajustée à 0,5 Mc Farlan.
- Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, et à l'aide d'un écouvillon trempé dans la suspension, la surface entière de la gélose est étalée à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour avoir une distribution égale de l'inoculum.
- Des disques de papier wathman de 9mm de diamètre stérile (stérilisation à 120°C pendant 15min par autoclavage) sont prélevés aseptiquement à l'aide d'une pince stérile, le bout des disques est mis en contact avec l'extrait jusqu'à son imbibition totale, le disque est ensuite déposé sur la surface de la géloseensemencée par les microorganismes à tester puis laissés diffuser sur la paillasse pendant 30min. L'incubation est faite à 37°C durant 24h pour les bactéries et à 25°C durant 48h pour la levure. La Gentamicine (15 µg/disque) et l'Amphotéricine B (20µg/disque) ont servi de témoins positifs afin de contrôler la sensibilité des micro-organismes d'essai. Les tests ont été effectués en triple.

c) Lecture des résultats

Après incubation, l'activité inhibitrice des extraits se traduit par des zones circulaires translucides sur le fond opaque de la boîte de Pétri (**Figure 19**). Le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque est mesuré à l'aide d'un double décimètre ce qui permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés en adoptant la méthode de (**Chifundera et al., 1990**) appliquée aux antibiotiques :

- Diamètre compris entre 0 et 9 mm : souche résistante.
- Diamètre compris entre 10 et 15 mm : souche peu résistante.
- Diamètre compris entre 16 et 20 mm : souche sensible ou intermédiaire.
- Diamètre plus de 20 mm : souche très sensible.

I.2.5.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

La mise en évidence de l'effet anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode d'œdème de patte à la carraghénine établie par **Levy (1969)**.

a) Principe

L'inflammation de l'œdème de la souris provoquée par application locale de carraghénine à 0.1% peut être réduite par application de substances anti-inflammatoires, cette inflammation est la conséquence de l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui est à l'origine de l'œdème suite à une diffusion liquidienne dans les tissus voisins, le rôle du produit anti-inflammatoire est la limitation de la perméabilité vasculaire.

b) Mode opératoire

Une dose d'extrait aqueux est testée (0,1g/ml), l'efficacité du produit est appréciée en comparaison avec le Témoin positif (Diclofénac de sodium) pris comme référence. 5 lots de 6 souris chacun sont constitués, la répartition des lots est représentée dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII: La répartition des lots de souris pour le test de l'effet anti-inflammatoire

Designation des lots	1	2	3	4
Nature de Produit	Eau physiologique	Diclofenac de Sodium	Extrait aqueux des fruits	Extrait aqueux des feuilles
Dose		0.01 mg/ml	0.1g/ml (10%)	0.1g/ml (10%)
Voie d'administration	Voie Orale (Gavage)			

- **À T0** : administration par voie orale (gavage) la dose de 0,5ml du produit à tester

(Extraits aqueux des fruits, extrait aqueux des feuilles, eau physiologique et solution de Diclofenac) équivalente pour chaque lot

➤ **Après 60 min** : induction d'une inflammation aigue par injection de 0,02 ml de carraghénine à 0.1%, dans l'eau physiologique, sous la peau de la plante de la patte postérieure gauche de la souris.

La mesure du volume de la patte, avant, pendant et à l'issue de l'inflammation locale se fait habituellement à l'aide d'un pléthysmomètre (**Rahman et al., 2001**), ne disposant pas de cet appareil, un pied à coulisse précis au 1/50^{ème} de millimètre est utilisé, les mesures sont faites au niveau de l'articulation tarso-métatarsienne des pattes postérieures gauches (PPG) des souris, dans le sens antéropostérieur et suivant l'ordre :

- Une mesure des épaisseurs initiale des pattes.
- Une mesure immédiatement après injection de carraghénine pour tenir compte de l'enflamment due au volume injecté.
- Des mesures toutes les 30 min pour suivre l'évolution de l'inflammation jusqu'à 210 min

c) Lecture des résultats

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins (**Rahman et al., 2001**), selon la formule suivante :

$$\% \text{ Red} = \frac{\% \text{ AUG t} - \% \text{ AUG e}}{\% \text{ AUG t}}$$

% Red : % de réduction de l'œdème
 % AUG t : % de l'œdème témoin
 % AUG e : % de l'œdème essai

Le pourcentage d'augmentation de l'œdème de la patte de souris est donné par la formule :

$$\% \text{ AUG} = \frac{E_t - E_0}{E_0}$$

% AUG : pourcentage d'augmentation de l'œdème
 E_t : Epaisseur de la patte au temps t
 E₀ : épaisseur initiale de la patte

Les résultats sont exprimés en moyenne du diamètre de Pattes postérieurs gauches PPG ± écart-type, la signification statistique est déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie par le test post-hoc de Tukey pour comparaison par paires, $P < 0.05$ a été considérée comme différence significative, l'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT.

I.2.5.3. Evaluation de l'activité cicatrisante

La recherche de la propriété cicatrisante des fruits de *Solenostemma argel* est réalisée selon le protocole suivi par **Pourrat (1993)**.

a) Principe

Ce test consiste à évaluer l'activité cicatrisante de deux crèmes formulées à base de fruits et à base de feuilles de *solenostemma argel* sur des sacrifices cutanées profondes à la limite de saignement chez les lapins.

❖ Préparation officinale et conditionnement de la crème dermique

La formule de base sur laquelle nous avons travaillé est inspirée du formulaire thérapeutique magistral (**Fonteneau et Klusiewicz, 2008**).

La composition des crèmes est résumée dans le tableau suivant :

Le protocole de fabrication est celui d'une émulsion classique selon le mode Opérateur suivant :

- Pour la préparation de la phase huileuse, nous avons déposés dans un bécher, la quantité appropriée d'huile de vaseline, d'acide stéarique, de cire blanche et des tensioactifs (acide stéarique et alcool stéarylique).

- Pour la préparation de la phase aqueuse, nous avons laissé macérer, 10g de poudre végétale dans 100ml d'eau distillée pendant 24h, le filtrat obtenu est mis dans un bécher.

- Nous avons porté les 2 béchers (phase huileuse et la phase aqueuse) au bain marie à 70°C jusqu'à fusion complète des composés. Nous avons versé la phase aqueuse dans la phase huileuse par des petites fractions sous une agitation rapide à l'aide d'un pied mixeur jusqu'au refroidissement. Sous une homogénéisation continue et à une température ambiante (25-30°C), nous ajoutons le conservateur méthyle parabène à 0,005%.

