

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des Populations et 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 de quelques activités
biologiques de Ciste cotonneux (*Cistus albidus*)**

Présenté par

le 29 / 10 / 2015

M^{lle} Sadallah Soumia

Devant le jury

M^{me} Bradea MS

MCA

UB1

Présidente

M^{me} Ayadi R

MCB

UB1

Examinatrice

M^{me} Bensalah L

MAA

UB1

Promotrice

Promotion 2014-2015

Remerciements

Tout d'abord, je remercie «ALLAH » le Tout Puissant de m'avoir donné le pouvoir et la volonté pour la réalisation de ce modeste travail.

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tout particulièrement :

Ma Promotrice M^{me} Bensalah L, Maître Assistante A au département de Biologie des Populations et Organismes à l'université Blida 1, pour avoir accepté d'encadrer ce travail, pour toute l'attention qu'elle m'a accordé, sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience et ses précieux conseils.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent aux membres de jury :

La présidente M^{me} Bradea M.S, Maître Conférence A au département de Biologie des Populations et Organismes à l'université Blida 1, qui m'a fait l'honneur de présider ce travail.

L'examinatrice M^{me} Ayadi R, Maître Conférence B au département de Biologie des Populations et Organismes à l'université Blida 1, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur Boukhatem N, Maître Assistante A au département de Biologie des Populations et Organismes à l'université Blida 1, qui ma aider pour faire l'étude statistique.

Je voudrai également remercier le personnel technique du complexe Antibiotical Médea, et le personnel technique de laboratoire d'hygiène de Blida pour leurs collaborations et leurs conseils.

En fin, un grand remerciement à tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail comme preuve d'amour :

*À mes très chers parents, qui ont toujours rêvé de me voir arriver à ce stade.
Pour leur amour, leur confiance, leur compréhension, leur soutien, leur conseil,
leur tendresse, leur orientation et leur sacrifice. .*

Je leur souhaite le bonheur et la bonne santé.

Qu'ALLAH me les gardes.

À mon très chère frère Mohamed Amine ;

À ma très chère petite sœur Yasemine,

À mes oncles et mes tantes ;

À mes cousins et mes cousines ;

À mes amies et mes collègues ;

*À tous les personnes, qui m'ont encouragé, aidé, conseillé et orienté de près ou
de loin.*

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
01	Fleurs de <i>Cistus albidus</i>	4
02	Chromatogramme d'analyse par HPLC de l'extrait éthéré à 265nm.	25
03	Chromatogramme d'analyse par HPLC de l'extrait éthéré à 365 nm	26
04	Résultats de l'activité antioxydante (réduction du Fer).	27
05	% d'inhibition en fonction de la concentration par la méthode ferricyanure.	28
06	Résultats de l'activité antioxydante (Molybdate Phosphate).	28
07	% d'inhibition en fonction de la concentration par la méthode de Molybdate Phosphate	29
08	Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50 % du fer et de Molybdate phosphate en fonction des différents extraits.	30
09	Résultats du test de l'activité antispasmodique des feuilles de <i>Cistus albidus</i>	34
10	Balance	Annexe I
11	Appareil HPLC	Annexe I
12	Voltrex	Annexe I
13	Plaque chauffante	Annexe I
14	Spectrophotomètre	Annexe I
15	Résultat de l'activité antimicrobienne	Annexe II
16	Injection de l'acide acétique	Annexe III
17	Souris au moment du spasme	Annexe III
18	Gavage des souris	Annexe III
19	Aspect général de <i>Cistus albidus</i>	Annexe III
20	Feuilles de <i>Cistus albidus</i>	Annexe III

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
I	Principales classes de composés phénoliques	8
II	Souches utilisées pour la réalisation de l'activité antimicrobienne.	13
III	Diamètres des zones d'inhibition selon le degré de sensibilité	22
IV	Résultats des tests phytochimiques.	24
V	Résultats de l'évaluation de la toxicité des feuilles de <i>Cistus albidus</i>	27
VI	Résultats du pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Cistus albidus</i> vis-à-vis l'acide ascorbique par la méthode de ferricyanure.	Annexe II
VII	Résultats du pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Cistus albidus</i> vis-à-vis l'acide ascorbique par la méthode Molybdate Phosphate	Annexe II
VII	Résultats du test de l'activité antispasmodique des feuilles de <i>Cistus albidus</i> .	Annexe II

Résumé

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Cistus albidus*. Cette espèce appartient à la famille des Cistacées, elle est commune en régions méditerranéennes surtout en Algérie.

Les résultats de l'étude phytochimique, ont montré que les feuilles de *Cistus albidus* contiennent les tanins, les tanins cathéchiques, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les saponines. L'analyse par HPLC des composés phénoliques a révélé la présence de l'acide cinnamique et le Kaempférol.

Les résultats du test de la toxicité sur les souris ont révélés que l'infusé des feuilles de *Cistus albidus*, à des concentrations allant de 0,25g/kg à 2,5g/kg ne présente aucune toxicité.

L'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles ont un effet antioxydant important avec IC₅₀ égale 0,05mg/ml inférieure à celle de l'acide ascorbique (IC₅₀=0.07mg/ml).

L'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de *Cistus albidus* sont dotés d'un pouvoir antimicrobien très intéressant vis-à-vis 05 microorganismes testés (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*) alors qu'ils sont inefficaces contre les *Aspergillus brasiliensis*. La recherche de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des deux extraits, a révélé que l'extrait aqueux à un bon pouvoir antimicrobien par rapport à l'extrait éthanolique. Les CMI de l'extrait aqueux varient entre 25µg/ml et 125µg/ml, alors que celles de l'extrait éthanolique allant de 2,5mg/ml à 5mg/ml.

Les feuilles de *Cistus albidus* ont un effet antispasmodique très important avec la concentration 2,72g/kg.

Mots clés : *Cistus albidus*, antioxydant, antimicrobien, antispasmodique, toxicité.

Abstract

Our study was performed on the leaves of *Cistus albidus*. This species belongs to the family of Cistaceae, it is common in Mediterranean regions especially in Algeria.

The results of the phytochemical study showed that the leaves of *Cistus albidus* contain tannins, cathéchiques tannins, flavonoids, alkaloids and saponins. HPLC analysis of phenolic compounds revealed the presence of cinnamic acid and Kaempherol.

The results of the toxicity test on mice revealed that the infused leaves *Cistus albidus*, at concentrations ranging from 0,25 g / kg to 2,5 g / kg has no toxicity.

The aqueous extract and the ethanol extract of the leaves have a significant antioxidant effect with IC50 equal 0.05 mg / ml lower than that of ascorbic acid (IC50 = 0.07mg / ml).