Le conditionnement se fait en pot.

b) Contrôles physico-chimiques des crèmes cicatrisantes

Une grande diversité de contrôles a été nécessaire pour définir les caractéristiques des préparations topiques obtenues selon des méthodes homologuées. (**Le Hir et Cohen, 2001 ; Brochette, 2006 ; Wehler, 2007**)

❖ Contrôle des caractères organoleptiques

Les propriétés organoleptiques regroupent tout ce qui est perceptible par les sens : aspect, couleur, odeur et toucher. L'examen macroscopique concerne également la recherche d'une opacité ou d'une texture particulière.

❖ Contrôle de l'homogénéité

Une certaine quantité de crème est étalée sur une lame puis recouverte d'une lamelle pour une observation microscopique. Ce test permet d'apprécier l'homogénéité de l'émulsion.

❖ **Mesure du pH**

Pour connaître le pH de la pommade, 5g de cette dernière sont triturés avec de l'eau distillée dont le pH est ensuite mesuré par un pH mètre.

c) **Contrôle microbiologique des crèmes cicatrisantes**

Les analyses microbiologiques ont pour but de rechercher les germes responsables de toute contamination du produit fini (pommade), le protocole suivi est celui énuméré par la **Pharmacopée Européenne 2014**.

❖ **Préparation de l'échantillon :**

10g de crème 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 aux 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.

❖ **Dénombrement 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 Salmonelles :**

A partir du milieu liquide (BS), 0,1 ml est prélevé dans un tube contenant 10 ml du milieu Rappaport Vassiliadis puis incubé à 35°C pendant 24h, après incubation, une subculture est réalisée dans le milieu gélosé XLD et incubé à 35°C pendant 48h.

❖ **Recherche de *Staphylococcus aureus* :**

Une subculture est réalisée sur milieu gélosé Chapman à partir du milieu liquide (BS) précédemment ensemencé et incubée à 35°C pendant 72h. 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 soja (BS) précédemment ensemencé, une culture sur milieu gélosé cétrimide agar base (CAB) est réalisée puis incubée à 35°C pendant 72 h. L'apparition des colonies verdâtres et le virement de couleur du milieu de culture confirme la présence de *pseudomonas aeruginosa*

❖ Recherche d'*Escherichia coli* :

1 ml du milieu liquide Soja (BS) est prélevé dans un tube contenant 9ml du milieu Mac conkey, ce dernier est incubé à 42°C pendant 48h. Un repiquage est effectué sur le milieu gélosé Mac conkey (MCA) et incubé 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 (UFC), le produit est déclaré conforme 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
- Salmonelle (-) : absence
- *Staphylococcus aureus* : absence
- *Pseudomonas aeruginosa* : absence
- *Escherichia coli* : absence

Le protocole suivi dans le contrôle microbiologique des crèmes dermiques est résumé dans la figure suivante

d) Essai pharmacologique de la pommade

e) Évaluation de l'activité cicatrisante in vivo de la crème cicatrisante

Ce test a été réalisé in vivo chez des lapins Albinos. Il a pour but l'évaluation de la potentialité de la néoformation des tissus dermiques après l'application quotidienne d'une crème à base de fruits et feuilles de *Solenostemma argel*. La lecture des résultats a été faite en comparaison avec :

- un produit de référence Madécassol (*Centella asiatica*) ou le principe actif est Acide asiaticoside 1 %

- un groupe traité uniquement par l'excipient exempt de principe actif (vaseline).

L'essai s'effectue sur 4 lapins albinos de race californienne, ces derniers ont subi une épilation de part et d'autre de l'axe vertébral, 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, 3 scarifications parallèles ont été effectuées par excision de la peau avec un scalpel. Chaque plaie présente une taille de 5cm, L'application des crèmes s'effectue quotidiennement pendant 14 jours sur les plaies provoquées après délimitation des zones

Chaque animal est placé dans une cage individuelle. Il recevra de la nourriture et de l'eau durant tout le traitement jusqu'à la cicatrisation totale.

L'observation macroscopique est réalisée avant chaque nouvelle application.

Une échelle de cotation (**Tableau IX**) a été établie pour suivre l'évolution du processus de cicatrisation. Elle prend en considération les paramètres suivants :

- évolution de la surface de la plaie (échelle graduée en 4)
- apparition ou non d'œdème.

Tableau X: Echelle de cotation de l'effet cicatrisant

	Profondeur	œdème
0	profondeur nulle	Pas d'œdème
1	légèrement creusée	Très léger œdème
2	peu profonde	œdème visible
3	Assez profonde	œdème moyen
4	très profonde	œdème grave

Pourrat (1993)

Le protocole expérimental est résumé dans la **Figure 22**.

II.2.5.4 Evaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations par rapport aux substrats oxydables, retardent ou stoppent le processus d'oxydation. Pour évaluer l'activité antioxydante, in vitro des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs, par transfert d'atome d'hydrogène ou par

transfert d'électron. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, il est recommandé d'utiliser plusieurs tests pour confirmer une activité antioxydante (**Prior et al., 2005**). C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de deux tests chimiques : le pouvoir réducteur du fer (**F.R.A.P**) et le piégeage du radical 1,1-diphenyl -2-picrylhydrazyl (**DPPH**).

a) Pouvoir réducteur du fer (F.R.A.P)

➤ Principe

Le pouvoir réducteur, mesure la capacité d'un antioxydant à donner un électron (**Hubert, 2006**) ; la détermination du pouvoir réducteur est réalisée selon la méthode d'**Oktay et al., (2003)**. La réduction de l'ion ferrique Fe^{+3} en ion ferreux Fe^{+2} est mesurée par l'intensité de la solution bleu vert qui en résulte. Celle-ci absorbe à une longueur d'onde de 700nm. Une augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé (**Hubert, 2006**).

➤ Mode opératoire

1ml de l'extrait aqueux à différentes concentrations (de 0.2% jusqu'à 2%) est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes. Ensuite, 2.5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutées pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 min.

2.5ml du surnageant sont mélangés avec 2.5ml d'eau distillée et 0.5ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparée à 0.1%.

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

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé (**Hubert, 2006**).

➤ Lecture des résultats

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

b) Piégeage du radical libre DPPH

➤ Principe

Le DPPH est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. A température ambiante, le radical DPPH présente, en solution alcoolique, une

intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons (**Figure 24**). Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (**Masuda et al., 1999**).

➤ Mode opératoire

Le test du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Mansouri et al., (2010)**. Pour la mesure de l'activité, 0.1 ml de l'extrait à testé à différentes concentrations (de 0.2% jusqu'à 2%) est mise en présence de 3.9ml de la solution méthanolique de DPPH (solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol absolu). Le mélange est placé pendant 30 mn à l'obscurité pour réagir et l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait). L'antioxydant de synthèse utilisé est l'acide ascorbique.