The aqueous extract and the ethanol extract of the leaves of *Cistus albidus* feature a very interesting antimicrobial potency vis-a-vis 05 microorganisms tested (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*), so that they are ineffective against *Aspergillus brasiliensis*. The search for the minimal inhibitory concentration (MIC) of the two extracts showed that the aqueous extract at a good antimicrobial potency compared with the ethanol extract. The MICs of the aqueous extract ranging from 25µg / ml and 125µg / ml, whereas those of the ethanol extract of from 2.5mg / ml to 5mg / ml.

The leaves of *Cistus albidus* have an antispasmodic effect very important with the concentration 2,72g / kg.

Keywords: *Cistus albidus*, antioxidant, Antimicrobial, antispasmodique, toxicity.

ملخص

دراستنا أجريت على أوراق نبات القريضة المُبيضة. هذا النوع ينتمي إلى العائلة القريضية ، هذا النوع شائع في مناطق البحر الأبيض المتوسط وخاصة في الجزائر.

كشفت نتائج الفحوصات الكيميائية لأوراق نبات القريضة المُبيضة تحتوي على العفص، العفص الكاتيشيتي والفلافونيدات، وقلويدات والصابونين. كما اظهرت طريقة التسجيل اللوني السائلة ذات الضغط العالي وجود حمضي وجود السيناميك والكايومفيرول.

كشفت نتائج اختبار السمية على الفئران أن أوراق نبات القريضة المُبيضة ، بتركيزات تتراوح بين 0.25 جم / كجم إلى 2.5 جم / كجم ليس لديه سمية.

المستخلص المائي و المستخلص الإيثانولي لأوراق نبات القريضة المُبيضة اظهر تأثير مضاد للأكسدة كبير مع IC50 يساوي 0.05 ملغ / مل أقل حمض الاسكوربيك (IC50 = 0.07 ملغ / مل).

المستخلص المائي و المستخلص الإيثانولي أوراق نبات القريضة المُبيضة ميزة قوة مضادة للميكروبات مثيرة جدا للاهتمام وجها لوجه 05 الميكروبات المختبرة (المكورات العنقودية الذهبية، العسوية الشمعية، الزائفة الزنجارية، كولايا والمبيضات البيض)، بحيث أنها ليست فعالة ضد الرشاشيات البرازيلية. أظهر البحث عن للتراكيز المثبطة الدنيا ان المستخلص المائي اكثر فعالية من المستخلص الإيثانولي حيث أن التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلص المائي تتراوح بين 25µغ/مل و 125µغ/مل في حين ان تراكيز المستخلص الإيثانولي تتراوح بين 2.5مغ / مل و 5مغ / مل.

أوراق نبات القريضة المُبيضة لها تأثير مضاد للتشنج مهم جدا مع تركيز 2،72g / كغ.

كلماتالمفتاح: القريضة المُبيضة، مضادأكسدة، مضاداتالميكروبات، مضادالتشنج، تسمم.

Sommaire

Introduction.....	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1. Etude de la plante : <i>Cistus albidus</i> L.....	3
I.1.1. Historique.....	3
I.1.2. Etymologie	3
I.1.3. Appellation et homonyme.....	3
I.1.4. Description	4
I.1.5. Systématique.....	5
I.1.6. Origine et habitat	5
I.1.7. Conditions pédoclimatiques	5
I.1.8. Composition chimique	5
I.1.9. Propriétés thérapeutiques	6
I.2. Métabolites secondaires.....	6
I.2.1. Alcaloïdes.....	6
I.2.2. Terpénoïdes.....	7
I.2.3. Composés phénoliques.....	7
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
II.1. Matériel.....	11
II.1.1. Matériel biologique.....	11
II.1.2. Matériel non biologique.....	13
II.2. Méthodes	14
II.2.1. Evaluation de la teneur en eau	14
II.2.2. Tests phytochimiques.....	14

II.2.3. Extraction des flavonoides (flavones, flavonols et anthocyanes) et des acides phénols	16
II.2.4. Evaluation de la toxicité (DL50) <i>in vivo</i>	18
II.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	19
II.2.6.Evaluation de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i>	21
II.2.7. Evaluation de l'activité antispasmodique <i>in vivo</i>	23

CHAPITRE III : RESULTATS ET DESCUSSION

III.1.Résultats de l'évaluation de la teneur en eau.....	24
III.2. Résultats des tests phytochimique.....	24
III.3.Résultats de l'extraction des flavonoïdes (flavones, flavonols et anthocyanes) et des acides phénols	25
III.4. Résultats de l'évaluation de la toxicité	27
III.5. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante	27
III.6.Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne	31
III.7.Résultats de l'évaluation de l'activité antispasmodique.....	34
Conclusion et perspectives.....	36
Références Bibliographiques.....	41
Annexes.....	

Introduction

Introduction

Introduction

La Méditerranée est un haut lieu incontesté de la biodiversité mondiale, en raison de la diversité et de la richesse de sa flore. En effet, le Bassin méditerranéen abrite environ 10 % (25000) des plantes vasculaires connues dans le monde sur une superficie représentant moins de 2 % de la surface de la Terre. Environ la moitié de ces espèces ne se trouvent nulle part ailleurs dans le monde (**Radford et al., 2011**).

L'Algérie de par son climat (méditerranée, aride) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche en plantes médicinales et aromatiques dont la plupart existe à l'état spontané. La valorisation des plantes médicinales et aromatiques, est un domaine particulièrement intéressant à développer car c'est une source de produits à haute valeur ajoutée (**Felidj et al ; 2010**).

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des produits chimiques (**Small, et Catling, 2000**). Ces substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique (**Bahorun, 1997**).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicaux, en particulier les flavonoïdes et les proanthocyanidines (**Bahorun, 1997**).

Parmi l'ensemble des plantes médicinales qui se trouvent en Algérie, nous avons choisi une plante qui est le ciste cotonneux ou le Ciste blanc (*Cistus albidus*).

Le ciste blanc possède des propriétés thérapeutiques très importantes, par exemple en Maroc leurs feuilles sont utilisées en décoction contre les douleurs gastriques et comme hypoglycémiant. Plusieurs études Marocaines ont confirmé l'efficacité de cette plante contre les mycobactéries, par contre en Algérie cette plante est délaissée et on n'a pas trouvé même pas des travaux sur cette espèce.

Introduction

L'organe végétal choisi pour la réalisation des expérimentations de cette étude, est la feuille puisque c'est à son niveau que se trouve la majorité des principales substances actives, en d'autre terme, c'est le lieu de synthèse et de la mise en réserve temporaire des principaux composés des métabolismes primaires et secondaires.

Quelles sont les métabolites secondaires qui se trouvent dans les feuilles de *Cistus albidus*? Les feuilles de notre plante médicinale, possèdent-elles des propriétés thérapeutiques?

Pour réussir à répondre à notre problématique, nous avons tracé les objectifs suivants :

- Le premier, est d'ordre phytochimique, il porte sur des réactions de caractérisation des métabolites secondaires, la séparation des principaux acides phénoliques par la chromatographie liquide à haute performance et le test du pouvoir antioxydant *in vitro* par deux méthodes différentes.
- Le second aspect, est consacré à l'évaluation du pouvoir antimicrobien de l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de *Cistus albidus* et la recherche de la CMI.
- Nous nous sommes intéressés à l'évaluation *in vivo* de l'activité antispasmodique, et de la toxicité de l'infusé des feuilles de *Cistus albidus*.

CHAPITRE I

Synthèse Bibliographique

I.1. Etude de la plante : *Cistus albidus*

I.1.1. Historique

La famille des Cistacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend moins de 200 espèces et maximum dix (10) genres ; selon le centre Américain de l'Information Biotechnologique, cette famille présente (8) genres incluant, *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea* et *Tuberaria*. Ce sont des arbustes, des plantes herbacées, poilues ou velues, pérennes ou annuelles, à feuilles simples souvent opposées, à fleurs solitaires ou en cymes, à cinq pétales libres des régions tempérées à sub-tropicales surtout présents autour du bassin méditerranéen (**Isrin, 1997**).

Le genre *Cistus* L. comprend environ 20 espèces (**Comandini et al., 2006**). Les cistes contribuent pour beaucoup au caractère de l'environnement végétal des pays méditerranéens et de ses parfums. Le ciste blanchâtre est l'un des premiers à fleurir le long du littoral, où il se distingue par son feuilletage pâle et velouté et par ses grandes fleurs roses aux pétales froissées (**Beniston et Beniston, 1984**).

I.1.2. Etymologie

Du grec, Kistos : boîte, capsule (allusion aux fruits) (**Rameau et al., 2008**).

Venant du latin *albus* –blanc- *albidus* indique la couleur du feuillage.

I.1.3. Appellation et homonyme

Du grec : Kistos : boîte, capsule (allusion aux fruits) (**Rameau et al., 2008**).

Du latin *albidus* : blanchâtre (**Rameau et al., 2008**).

Berbère : Touzzalt (Algérie), Tuzzala (Maroc) (**Aït Youssef, 2006**).

Français : Ciste cotonneux, Ciste blanchâtre, Massugué, Mugan, Argenti-blanc, Ciste mâle à feuilles blanches, Messoga (**Rameau et al., 2008**).

Anglais : Grey-leaved cistus, Rock-rose, White Dart (**Rameau et al., 2008**).

Allemande: Silberweissbehaarte Cistrose, weissliche Cistrose (**Rameau et al., 2008**).

Italien: Cisto a foglie sessili, Musseghe, Nasca (**Rameau et al., 2008**).

Espagnole : Jaguarzo blanco, Jara blanca (**Rameau et al., 2008**).

I.1.4 .Description

Ciste ouest méditerranéen prospérant sur terrains dégradés, garrigues à chêne kermès, lieux rocailloux sur calcaire. Il est très ramifié, avec des tiges brun rouge s'écaillant avec l'âge (**Lemoine, 2005 ; Dupérat et Polese, 2008**). Il atteint plus de 1m (**Lemoine, 2005**) et peu odorant (figure 19, annexe III) (**Rmaeau et al., 2008**).

Les feuilles sont persistantes, de 02 à 05 cm, opposées, simples et entières, ovales, sessiles, demi embrassantes, réticulées dessous, vertes blanchâtres et tomenteuses sur les deux faces (figure 20, annexe III) (**Dupérat et Polese, 2008**).

Grandes fleurs rose vif à pourpre (5-6cm de diamètre), terminales, pédonculées, solitaires, ou par 2 ou 3 en ombelle, sépales velus ; pétales 2-3 fois longs que les sépales (figure 1) (**Rameau et al., 2008**).



Figure 1 : Fleurs de *Cistus albidus* (Beniston et Beniston, 1984).

Les fruits sont des capsules ovoïdes, velues, avec 05 loges internes contenant les grains (**Dupérat et Polese, 2008 ; Rameau et al., 2008**).

Le *Cistus albidus* dont la période de floraison va de février à juin (**Beniston et Beniston, 1984**).

Des études antérieures ont montré la présence des oligo-proanthocyanidines dans le *Cistus albidus* (Qa'dan et al., 2003). Il est riche en huile essentielle (Paolini, 2015).

I.1.9. Propriétés thérapeutiques

En médecine traditionnelle, le décocté des feuilles de *Cistus albidus* est utilisé contre les douleurs gastriques et comme hypoglycémiant. En cataplasme, on les emploie contre les abcès. Les feuilles sont également utilisées, en infusion dans du thé comme digestif (Kahouadji, 1995), ils possèdent aussi une activité antimycobactérien (Haouat et al., 2013).

Les fleurs de *Cistus albidus* servaient autrefois de remèdes contre la dysenterie et étaient aussi utilisées pour soigner les plaies (Beniston et Beniston, 1984).

Les espèces du genre *Cistus* ont souvent été utilisées comme plantes médicinales pour leurs propriétés antimicrobiennes (Chinou et al., 1994; Demetzos et al., 1999), antifongique (Bouamama et al., 2005), antivirale, antitumorales (Dimas et al., 2000), ils sont aussi employées en Italie, en Grèce, en Espagne et en Turquie pour le traitement de la diarrhée et des ulcères peptiques ; en tant que remèdes généraux pour traiter plusieurs maladies de peau et comme agents anti-inflammatoires et antispasmodiques (Basaba et al., 2007).

I.2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés produits par les organismes vivants (végétaux et microorganismes) en dehors des voies métaboliques strictement nécessaires qui assurent leur survie (Guézennec, 2014). Ils appartiennent à des groupes chimiques variés (Macheix et al., 2005), et ce sont souvent produits en extrêmement faible quantité (Primrose et al., 2004).

Leurs propriétés pharmacologiques peuvent être puissantes, et à limite, à certaines doses, toxiques voire mortelles (Chaumont et Millet-Clerc, 2011). On en trouve 03 classes principales : les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composés phénoliques (Suty, 2014).

I.2.1. Alcaloïdes

A la différence des composés terpéniques et des polyphénols, les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement hétérogènes (William et Hopkins, 2003). Les alcaloïdes sont des substances organiques (le plus souvent d'origine végétale) azotées, basiques et douées à faible dose de propriétés physiologiques marquées. Ces substances

portent toutes la terminologie «ine» (Exemples : quinine, codéine, atropine) (**Mathieu, Fonteneau, 2008**). On les rencontre chez de nombreux végétaux, ils peuvent être présents dans tous les organes (**Roux et Catier, 2007**). Une plante renferme rarement un seul alcaloïde ; en générale on a un mélange d'alcaloïdes de constituant plus ou moins apparentée où l'un d'entre eux domine (**Roux et Catier, 2007**). Les alcaloïdes existent rarement à l'état libre dans la plante, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques où à des tanins. Ils ont une teneur est très variable, généralement compris entre 0.1% et 2% à 3% du poids sec de la drogue (**Roux et Catier, 2007**). Les alcaloïdes sont généralement très amers et, bien qu'ils soient souvent toxiques, ils peuvent néanmoins avoir certaines propriétés pharmacologiques (**Small et Catling, 2000**), tel que l'activité sédatrice, effets sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (**Iserin, 2001**), et des propriétés antispasmodiques (**Gazengel et Orecchion, 2013**).