➤ Lecture des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$PI\% = \frac{DO \text{ Blanc} - DO \text{ Echantillon}}{DO \text{ Blanc}} \times 100$$

PI: pourcentage d'inhibition.

DO Blanc : absorbance du témoin négatif (sans l'extrait)

DO extrait: absorbance de l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI50). Une faible valeur de CI50 correspond à une grande efficacité de l'extrait.

II. Résultats et discussion

II.1. Taux d'humidité de la matière végétale

Le taux d'humidité de la matière végétale (fruits et feuilles de *Solenostemma argel*), est donné dans le tableau suivant :

Tableau XI : Taux d'humidité de la matière végétale

	Poids de la matière végétale [Pi] (g)	Poids de la matière après séchage [P] (g)	Taux d'humidité de la matière végétale
Fruits	5.0000	4.5754	8.49 %
Feuilles	5,0001	4,6000	8

Le taux d'humidité des feuilles sèches du cynanque à feuille d'olivier est de 8%, il est pratiquement identique à celui des fruits (8.49 %) ; ces derniers sont nettement inférieur à 12%, ce qui indique que la matière végétale a été correctement séchée et conservée, et par conséquence, les résultats des analyses phytochimiques sont fiable (Audigie et al., 1978 ; Candaele, 2008).

II.2. Screening phytochimique

Les résultats de ces tests effectués sur les feuilles et les fruits de la plante étudiée *Solenostemma argel* sont regroupés dans le **Tableau XII**

Tableau XII: Les résultats des tests phytochimiques de *Solenostemma argel*

Composés		Feuilles	Fruits	
Composés phénoliques	Alcaloïdes	-	+	
	Flavonoïdes	+	+	
	Anthocyanes	+	+	
	Tanins		+	+
		Tanins catéchiques	+	+
		Tanins galliques	+	+
	Quinone	Quinones libres	-	-
		Quinones combinés	-	-
	Coumarines	-	-	
	Glucosides	-	+	
	Saponines	+	+	
	composés réducteurs	+	+	
Mucilages	+	+		
Terpènes	-	-		

+ : présence - : absence

D'après les résultats obtenus, nous remarquons dans nos deux extraits aqueux (extrait des fruits et extrait des feuilles) la présence de quelques composés phénoliques, à savoir : les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins (catéchiques et galliques) ; la présence des saponines, les composés réducteurs, ainsi que les mucilages. Contrairement, la recherche des quinones (libres et combinés), des coumarines, et des terpènes s'est révélée négative. De plus, la recherche des alcaloïdes et des glucosides s'est révélée positive uniquement pour les fruits.

Les résultats de cette étude ont révélé la présence des composés phénoliques dans les deux extraits aqueux des feuilles et fruits du cynanque à feuille d'olivier, Cela est probablement lié aux conditions climatiques de l'habitat (température élevée, forte exposition solaire, sécheresse et salinité), qui stimulent la biosynthèse de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques. En effet, le contenu phénolique d'une plante dépend d'un nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (l'environnement) (**Rapisarda et al., 1999; Fratianni et al., 2007**).

Nos résultats concordent avec ceux trouvés dans d'autres études sur les parties aériennes de *Solenostemma argel*, et qui ont montré la présence des flavonoïdes, des anthocyanes, des tannins, glucosides, mucilage. (**khalid et al., 1974 ; EL Fishawy, 1976 ; Mahran et al., 1967 ; Younis, 1988 ; Hamed, 2001 ; Kamel, 2003**).

De plus, l'étude phytochimique menée sur les fruits de *Solenostemma argel* dans l'étude de **Brenkia (2013)**, a permis de quantifier par spectrophotométrie UV-visible les teneurs absolues des aglycones flavoniques (**0.6 mg/g**), des C-glycosides (**0.8 mg/g**), des anthocyanes (**1.90 mg/g**) ; et de révéler et d'identifier par Chromatographie Liquide à Haute Performance (H.P.L.C), la composition phénolique de chaque famille (les flavones-flavonols : la quercétine, la catéchine, l'epicatechine, l'apiginine, l'orientine ; les acides phénols : l'acide protocatéchique, l'acide syringique). Ainsi le dosage spectrophotométrique des feuilles de *solenostemma argel* dans l'étude de **Lourci (2013)** a révélé les teneurs absolues des Aglycones flavoniques (**1.07 mg/g**), des C- glycosides : (**0.8 mg/g**), et anthocyanes : (**1.5mg/g**)

II.3. Résultats de l'étude toxicologique

Les résultats du test limite sont résumés dans le **Tableau XII**

Tableau XIII: Résultat du test limite de toxicité des extraits aqueux

	Produit administré	Nombre d'animaux par lot	Nombre de mortalité	% de mortalités
Lot témoin	Eau physiologique	6 souris	0	0
Lot essai 1	Infusé des fruits (2g/kg du poids corporel)	6 souris	0	0
Lot essai 2	Infusé des feuilles (2g/kg du poids corporel)	6 souris	0	0

Au cours de notre étude sur la toxicité aiguë et selon les conditions expérimentales, aucun trouble de comportement n'a été observé, nous pouvons dire que la dose utilisée de 2g/kg de l'infusé des fruits et de l'infusé des feuilles n'a révélé aucune mortalité, ce qui nous permet de dire que la DL50 est supérieure à 2g/kg.

Ces résultats confirment l'innocuité de la forme traditionnelle d'utilisation (infusé) de *Solenostemma argel* et concorde avec celles obtenues par **Shyoub et al.,(2013)** qui a décrit cette plante comme étant médicinale non toxique.

Cependant, l'extrait mucilagineux des fruits de *solenostemma argel* dans l'étude de **Brenkia (2013)** s'est révélé peu toxique avec une DL50 de 6.83mg/kg chez les souris, ainsi, l'évaluation de la toxicité chronique de *Solenostemma argel* par **Shayoub (2004)** réalisée sur sept jeunes chèvres qui ont reçu une dose 5g/kg d'un infusé des feuilles une fois par jour pendant 45 jours, n'a révélé aucun changement significatif dans le poids des organes vitaux, par contre les examens histologiques ont révélé des anomalies des tissus (une hyperémie des tissus intestinaux, infiltration lymphocytaire, nécrose des tissus hépatocytes centrolobulaires et vacuolisation cytoplasmique; nécrose tissulaire rénale). les examens biochimiques ont aussi montré des taux élevés dans les concentrations sériques d'urée, de phosphore inorganique, de la créatinine, calcium, des protéines totales et de l'albumine, les phosphatases alcaline et de l'aspartate amino-transférase

II.4. Résultats de l'étude des activités biologiques

II.4.1.Résultat de l'activité microbiologique

L'étude du pouvoir antimicrobien antimicrobienne des extraits aqueux des feuilles et des fruits étudié in vitro par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé solide (Muller et Hinton). L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle de mesure mise en place par **Chifundera et al., (1990)**.