I.2.2. Terpénoïdes

Les terpénoïdes, appelés aussi terpènes, existent chez toutes les plantes et représentent de loin la plus vaste catégorie de métabolites secondaires, avec plus de 22.000 composés décrits (**Raven et al ., 2000**). Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiple de 5 carbones nommé isoprène de formule générale $[C_5 H_8]_n$ (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013**). On peut classer tous les terpénoïdes en fonction du nombre de leurs unités isoprènes (**Raven et al ., 2000**). Le groupe des terpénoïdes comprend des monoterpènes (10 atomes de carbone dans la molécule), des sesquiterpènes (15 atomes de carbone), des diterpènes (20 atomes de carbone) (**Raven et al ., 2000**).

Les propriétés thérapeutiques des terpènes sont surtout connues pour lutter contre l'inflammation (**Grotenhermen , 2009**), ils sont aussi antiseptiques (**Moulin et al., 2006**) et bactéricides (**Suty, 2015**).

I.2.3. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont présents chez toutes les plantes (**Sauvion et al ., 2013**). Ils sont d'importants produits du métabolisme secondaire des plantes. On les trouve en abondance dans les parties vertes et les feuilles de ces dernières. Le nombre des composés phénoliques connus se monte à des milliers. Ils sont partout dans la nature. Et, bien qu'ils n'en constituent qu'une toute petite partie, ils jouent un rôle important dans notre alimentation. Ils sont à l'origine de l'astringence de certains aliments et de l'amertume que

d'autres laisses sur la langue. Ils sont aussi en partie, responsables de la couleur mi-jaune mi-brune de certain fruits et légumes (IPGRI, 2002). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2009). Ils peuvent être regroupées en de nombreuses classes (tableau I) (Macheix et al., 2005).

Tableau I : Principales classes de composés phénoliques (Macheix et al., 2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple
C ₆	Phénols simples	Catéchol
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique, Scopolétine, esculétine
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ - C ₆	Stilbènes	Resvératol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes •Flavonols •Anthocyanes •Flavanols •Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésine
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	
(C ₁₅) _n	Tannins	

Plusieurs types de polyphénols peuvent avoir des propriétés anti-inflammatoires, antivirales et anticarcinogènes (Rémésy, 2005).

- **Flavonoïdes** : les flavonoïdes, sont présents dans la plupart des plantes à des concentrations plus ou moins importantes. Ils sont composés d'une génine polyphénolique sous forme, de flavonones, de flavonols, associée à une ou deux molécules de sucre (glucose, rhamanose) (Martini, 2011). Ils sont responsables en

particulier de la coloration des fleurs, des fruits et même des feuilles, et ils assureraient aussi la protection des tissus superficiels contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets (**Roux et Catier, 2007**). Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales comme antioxydants, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation, certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, et des effets protecteurs sur le foie, d'autres renforcent les parois des capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins, les isoflavones à des effets œstrogéniques, sont efficaces dans le traitement des troubles liés à la ménopause (**Isrin, 2001**).

- **Tanins** : les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation très particulière dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelque fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes (**Roux et Odile, 2007**).

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins qui diffèrent par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique (**Bruneton, 2009**).

✚ **Tanins condensés** : les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols (**Macheix et al., 2005**), non hydrolysables, ils ont une structure voisine des flavonoïdes mais ne comportent pas de sucre dans leur molécule. Ils ont tendance à se polymériser pour donner des produits de coloration rouge ou brune (**Roux et Odile, 2007**).

✚ **Tanins hydrolysables ou tanins galliques** : ce sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) ou d'un polyol et d'un nombre variable de molécules acide phénol (acide gallique souvent) (**Roux et Odile, 2007**).

Les tanins présentent des propriétés astringentes, antidiarrhéiques, antibactériennes et antifongiques. Certains présentent également des propriétés vitaminiques. Les tanins hydrolysables sont des piègeurs de radicaux libres et de l'ion superoxyde (**Gazengel et Orecchioni, 2013**). Ils coagulent les protéines du derme, d'où leur utilisation pour le tannage des peaux (**Botineau, 2010**).

- **Coumarines** : souvent odorantes (ce sont celles qui donnent son odeur à l'herbe fraîchement coupée) (**Robert et Catesson, 2000**). Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses, certains contribuent à fluidifier le sang alors que d'autres soignent les affections cutanées (**Isrine, 2001**), ils présentent aussi une activité antimicrobienne (**Lansing et al., 2003**).
- **Anthocyanes** : les anthocyanes sont des composés hydrosolubles de teinte rouge, violette ou bleue, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Les anthocyanes sont présents dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proche des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques (**Roux et Cartier, 2007**). Les anthocyanes possèdent des propriétés vitaminiques par amélioration de la résistance des capillaires et diminution de leur perméabilité (**Martini, 2011**).
- **Saponines** : principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, les saponines doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau, ils existent sous deux formes : stéroïdes et les triterpénoïdes. (**Isrine, 2001**). Les propriétés pharmacologiques les plus fréquentes pour ce groupe de molécules sont les suivantes : antifongique, anti-inflammatoire, analgésique, d'antitriglycérine et régulateurs des taux de cholestérol dans le sang, anti-ulcérogénique et sédatif du système nerveux central (**Pharmacopée Caribéenne, 1999**).
- **Quinones** : les quinones sont des cétones cycliques, c'est à-dire des composés formés par un noyau benzénique dans lequel deux atomes d'oxygène se substituent à deux atomes d'hydrogène. (**Dajoz, 2010**). Elles sont d'utilisations diverses comme ; antispasmodique, anti diarrhéique, antiseptique et anti-inflammatoire (**Arnalschnebel et al., 2007**).

CHAPITRE II

Matériel et Méthodes

Notre stage pratique s'est étalé sur une période de trois mois, de juin jusqu'au mois de septembre 2015. Les différentes expérimentations de cette étude ont été effectuées dans les structures suivantes :

- laboratoire physico-chimique du complexe Antibiotical du groupe Saidal Médéa afin d'effectuer le screening phytochimique, l'analyse par HPLC des flavonoïdes et les acides phénoliques et évaluer l'activité antioxydante par deux méthodes.
- laboratoire pharmacotoxicologie du complexe Antibiotical du groupe Saidal Médéa pour réaliser le test de toxicité et l'activité antispasmodique.
- laboratoire d'hygiène de Blida pour évaluer l'activité antimicrobienne et la recherche de la CMI.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Cistus albidus L.* La plante a été récoltée durant le mois d'avril 2015, dans la région d'El Hamdaniya, wilaya de Médéa, l'altitude de cette zone est 380 m (par rapport au niveau de la mer), la récolte a été effectuée durant le temps ensoleillé, le type d'échantillonnage était au hasard et la quantité de la plante entière récoltée a été 1kg.