Le **Tableau XIV** extrapole les résultats obtenus :

Les diamètres ont été calculé avec le disque.

Tableau XIV : Résultats de l'activité antimicrobienne

		Extrait aqueux des fruits (mm)	Extrait aqueux des feuilles (mm)	Antibiotiques de référence (mm)
Bactéries Gram (-)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	09	14	16
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	11	17
	<i>Escherichia coli</i>	20	18	20
	<i>Serratia marcescens</i>	15	15	12
	<i>Morganilla morganii</i>	11	15	18
	<i>Salmonella thyphimurium</i>	17	12	16
	<i>Psoeudomonas aeruginosa</i>	09	11	19
Bactéries Gram (+)	<i>Staphylococcus épidermidis</i>	09	09	18
	<i>Stapyilococcus aureus</i>	11	09	17
	<i>Bacillus subtilis</i>	09	11	15
	<i>Micrococcus luteus</i>	11	09	22
Levure	<i>Candida albicans</i>	09	09	19

● : Souche sensible ou très sensible.

● : Souche peu sensible.

○ : Souche résistante.

- L'extrait aqueux des fruits a montré une activité modérée sur quelques souches à savoir : *klebsiella pneumoniae* , *Serratia marcescens*, *Morganilla morganii*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*. La plus forte activité a été obtenue contre *Escherichia coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de croissance de 20mm ce qui est similaire à celui de l'antibiotique de référence Gentamicine ; ainsi contre *Salmonella thyphimurium* avec un diamètre de zone d'inhibition de croissance de 17mm et qui est légèrement supérieur à celui du Gentamicine.
- L'extrait aqueux des feuilles a aussi montré une activité sur toutes les souches bactérienne testée excepté, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, et *Micrococcus luteus* . La plus forte activité a été obtenue contre *Escherichia coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de croissance de 18 mm.

- Aucun des deux extraits n'a montré une activité contre la souche fongique *Candida albicans*

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par **Abd Elhady et Ouf, 1993** et **Abdel-Moneim et al .,(2009)** qui ont travaillé sur l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques et aqueux de *Solenostemma argel* sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* , *pseudomonas aeuginosa*, *Salmonella typhimurium* et *Candida albicans* .

Tharib et al .,(1986) ont trouvé que l'extrait de saponines de *Solenostemma argel* possède une activité antimicrobienne contre différentes bactéries Gram+ et bactéries Gram-, ceci est confirmé aussi par l'étude de **Abd Elhady (1994)** sur les extraits chloroformiques et méthanolique de la même espèce. De plus, l'activité antibactérienne de deux glycosides isolés de notre plante, a montré une très bonne activité contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (**Shafek et al., 2012**)

D'après **Wagner et Bladt (1996)** ; **Shan et al.,(2007)** , l'activité d'une substance végétale dépend aussi de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs ; le choix du protocole d'extraction et plus particulièrement celui du solvant est très important, en effet, selon sa polarité, les composés extraits ne sont pas les mêmes (**Klervi, 2005** ; **Cavin, 2007**).

Ce test est rapide et simple à effectuer, cependant, il serait judicieux de mettre en place des tests antibactériens avec la méthode de dilution afin d'avoir des résultats plus rigoureux et plus objectifs. En outre il faudrait pousser plus loin l'investigation sur les activités antibactériennes, d'une part en testant les extraits sur d'autres souches et d'autre part en fractionnant d'autres extraits car il y aurait dans les extraits non fractionnés des composés inhibiteurs masquant les composés actifs (**Klervi, 2005** ; **Cavin, 2007**).

II.4.Résultat de l'activité inflammatoire

L'évolution des épaisseurs moyennes de pattes postérieures gauches des souris de chaque lot est illustrée dans la **Figure 24**

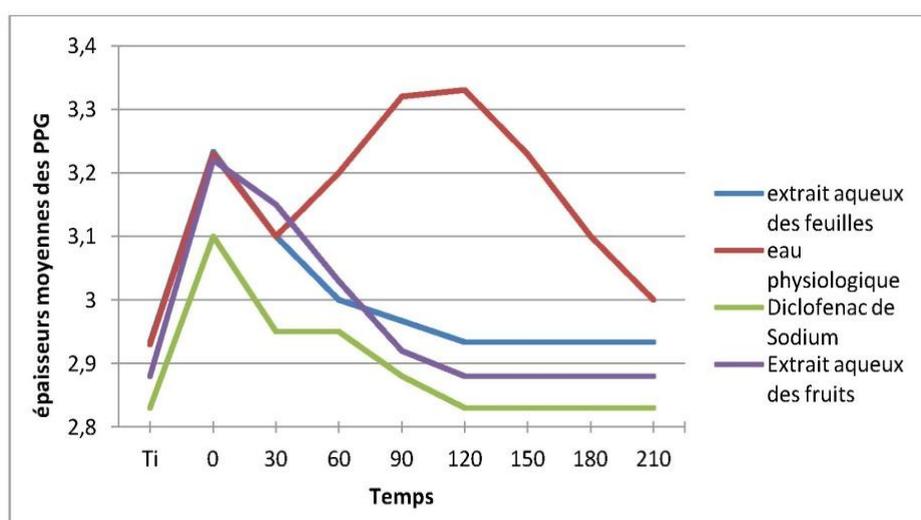


Figure 24 : Evolution moyenne de l'inflammation des pattes en fonction du temps

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème des pattes de souris traitées par rapport au témoin négatif (eau physiologique) et au témoin positif (Diclofenac de Sodium)

Le pourcentage d'augmentation de l'œdème est représenté dans le Tableau XVI/ AnnexeIII, et le pourcentage de réduction dans le Tableau XVII :

Tableau XVII : Pourcentage de réduction des œdèmes moyens

	T0	T0 +30	T0 +60	T0 +90	T0 +120	T0 +150	T0 +180	T0 +210
% de réduction d'œdème des pattes du lot témoin (+) Diclofenac	6.74	26.89	53.96	86.77	100	100	100	100
% de réduction d'œdème des pattes du lot essai 1 (extrait aqueux des fruits)	8.60	61.55	43.43	89.63	100	100	100	100
% de réduction d'œdème des pattes du lot essai 2 (extrait aqueux des feuilles)	1.07	18.76	62.64	84.52	92.45	100	100	100

- Dans nos conditions expérimentales, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des fruits était significative à partir de 30 minutes avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème de 61.55%, après 120 min, l'inhibition de l'œdème a atteint 100% en passant par 43.43% après 60 min et 89.63 % après 90 min.

Le pourcentage d'inhibition totale de l'œdème est donc de 75.40%.