Les feuilles (95g) ont été séchées dans une étuve réglée à $35^{\circ}\text{C} \pm 02$, chaque 4 jours nous pesons les feuilles, afin d'obtenir deux pesées successives constantes (89,11g). Le séchage des feuilles de *Cistus albidus* a duré 30 jours. Une fois l'échantillon est bien séché, il a été broyé à l'aide d'un moulin électrique, et la poudre a été conservée dans des boîtes en verre teinté hermétiquement fermées.

II.1.1.2. Matériel animal

Notre matériel animal se compose de :

- 54 souris de sexe mâle pour les activités : antispasmodique (24 souris) et le test de toxicité (30 souris).

Les souris sont de souche Albinos NMRI, provenant de l'animalerie du laboratoire de pharmacotoxicologie du complexe Antibiotical-SAIDAL (Médéa). Le poids corporel des souris est de $25 \pm 1\text{g}$.

- Conditions d'hébergement : Ces souris sont placées dans un local à ambiance contrôlée :
 - La température : ambiante.
 - La photopériode : 10 heures par jour.

Bactéries et Champignons:

- Pour la réalisation de l'activité antimicrobienne, nous avons utilisé 06 souches de référence ATCC (tableau II).

Tableau II : Souches utilisées pour la réalisation de l'activité antimicrobienne.

Souches	ATCC	Origine	Type	Maladies
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Saidal Médéa	Gram +	Infections cutanées, osseuses, génito-urinaires et infections nosocomiales (Baudry, Brézellec, 2006).
<i>Bacillus cereus</i>	10876	Saidal Alger	Gram +	Provoque chez les patients des nausées, des vomissements et des crampes abdominales (Delarras, 2014)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Saidal Médéa	Gram -	Responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales (Pividori et Le Heurt, 2011).
<i>Escherichia coli</i>	25922	Saidal Médéa	Gram -	Responsable de 80% des infections urinaires communes (Chartier, 2004).
<i>Candida albicans</i>	24433	Saidal Médéa	Levure	S'il prolifère de façon anarchique, ses répercussions sur la santé sont multiples mycoses, éruptions cutanées (Lefief-Delcourt, 2012).
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	Saidal Alger	Moisissure	Provoque des infections respiratoires (Boussaroque et al., 2006).

II.1.2. Matériel non biologique

La verrerie, les appareils et les réactifs utilisés sont portés en annexe I.

II.2.Méthodes

II.2.1. Evaluation de la teneur en eau

La teneur en eau, dans notre échantillon (la poudre des feuilles sèches), a été déterminée par le procédé de dessiccation à une température de 105° C dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**Linden et Lorient, 1994**).

Considérons :

X : Poids de l'échantillon (mg).

Y : Poids de l'échantillon après déshydratation (mg).

T% : Teneur en eau exprimé en pourcentage (%).

$$T\% = \frac{X - Y}{X} \times 100\%$$

II.2.2.Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent 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.

II.2.2.1.Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, nous avons mis 10g de poudre en présence de 60ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure puis filtré. L'extrait aqueux est soumis aux tests suivants :

- **Mise en évidence de l'amidon**

Nous avons chauffé 5ml d'extrait aqueux avec 10ml de solution saturée de NaCl dans un bain-marie jusqu'à ébullition, puis nous avons ajouté 2 à 3 gouttes du réactif amidon (voir annexe I). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée (**Bruneton, 1999**).

- **Mise en évidence des saponosides**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant 2 à 3 ml d'eau distillée à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée :

-Pas de mousse = test négatif

-Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif

-Mousse de 1-2 cm = test positif

-Mousse plus de 2 cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**).

- **Mise en évidence des tanins**

Nous avons rajouté à 1ml d'extrait aqueux, 1ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes d'une solution de FeCl₃ à 5%. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins (**Bruneton, 1999**).

- **Mise en évidence des Anthocyanes**

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de Hcl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (**Debrayb et al., 1971 ; Paris et al., 1969**).

II.2.2.2. Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, nous avons mis 10g de poudre en présence de 60ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure puis filtré. L'extrait éthanolique est soumis aux tests suivants :

- **Mise en évidence des flavonoïdes**

Nous avons rajouté à 5ml d'extrait éthanolique 1ml d'Hcl concentré et 0,5g de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence par le développement d'une couleur rose ou rouge après 3 minutes (**Paris et al., 1969**).

- **Mise en évidence des tanins**

Nous avons ajouté à 1 ml de l'extrait éthanolique 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. L'apparition d'une coloration bleu-noire révèle les tanins galliques alors que la couleur bleu-verte révèle les tanins catéchiques (**Trease et Evans, 1987**).

- **Mise en évidence des composés réducteurs**

Nous avons rajouté à 1ml d'extrait éthanolique, 2ml d'eau distillée et 20gouttes de liqueur de Fehling, puis nous avons chauffé. La présence des composés réducteurs se caractérise par la formation d'un précipité rouge-brique (**Trease et Evans, 1987**).

II.2.2.3. Autres métabolites secondaires

- **Mise en évidence des coumarines**

Nous avons déposé 1g de poudre végétale dans un tube à essai en présence de 02 à 03 gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain marie pendant 05 minutes. Puis nous ajoutons 0,5 ml de NH₄OH dilué (10%) et nous mettons deux taches sur un papier filtre qui sont examinées sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

- **Mise en évidence des stérols et triterpènes**

Nous avons macéré 1g de poudre dans 10ml d'éther pendant 24 heures. Après filtration, nous avons évaporé le filtrat à sec au bain-marie et nous avons repris la concrète avec 0,5ml d'anhydride acétique, 0,5ml de chloroforme et rajouter 3ml de l'acide sulfurique concentré. En cas de réaction positive un anneau rouge-brunâtre ou violet se forme à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante prend une coloration verte ou violette (**Trease et Evans, 1987**).

- **Mise en évidence des alcaloïdes**

Nous avons macéré 1g de poudre végétale dans 5ml d'acide sulfurique concentré pendant 24 heures, dilué au 1/10 à la température ambiante du laboratoire. Après filtration sur un papier lavé à eau distillée et de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat, 1ml du filtrat est introduit dans deux tubes à essai avec 5 gouttes du réactif de Dregendorff (voir annexe I), la réaction positive se révèle par un précipité rouge (**Paris et al., 1969**).

II.2.3. Extraction des flavonoides (flavones, flavonols et anthocyanes) et des acides phénols

- ❖ **Principe**

La technique utilisée a été mise au point par **Lebreton en 1967** à partir du schéma initial de **Bate-Smith en 1954**. Elle consiste à une hydrolyse acide et à chaud qui permet de clarifier

le problème analytique posé par la présence simultanée de O et C-glycosides de flavones et flavonols.

La liaison C-O-C des O-glycosyl-flavonoides est une liaison très fragile qui se rompt à l'hydrolyse acide ou enzymatique en libérant les aglycones, par contre la liaison C-C des C-glycosyl-flavonoides est très résistante à ce type d'hydrolyse. Par conséquent, l'hydrolyse acide de la poudre végétale permet d'obtenir deux types de composés :

- Une fraction d'aglycones et d'acides phénols récupérée par l'extraction préliminaire à l'éther.
- Une fraction de C-glycosides et d'anthocyanes récupérée par l'extraction au n-butanol.

❖ **Protocole expérimentale**

Dans un bécher, nous introduisons 1g de poudre végétale ainsi que 80 ml d'acide chlorhydrique (HCl) à 2N. L'hydrolyse ainsi obtenue est portée dans un bain marie à 40°C pendant 40 min. Au cours de cette période il est nécessaire d'effectuer des insufflations d'air grâce à une pipette pasteur toute les 10 mn pour faciliter l'oxydation et par conséquent la transformation des proanthocyanidines en anthocyanidines homologues.

Après refroidissement, nous effectuons trois bains successifs d'éther de 50 ml chacun dans une ampoule à décanter. A chaque extraction deux phases apparaissent, l'une supérieure dite épi phase et l'autre inférieure dite hypo phase.

L'épiphase de couleur jaune verdâtre contient les aglycones (flavones, flavonols) et les acides phénols, elle est récupérée après chacun des trois bains dans une boîte de Pétrie et évaporée à l'air libre.

Le résidu sec est repris dans 5 ml de méthanol et analysé par chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P) à 265nm et à 365nm.

Nous Mettons chaque étalon dans 3 ml de méthanol HPLC et nous les faire passer à 265nm et à 365nm en HPLC.

L'identification des acides phénoliques et des aglycones flavoniques a été réalisée par HPLC.

❖ Principe de la Chromatographie à haute performance

La chromatographie liquide haute performance (HPLC), est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire (El Rhobari, 2014).

• Conditions d'analyse

-La phase mobile : 55ml d'eau distillée, 45ml de méthanol et 5ml d'acide acétique.

-Le type de séparation est isocratique ; le volume d'injection est de 20µl et à un débit de 1,5 ml/min.

-Detecteur : spd-10a vp; control: scl-10a vp; pompe: lc10-ad vp; Degazeur: dgu-12a; Four:cto-10a.

-L'analyse est réalisée à l'aide d'une colonne C18 à deux longueurs d'onde ; à 265nm pour les acides phénoliques et 365nm pour les aglycones flavoniques.

-La marque du matériel HPLC est Shimadzu.

II.2.4.Evaluation de la toxicité (DL₅₀) *in vivo***❖ Principe**

La DL₅₀ est la dose responsable statistiquement à la mort de 50% des animaux d'expérience (Stora, 2013). La méthode expérimentale consiste à administrer à des lots d'animaux des doses croissantes de la substance. Le but est de mettre en évidence un pourcentage de mortalité variant entre 0% pour une dose non létale, et 100% pour la dose tuant toutes les souris du lot. Les lots sont constitués d'une façon homogène, chaque lot correspond à une dose et tous les animaux d'un lot reçoivent la même dose (Stora, 2013).

❖ Mode opératoire

Pour réaliser ce test nous avons utilisé le protocole de Saidal

Nous avons utilisé pour ce test 30 souris de poids corporel de 25±1g. Les souris ont été répartis en 6 lots à raison de 5 souris par lot.

A l'aide d'une aiguille d'incubation, chaque lots reçoivent par la voie orale 0,5ml de l'infusé à différentes concentrations de 0,25g/kg ; 0,5g/kg ; 1g/kg ; 1,5g/kg ; 2g/kg et 2,5g/kg. Nous avons suivi les souris pendant 15 jours.

II.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante a été réalisée par deux méthodes différentes : méthode de ferricyanure et la méthode de Molybdate Phosphate.

✚ Préparation de l'extrait aqueux

Nous rajoutons à 10g de poudre des feuilles 100ml d'eau distillée, le mélange ensuite est chauffé pendant 15min (cela est valable pour l'acide ascorbique 0,5g/10ml), puis nous filtrons.

✚ Préparation de l'extrait éthanolique

Nous maceron durant 2j, 10g de poudre de feuilles dans 100ml du mélange éthanol-eau 70/30 v/v. Après filtration, le filtrat est séché à sec pour obtenir une concrète.

A partir de l'extrait aqueux et la concrète éthanolique, nous avons préparé une solution mère de 1mg/ml dans l'eau distillée, afin de préparer des dilutions.

II.2.5.1. Méthode de ferricyanure (FRAP)

❖ Principe

Le pouvoir réducteur est la capacité d'un extrait à donner un électron et à réduire le Fer. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (**Huang et al., 2004; LI et al., 2009**).



La couleur jaune de la solution de ferricyanure de Potassium vire vers une couleur bleue verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque extrait. Le pouvoir réducteur des extraits polyphénoliques et anthocyaniques est déterminé par la mesure de l'absorbance à 700nm. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur (**Ribeiro et al., 2008**).

❖ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur par la méthode FRAP, a été déterminé suivant la méthode préconisée par (**Oyaizu, 1986**). En effet, nous avons mélangé 1ml de différentes concentrations de chaque extrait (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 mg/ml) dilué dans l'eau distillée avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de

potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min, après, nous avons ajouté 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%). Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. Nous avons mélangé 2,5 ml du surnageant de chaque concentration avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

II.2.5.2. Méthode de Molybdate Phosphate

❖ Principe

L'analyse de Molybdate Phosphate est un essai direct qu'on emploie principalement pour mesurer la possibilité et la puissance des antioxydants non enzymatiques. Cette méthode dépend de la réduction du Molybdate (VI) au Molybdate (V) et la formation d'un complexe de Molybdate Phosphate de couleur verte, qui est détectée par spectrophotométrie en mesurant le changement de l'absorption à 695 nm (**Hill, 1994**).

❖ Mode opératoire

Nous préparons 100ml d'une solution réactif composée de trois solutions : 0,6M d'acide sulfurique, 28mM de phosphate du sodium et 4mM de Molybdate d'ammonium.

Nous avons ajouté à 400 μ l de différentes concentrations de chaque extrait (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 mg/ml) dilué dans l'eau distillée 4ml de la solution précédente, le mélange est placé dans un bain marie à une température de 95 C° pendant 90 min. Après refroidissement l'absorbance est mesurée à 695 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Prieto et al. ; 1999**).

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

Après avoir les résultats de l'activité antioxydante par les deux méthodes, nous calculons les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$\% I = \frac{D_{ref} - D_{ech}}{D_{ref}} \times 100\%$$

%I : Pourcentage d'inhibition (%).

DO : Densité optique (nm).