- L'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des feuilles était aussi significative à partir de 60 minutes avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème de 62.64%, après 150 min, l'inhibition de l'œdème a atteint 100% en passant par 84.52%

après 90 min et 92.45% après 120min.

Le pourcentage d'inhibition totale de l'œdème est donc de 69.93%

- Le Diclofenac, utilisée comme anti-inflammatoire standard à la dose de 2.5 mg/kg a montré sa plus significative activité après 120 min , soit un pourcentage d'inhibition totale de l'œdème de 71.79% .

Par ailleurs, nous avons utilisé le test Anova suivie du test de Tuckey pour l'analyse statistique de nos résultats, et comparé les résultats du lot de souris traitées par l'extrait aqueux avec le lot de souris traitées par Diclofenac , et le lot témoin . Nous avons constaté que nos résultats ont été statistiquement significatifs à partir de 60 min (**Tableau XVIII / Annexe III**). Cela nous permet de dire que nos extraits présentent une réelle activité anti-inflammatoire à la dose utilisée.

Le screening phytochimique a révélé la présence de saponines qui selon **Bruneton (1993)** sont doués d'activité anti-inflammatoire et anti-œdémateuse. Par ailleurs, nos résultats sont en conformité avec ceux trouvés par **Innocenti et al.,(2010)** qui ont démontré que l'extrait aqueux de *solenostemma argel* possède une activité anti-inflammatoire excellente (pourcentage de réduction = 73%) en utilisant la méthode de l'œdème à l'oreille. Ces résultats justifient les utilisations traditionnelles de *solenostemma argel* dans le traitement des affections courantes telles que les plaies et blessures, les bronchites, les troubles urinaires, et les pneumonies.

En phytothérapie, la présence de plusieurs molécules actives renforce l'effet thérapeutique (effet de synergisme), des recherches récentes ont montré que plusieurs métabolites secondaires ont des propriétés anti-inflammatoire, notamment les saponines et flavonoïdes, ces composés calment la douleur musculaire en accélérant la répartition des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS (Oxyde nitrique synthase), responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique qui est un déclencheur chimique de l'inflammation (**Lahlah, 2008**).

II.5. Résultat de l'activité cicatrisante :

II.5.1.Résultats du contrôle physicochimique de la crème

II.5.1.1.Détermination des caractères organoleptiques

La composition obtenue pour les deux préparations (crème à base de feuilles et crème à base de fruit) se présentent sous forme d'une crème de couleur blanche, rigide, lisse et d'aspect brillant (**Figure 26**), agréable à l'application.



Figure 26 : Aspect des crèmes cicatrisantes à base de fruit et à base de feuilles de *Solenostemma argel*

Elle présente des caractéristiques galéniques qui lui assurent un fort caractère couvrant et ne suscitent aucune sensation "collante". Le temps de séchage s'avère relativement court.

II.5.1.2. Contrôle de l'homogénéité

L'homogénéité de nos crèmes cicatrisantes (crème à base de fruits et crème à base de feuilles) a été vérifiée au microscope, nous constatons l'absence de globules huileuses, donc elle est parfaitement homogènes.

II.5.1.3. Mesure du pH

Le ph de la crème à base de fruit est égal à 6,76 à une Température de 24.0 °C ; alors que celui de la crème à base des feuilles est de 6.16 à une température de 25.2°C, Il est à noter que le pH de la peau est d'environ 5,5 d'où la nécessité d'avoir un pH neutre ou légèrement acide donc nous pouvons dire que nos crèmes ne provoquent pas d'irritation sur la peau (**pharmacopée française, 2004**).

II.5.2. Résultats du contrôle microbiologique

Le contrôle microbiologique de la pommade n'a révélé aucune contamination bactérienne ou fongique, la pommade est donc exempte de toutes contaminations microbiennes, et par la suite elle est déclarés conformes aux normes adaptées par la **Pharmacopée Européenne (2014)**. La protection microbiologique des crèmes est obtenue en utilisant des conservateurs adaptés (méthyle parabène) à la formulation.

II.5.3. Résultats de l'essai préliminaire de cicatrisation

Les **Tableaux XIX et XX** représentent l'évolution des paramètres de cicatrisation (œdème et la profondeur de la plaie) chez les lapins, pour chaque produit appliqué, en fonction du temps (jours).

Tableau XIX : Evolution de l'œdème chez les lapins

Œdème	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	J 6	J 7	J 8	J 9	J 10	J 11	J 12	J 13	J 14
Vaseline	2	1	1-0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Madécassol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crème à base de fruit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crème à base de feuilles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- D'une façon générale, l'observation du tableau nous montre l'absence d'œdème pour les deux zones traitées par les crèmes (crème à base de fruit et crème à base de feuilles) par la crème de référence Madécassol ce qui signifie que ces trois traitements ne favorisent pas le processus inflammatoire, par contre pour le lot témoin (vaseline), un œdème léger apparaît dès le premier jour et s'estompe pour disparaître le 4eme jour.

Tableau XX : Evolution de la profondeur des plaies chez les lapins

Profondeur de la plaie	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	J 6	J 7	J 8	J 9	J 10	J 11	J 12	J 13	J 14
Vaseline	4	4	4-3	3	3	3-2	2	2-1	1	1-0	0	0	0	0
Madécassol	4	4-3	3	3-2	2	1	1-0	0	0	0	0	0	0	0
Crème de fruits	4	3	2	1	1-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crème de feuilles	4	3	3-2	2	1	0-1	0	0	0	0	0	0	0	0

- Les scarifications sont nettement plus profondes pour les zones non traitées (témoin) que pour celles traitées. La profondeur des plaies traitées par la crème des fruits et la crème des feuilles est moins importante par rapport à celles traitées par Madécassol. les trois traitements ont donné une bonne cicatrisation avec des délais de guérison un peu différente et qui est de 6 jours pour la crème de fruits , 7 jours pour la crème de feuilles et de 8 jours pour Madécassol ; par contre, La cicatrisation complète du témoin (vaseline) se fait au bout du 10^{ème} jour.

Les résultats obtenus après application journalière des crèmes dermiques sont résumés dans la **Figure 27** qui fait apparaître l'évolution de la cicatrisation avec le temps.