✚ Calcul des IC50

IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de Fer ou Molybdate. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'absorbance en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

II.2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro*

L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes soumis à l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de *C. albidus*. Elle a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu solide ; deux milieux différents ont été utilisés (Voir annexe I) : gélose de Muller Hinton et gélose de Sabouraud. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de diffusion sur milieu solide ou la méthode de disques.

❖ Principe de la méthode des disques

Le principe de cette méthode technique est relativement simple. Lorsqu'un disque imprégné d'un antibiotique est placé sur une gélose préalablement inoculée avec la bactérie testée, il s'humidifie et l'antibiotique diffuse radialement dans la gélose (**Lansing et al., 2010**). Si le microorganisme, est sensible à un antibiotique donné, une zone d'inhibition de croissance apparaît autour du disque contenant cet antibiotique (**Singleton, 2005**).

❖ Mode opératoire

▪ Préparation de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique

La préparation des deux extraits est la même que celle de l'activité antioxydante (voir page19).

▪ Conservation et repiquage des souches

Les souches sont conservées à 4°C dans des tubes stériles contenant 10ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive). A partir de ces tubes à essai, nous avons réalisé un repiquage. Les milieux sont incubés respectivement à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 48 h pour les levures.

▪ **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture microbienne pure et fraîche, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur 4 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques, nous avons déchargé la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile ensuite nous avons agité la suspension microbienne (bien homogénéiser) à l'aide d'un vortex.

▪ **Ensemencement**

Nous avons trempé un écouvillon stérile dans la suspension microbienne, et nous frottons la totalité de la surface gélosé par des stries serrées et refait l'opération quatre fois, en tournant la boîte de Pétri de 45° à chaque fois et nous avons fini l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

▪ **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, nous imbibons un disque de papier filtre de 9mm de diamètre par l'extrait aqueux et éthanolique ensuite nous déposons le disque à la surface du milieu de culture ensemencé.

Après 15min nous incubons les boîtes dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24h pour les bactéries et 5j pour les champignons.

Lecture :

-La zone claire autour du disque indique la présence d'une activité inhibitrice (diamètre du disque incluse).

-L'absence de cette zone indique l'absence d'activité inhibitrice (**Pharmacopée Européenne, 2004**).

Selon (**Meena et Sethi ,1994**), les diamètres des zones d'inhibitions de la croissance microbienne sont classés en quatre (04) catégories (tableau III) :

Tableau III : Diamètres des zones d'inhibition selon le degré de sensibilité

Degré de sensibilisation des souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Souche résistante	$D < 10$
Souche sensible	$10 \leq D \leq 16$
Souche très sensible	$16 \leq D \leq 28$
Souche Entraînement sensible	$D > 28$

II.2.6.1. Recherche de la CMI

Concentration minimale inhibitrice (CMI) : exprimée en mg/l ou µg/ml, c'est la plus faible concentration qui inhibe toute croissance bactérienne (**Leporrier, 2011**).

❖ **Mode opératoire**

Nous avons préparé des dilutions décimales à partir d'une solution mère et nous avons reproduit les mêmes étapes d'ensemencement que celles du test antimicrobien.

II.2.7. Evaluation de l'activité antispasmodique *in vivo*

❖ **Principe**

Une réaction douloureuse est provoquée chez les souris par injection intrapéritonéale d'acide acétique à raison de 0,10/10 g de poids corporel (Pc). Les douleurs se manifestent par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et des torsions de la musculature dorso-abdominale (spasmes) (**Rouibi et al., 2012**), qui peuvent être réduites par des substances antalgiques, par l'injection d'une substance irritante capable d'entraîner des mouvements de torsion (**Ouédraogo et al., 2012**).

❖ **Mode opératoire**

Pour réaliser ce test nous avons utilisé le protocole de Saidal:

Nous avons réparti les 24 souris de poids corporel de 22±00g en 4 lots. A l'aide d'une aiguille d'incubation pour la voie orale, chaque lots reçoivent 0,5ml de la solution : le 1^{er} lot reçoit de l'eau distillée (0,5ml/souris), le 2^{ème} lot reçoit le médicament de référence ; Phloroglucinol® à la dose de 25mg/ml, les 3^{ème} et 4^{ème} lots reçoivent deux concentrations différentes de l'infusé: 2,27g/kg et 2,72g/kg respectivement. Après 30min du traitement, nous injectons aux souris 0,1ml d'acide acétique à 1%. 5min après l'injection de l'acide acétique, nous comptons le nombre de spasmes pendant 15min.

➤ Le calcul du pourcentage de diminution des spasmes se fait par la formule suivante :

$$P\% = \frac{\text{nombre de spasme chez le lot témoin} - \text{nombre de spasme chez le lot traitée}}{\text{nombre de spasme chez le lot témoin}} \times 100\%$$

P : pourcentage de diminution des spasmes (%).

CHAPITRE III

Résultats et Discussion

III.1. Résultats de l'évaluation de la teneur en eau

La teneur en eau de la plante a été calculée afin d'évaluer la qualité du séchage de notre échantillon, nous avons trouvé une teneur en eau égale à 9,22%.

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % (**Paris et Moyse, 1965**).

III.2. Résultats des tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les feuilles de *Cistus albidus* sont regroupés dans le tableau IV.

Tableau IV: Résultats des tests phytochimiques.

Composés chimiques	Résultats
Amidon	-
Tanins	+
Tanins galliques	-
Tanins catéchiques	+
Flavonoïdes	+
Composés réducteurs	-
Coumarines	-
Stérols et triterpènes	-
Alcaloïdes	+
Anthocyanes	-
Saponines	+

+ Présence / - Absence.

Dans les feuilles de *C. albidus*, la recherche de l'amidon, les composés réducteurs, les coumarines, les stérols, les triterpènes et les anthocyanes s'est montrée négative. Par contre, les tanins, les flavonoïdes, les tanins catéchiques, les alcaloïdes et les saponines sont présents (tableau IV).

N.B : de point de vue quantitatif, nous avons observé que les feuilles de *C.albidus* sont riches en saponines et alcaloïdes.

Houate et al (2000), ont rapporté la présence des flavonoïdes et des tanins dans les feuilles de *Cistus ablidus*.

L'extrait aqueux des feuilles de *Cistus ladanifer* contient les tanins galliques, les tanins cathéchiques, les flavonoïdes et les saponines (**Bousta et al., 2013**).

Lamnaour (2002), a prouvé que les feuilles de *Cistus salviifolius* contiennent des flavonoïdes et des tanins galliques.

Les testes phytochimiques réalisés sur les fruits d'*Helianthemum lippii* (espèce appartient à la famille des Cistacées) ont révélé la présence des saponosides et des tanins dans l'extrait aqueux, des flavonoïdes et des composées réducteurs dans l'extrait éthanolique et des alcaloïdes dans la poudre végétale (**Benmansour, 2013**).

III.3.Résultats de l'extraction des flavonoïdes (flavones, flavonols et anthocyanes) et des acides phénols.

Les résultats de l'identification des flavonoïdes et des acides phénols sont représentés respectivement dans les figures 02 et 03.