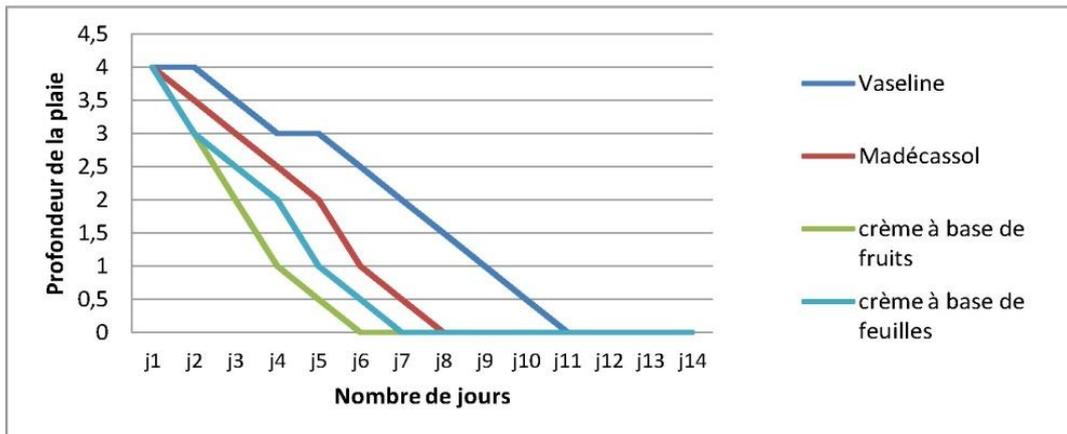


Figure 27 : Evolution de la cicatrisation avec le temps

L'absence de l'œdème chez les lapins traités par nos crème est probablement du à son pouvoir anti-inflammatoire.

Madécassol ® est l'un des produits couramment utilisés pour le traitement des brûlures. **Shetty et al. (2008)** ont signalé que les principaux ingrédients de l'extrait titré de *Centella asiatica* (Asiaticoside, l'acide asiatique et madécassique) sont efficaces sur la sclérodermie systémique, la formation de cicatrices anormales et chéloïdes et aussi raccourcissent considérablement le temps de cicatrisation. Leur effet le plus bénéfique semble être la stimulation de la maturation des cicatrices suite à la production de collagène de type I et la diminution de la réaction inflammatoire et la production de myofibroblastes.

Solenostemma argel, elle est une plante à latex (**ozenda, 2004**) et de ce fait il a été démontré par **Romani, (2002)**, dans une étude de l'activité cicatrisante mené sur des rats du latex de *Calotropis procera*, une plante de la sous famille des Asclépiadacées, possède une très bonne activité cicatrisante. Le screening phytochimique a révélé la présence de saponines qui selon **Bruneton, (1999)** possèdent une très bonne activité cicatrisante.

II.6. Résultats de l'activité antioxydante

II.6.1. La méthode de réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction du fer est une méthode facile et

reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs (Benzie et Strain, 1996 ; LI *et al.*, 2007).

Pour les deux extraits, des dilutions allant de 0.5 à 0.005 mg/ml, sont préparées, les pouvoirs réducteurs sont mesurés à 700 nm (Chung *et al.*, 2002)

Les valeurs obtenues sont représentées dans la **Figure 28**

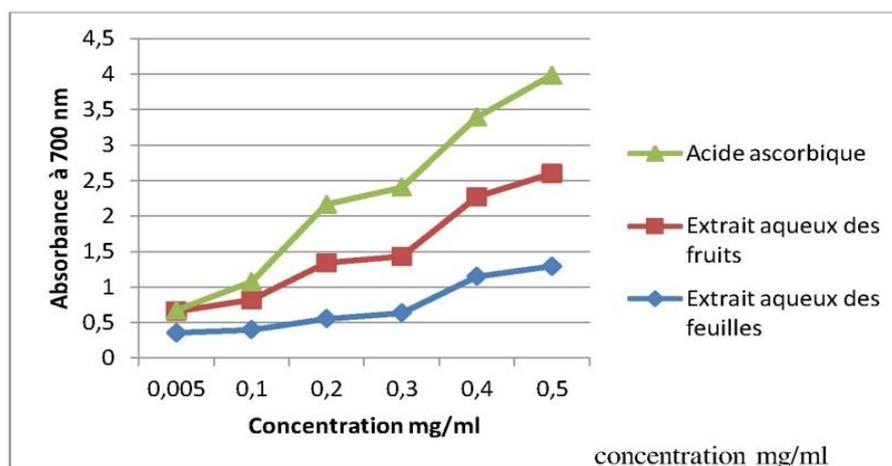


Figure 28 : Pouvoir réducteur des extraits aqueux et de l'acide ascorbique.

D'après nos résultats, nous remarquons que, pour les deux extraits testés, l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées.

Les extraits aqueux de notre plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures que celle de la référence (acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0.4 mg/ml. L'extrait de fruits est plus actif par rapport à celui de feuilles. Les activités antiradicalaires des différentes substances étudiées s'enchaînaient selon l'ordre décroissant suivant : acide ascorbique > l'extrait aqueux des fruits > l'extrait aqueux des feuilles.

2. Piégeage du radical libre (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (DPPH)

Les résultats exprimés en pourcentage d'activité anti-radicalaire (**Tableau XX**) révèlent que tous les substrats testés sont des anti-radicalaires.

Tableau XXI : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH

		0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2
fruits	DO	0.591	0.531	0.488	0.403	0.358	0.302	0.260	0.215	0.107	0.089
	% IN	5.59	15.17	22.04	35.62	42.81	51.76	58.4	65.65	82.90	85.78
Feuilles	DO	0.602	0.557	0.536	0.475	0.454	0.365	0.308	0.236	0.203	0.102
	% IN	3.83	11.02	14.38	24.12	27.48	41.69	50.80	62.30	67.57	83.70
Acide ascorbique	DO	0.544	0.501	0.446	0.391	0.336	0.282	0.227	0.172	0.117	0.0062
	% IN	13.10	19.97	28.75	37.54	46.33	54.95	63.74	72.52	81.31	99.01

La courbe obtenue dans la **Figure 29** montre que le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux des fruits augmente en fonction de la concentration. Ce pouvoir atteint 85.78% pour une concentration de 2 mg/ml.

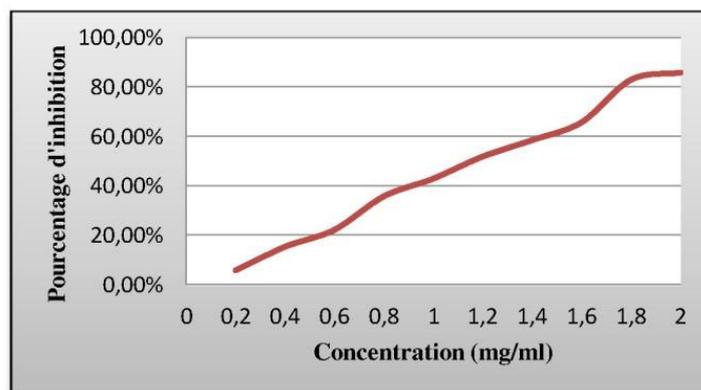


Figure 29 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'extrait aqueux des fruits.

L'extrait aqueux des fruits possède une bonne capacité de neutralisation du radical libre DPPH. Cette capacité peut probablement s'expliquer par la présence de certains métabolites actifs.

Par rapport à l'extrait aqueux des fruits, l'extrait aqueux des feuilles du Cynanque à feuilles d'olivier a une faible activité antiradicalaire. Cependant, nous avons remarqué que pour une concentration de 2 mg/ml, l'extrait aqueux a piégé 83.70% des radicaux libres (**Figure 30**).

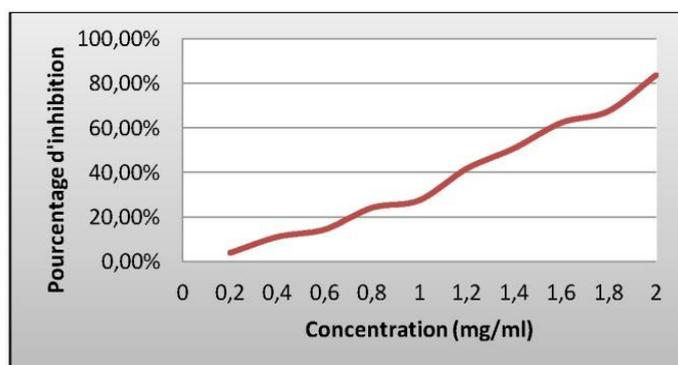


Figure 30 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'extrait aqueux des feuilles.

La **Figure 31** illustre les variations de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration de l'acide ascorbique. Son activité est plus importante que celle des produits testés.

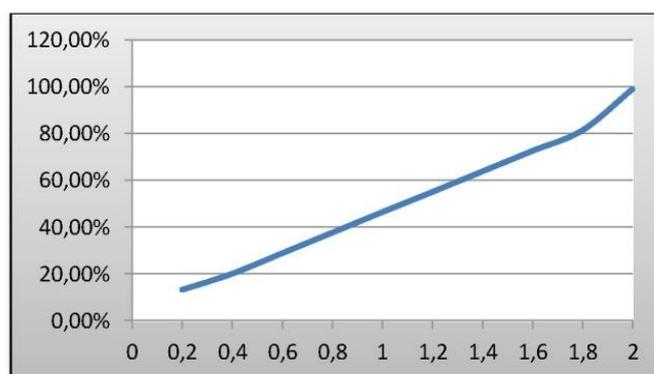


Figure 31 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'acide ascorbique

L'activité antiradicalaire est exprimée en IC50 ou EC50 (**Tableau XXI**), ce paramètre a été introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs. Il définit la concentration efficace du substrat responsable de la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur) (**Molyneux, 2004**). La plus faible valeur de la IC50 correspond au pouvoir réducteur le plus élevé.

Tableau XXI : IC50 du standard, de l'extrait aqueux des feuilles et l'extrait aqueux des fruits.

Le substrat	IC50
acide ascorbique	1,08mg/ml
extrait aqueux des fruits	1,18mg/ml
extrait aqueux des feuilles	1,38mg/ml

Le standard a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée avec IC50 de l'ordre de 1,08 mg/l., suivie par l'extrait aqueux des fruits, sa IC50 est de 1,18 mg/l, et en dernier l'extrait aqueux des feuilles avec une IC50 de l'ordre de 1,38 mg/l.

Plusieurs études ont révélées que la présence des composés phénoliques dans les plantes est associée à leurs activités antioxydantes, cela est probablement due à leurs propriétés réductrices qui les rendent des agents réducteurs ou des donneurs d'hydrogène (**Chang et al., 2001 ; Ismail et al., 2010**). En effet, selon **Aruoma et al., (1995)** et **Bahorun (1997)**, les flavonoïdes sont reconnus pour leurs activités antioxydantes et d'après les travaux d'**Okuda et al., (1983)** et d' **Okamura et al., (1993)**, les tannins catéchiques présentent également des propriétés antioxydantes.

Les travaux de **Shafek et al., (2012)** relatifs à l'activité antioxydante de l'extrait de *Solenostemma argel* ont montré que deux nouveaux glycosides de kaempférol isolées de cette plante avaient un effet antiradicalaire significatif. Nos résultat sont semblables à ceux de **Nassr-Allah et al., (2009)**, qui ont trouvé que l'activité antioxydante de *Solenostemma argel* est significative.

Conclusion

Conclusion

Les travaux de recherche entrepris au cours de cette étude ont porté sur l'aspect phytochimique et biologique réalisé sur les fruits et les feuilles de *Solenostemma argel*, qui ont permis de mettre en lumière certains métabolites secondaires et la mise en évidence de certaines propriétés thérapeutiques.

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins, des anthocyanes, des saponines, des composés réducteurs et des mucilages dans les deux parties de la plante étudiées. Les analyses effectuées ont démontré aussi la présence des alcaloïdes, des glucosides dans les fruits.

L'administration des extraits aqueux des feuilles et des fruits de *Solenostemma argel* à une dose de 2g/kg, n'a montré aucun signe de toxicité aigue.

L'activité antimicrobienne des extraits aqueux des fruits et feuilles testés sur douze micro-organismes par la méthode de diffusion sur Gélose, a montré une inhibition variable vis-à-vis de ces souches, avec un pouvoir antimicrobien remarquable des deux extraits contre *Escherichia coli*.

Les extraits aqueux à 10% des fruits et des feuilles du cynanque à feuilles d'olivier présentent une efficacité sur l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine à 0,1%, avec un meilleur pourcentage d'inhibition totale de l'œdème pour l'extrait aqueux des fruits (75,40%) par rapport à celui des feuilles (69,93%).

En se basant sur ces propriétés, deux crèmes dermiques dont l'une à base du macérat des fruits et l'autre à base du macérat des feuilles ont été préparé afin d'y subir une série de tests physico-chimique, microbiologique qui se sont révélés concluants. Sur le plan thérapeutique, les crèmes dermiques, fabriquées à base du cynanque à feuilles d'olivier, présentent une excellente activité cicatrisante, exempte de toute toxicité dermique. Elles apparaissent dans ce contexte comme une solution naturelle et efficace pour faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique (dermopharmacie). Leur champ d'action peut s'étendre vers la clinique où elles seront indiquées dans les "problèmes de peau" directement liés aux plaies, inflammations et autres infections microbiennes.

En plus de cet apport thérapeutique, le gain économique ne serait pas négligeable. Il s'agit de valoriser le patrimoine végétal de notre pays et promouvoir la culture et la transformation des

plantes aromatiques et médicinales à même de servir encore de tremplin pour la recherche scientifique.

L'étude de l'activité anti-radicalaire que possède les extraits aqueux des fruits et des feuilles par la méthode de réduction du fer et la méthode de piégeage du radical libre DPPH a dévoilé des propriétés très intéressantes. Ces deux tests réalisés ont révélé que l'extrait aqueux des fruits est le plus actif, sa valeur de IC50, en piégeant le radical DPPH, est de (1,18 mg/ml), suivis par celui des feuilles (1,38mg/ml).

Ces résultats ne constituent bien évidemment qu'une première étape de recherche des molécules biologiquement actives.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- Isoler les molécules contenues dans les extraits actifs de *Solenostemma argel*.
- Tester les molécules isolées, *in vivo*, sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application thérapeutique ou en agro-alimentaire.
- Étudier la cytotoxicité de ces molécules afin de confirmer ou d'infirmier l'activité attribuée à cette plante.
- faire des études à l'échelle moléculaire.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

1. **Abd Elhady F.K. et Ouf S.A., 1993.** Fungitoxic effect of shoot surface fungi, Zentralblatt fur Mikrobiologie Zentralbl Microbiol (148) pp 598-607.
2. **Abd El hady F. K., 1994.** Studies for determining antimicrobial activity of *solenostemma argel* (del) hayne. 2-extraction with chloroform/methanol in different proportions, Qatar University Science Journal, Vol. 14, pp143-146.
3. **Abdel Moneim E. Sulieman, Wigdan M. Elzobair et Awad M. Abdelrahim, 2009.** antimicrobial activity of the extract of *solenostemma argel* (harjal) plant, journal of science and technology vol. 10 (3), pp 120 -134
4. **Aeri V., 2007.** Pharmacognosy, principles of classification of plants, reader department of pharmacognosy and phytochemistry. Hamdard University, New Delhi.
5. **Aherne S.A., O'Brien N.M., 2002.** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition 18 (1) pp 75-81.
6. **Alaoui-Boukhris M., 2009.** Activités larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaire. Mémoire de Master, Faculté des sciences et techniques.
7. **Amblard- Pison., 1996.** Méthode d'approche de la préhistoire saharienne, Edition CNRS, 191p.
8. **Andersen O.M., Jordheim M., Markham K.R., 2006.** Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. CRS press: Boca Raton, pp 474-506.
9. **Arif, M.I., Rafiq M. et Ghaffar A., 2009.** Host plants of cotton mealybug (*Phenacoccus solenopsis*): A new menace to cotton agroecosystem of Punjab. Pakistan. Int. J. Agri. Biol.11, 163-167.
10. **Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Butler, J et Halliwell, B., 1995.** Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals. Free Rad, V. 22, 187 - 190.

11. **Audigie C-L ., Figarella J., Zonszain F., 1978.** Manipulation biochimique. Ed. Doin paris, 274p.
12. **Auzias Dominique et Abourdette Pean Paul., 2011.** Sahara. Edition petit futé, 737p.
13. **Babulka P., 2007.** Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales: de la médecine traditionnelle à la phytothérapie moderne, phytothérapie, Edition paris 3, pp : 137-145.
14. **Bahorun, T., 1997.** Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research Council, p 83-94.
15. **Batanouny K.H, 2005.** .Encyclopaediaa of Wild medicinal plant in Egypt I: *Solanum nigrum*, *Tecrium polium*, *Pluchea discordis* and *solenostemma angel*. Ed The plan press, Cairo, 81p.
16. **Bekro Y.A. , Janat A., Bekro M., Boua B., Fézan H. et Ehouan E., 2007.** Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) 22J. Sciences et Nature Vol. 4 N°2: pp 217 - 225
17. **Beloued, A, 2001.** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, Alger, 277p.
18. **Benabdallah M, 1992.** Homéopathie, une médecine pour tous. Edition Ellebore, 201p.
19. **Benchelah .A.C, Bouziane H., Moka M., 2004.** Fleur du Sahara, arbres et arbustes, voyage au Cœur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. Phytothérapie (6) Ed : Springer, pp 191-197.
20. **Benzahi K., 2001.** Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la Plante *cynodn Dactylon-L* chindent. mémoire des de Magister, Université de Ouargla, P15-17.
21. **Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996.** The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239, 70–76.

Annexe

Annexe I

❖ Appareillage

- Balance de précision
- Plaque chauffante
- Bain marie
- Autoclave
- Etuve bactériologique
- pH-mètre
- Hotte ventilée
- Spectrophotomètre
- Bec benzène
- Pied à coulisse
- Vortex
- Centrifugeuse

❖ La verrerie

- Bêchers : 100 ml, 250 ml, 500 ml
- Erlenmeyer 100 ml, 250 ml
- Tubes à essai
- Pipettes graduées stériles
- Pincés
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Disques d'antibiogramme Stériles de 0,9cm de diamètre
- Spatule
- Pipettes Pasteurs
- Papier filtre
- Seringues (1ml, 5 ml)
- Fioles jaugées

❖ Réactifs et solvants

- Acide sulfurique (H_2SO_4)
- réactif Valsler Mayer
- Acide chlorhydrique (HCl)
- Ammoniac (NH_4OH)
- Chlorure de fer ($FeCl_3$)
- réactif de Stiasny
- Acétate de Sodium
- Chloroforme
- Alcool éthylique (C_2H_6O)
- Hydroxyde de Potassium
(KOH)
- Réactif de Fehling
- Alcool absolu
- Acide phosphomolybdique
($H_3MO_{12}O_{40}P$)
- Eau distillée
- Méthanol
- Tampon phosphate
- Ferricyanure de potassium -
 $K_3Fe(CN)_6$
- acide trichloracétique
- DPPH

Annexe II

- **Préparation des infusions administrées aux souris pour le test limite de toxicité**

Nous devons tout d'abord calculer la dose correspondante au poids moyen des souris :

2g \longrightarrow 1kg

2g \longrightarrow 1000g

X \longrightarrow 20g

X=0,04g/souris

2g : La dose de la plante pour 1kg du poids corporel.

20g : Poids moyen des souris.

0.04g : C'est la quantité de poudre végétale pour une souris de 20g retrouvée dans 0,5ml de la solution.

0.5ml : Volume de liquide que peut recevoir une souris.

Ensuite , sachant qu'une souris pesant 20g ne peut recevoir que 0.5ml d'une solution , on procède au calcul suivant :

0.04g \longrightarrow 0.5ml

Y \longrightarrow 20ml

Y=1.6g/20ml d'eau distillée.

20ml : Volume d'eau distillée de la solution à préparer suffisantes pour tous les lots de souris.

1.6g : La quantité de la poudre végétale pour un volume de 20ml.

Pour préparer la solution (infusion), nous avons ajouté à 1.6g de poudre végétale 20ml d'eau distillée bouillante et nous avons l'assé sous une agitation douce pendant 15mn, a la fin nous filtrons et nous ajustons le volume à 20ml.