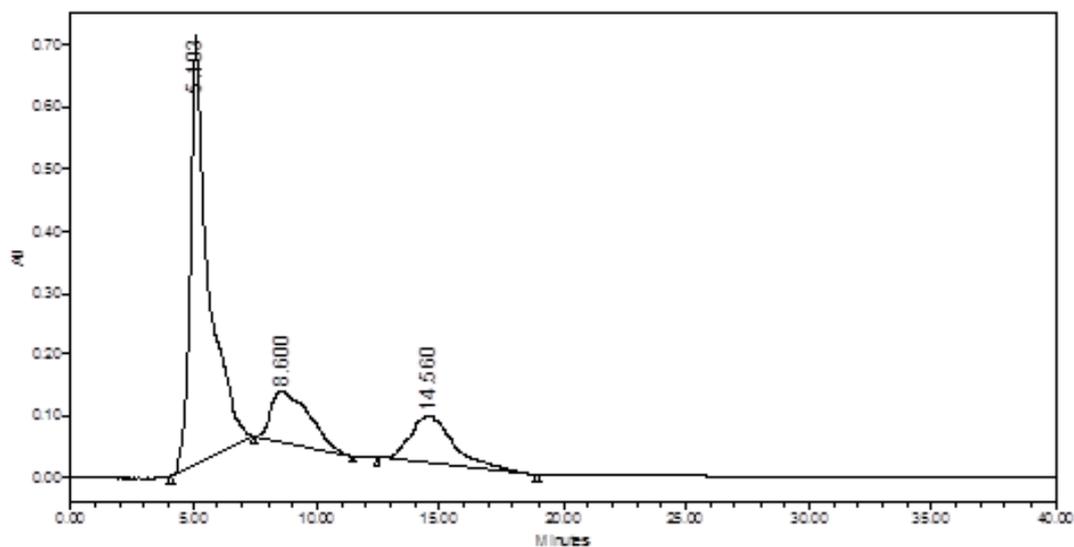


Figure 02 : Chromatogramme d'analyse par HPLC de l'extrait étheré à 265nm.

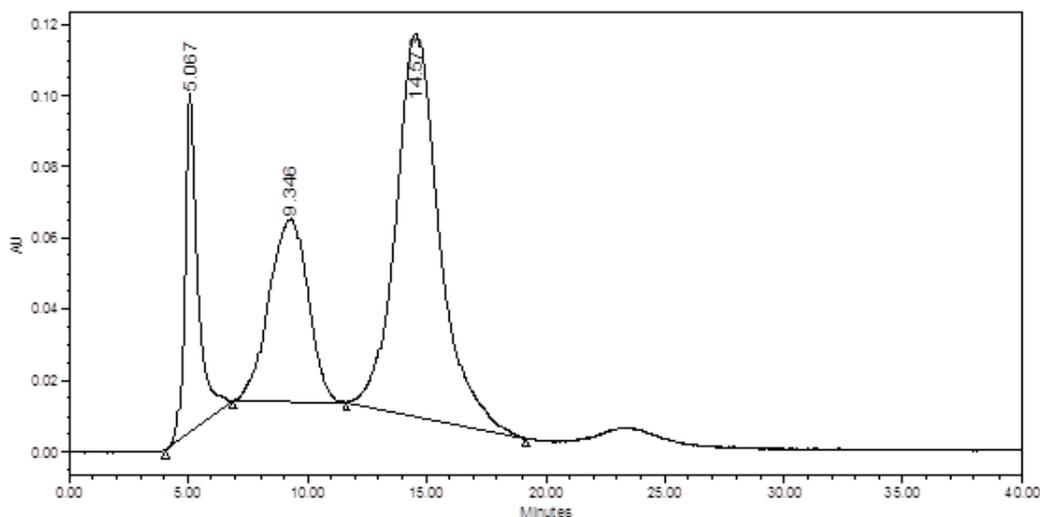


Figure 03: Chromatogramme d'analyse par HPLC de l'extrait éthéré à 365 nm.

A l'issue de cette analyse, nous avons obtenu trois pics lors de l'injection à 265nm et à 365nm. Nous avons pu identifier au temps de rétention $t = 5,19$ min l'acide cinnamique, et à $t=9,34$ min le Kaemphérol.

Nos résultats ne concordent pas avec les résultats de **Barrajón-catalán et al (2011)**, qui ont analysés par la méthode de chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) l'extrait aqueux de la partie aérienne de 10 espèces différentes de *Cistus* issues de l'Espagne où ils ont trouvé que le *Cistus albidus* est riche en flavonoïdes parmi lesquelles se trouvent les : catechénine, epicatechine, gallocatéchine, (epi) gallocatéchine, (epi) catechine dimer, (epi) gallocatéchine-(epi) gallocatéchine dimer, diglycosyl apigénine, la rutine, la myricitrine, la quercitrine et la quercetin-3-O(2'-cumaroyl) rutinoside, ainsi il contient les polyphénols qui sont : uralenneoside, et l'acide hydroxy ferulique. Ils ont signalé aussi la présence de l'acide gallique besides, ellagitannins, pedunculagin et glucogallin.

La composition chimique des plantes médicinales dépend de plusieurs facteurs : du climat et de la nature du sol sur lequel elles sont cultivées, de leur âge et de leur cueillette, leur dissection et leur conservation (**Metuedjo, 2003**), l'espèce à laquelle appartient la plante prélevée, le matériel végétal (feuilles, fleurs, rameaux, fruits...) utilisé pour produire les extraits, ainsi que le procédé employé pour réaliser l'extraction (**Burt, 2004**). Cela peut expliquer la différence entre les résultats obtenus.

III.4. Résultats de l'évaluation de la toxicité (DL50)

Les résultats du test toxicité des feuilles de *Cistus albidus* sont regroupés dans le tableau V.

Tableau V : Résultats de l'évaluation de la toxicité des feuilles de *Cistus albidus*

	Lot 01	Lot 02	Lot 03	Lot 04	Lot 05	Lot 06
Dose de l'infusé	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Nombre de souris morts	0	0	0	0	0	0

D'après les résultats du tableau V et après deux semaines de suivi des souris sur lesquelles nous avons réalisé le test toxicologique, aucun cas de mortalité n'est signalé pour les 6 lots d'expérimentation. Leur comportement était tout à fait normal par rapport au lot témoin.

Ces résultats confirment l'innocuité de la forme traditionnelle d'utilisation (décocté) de *Cistus albidus*

La survie des souris serait due à la présence des tanins qui sont considérés comme des contre poisons des alcaloïdes (**Paris et Moyse 1981**).

III.5. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

III.5.1. Résultat de l'activité antioxydante par méthode ferricyanure

Les résultats du test antioxydant par la méthode ferricyanure sont représentés respectivement par les figures 04 et 05 (tableau X annexe II):



Figure 04: Résultats de l'activité antioxydante (réduction du Fer).

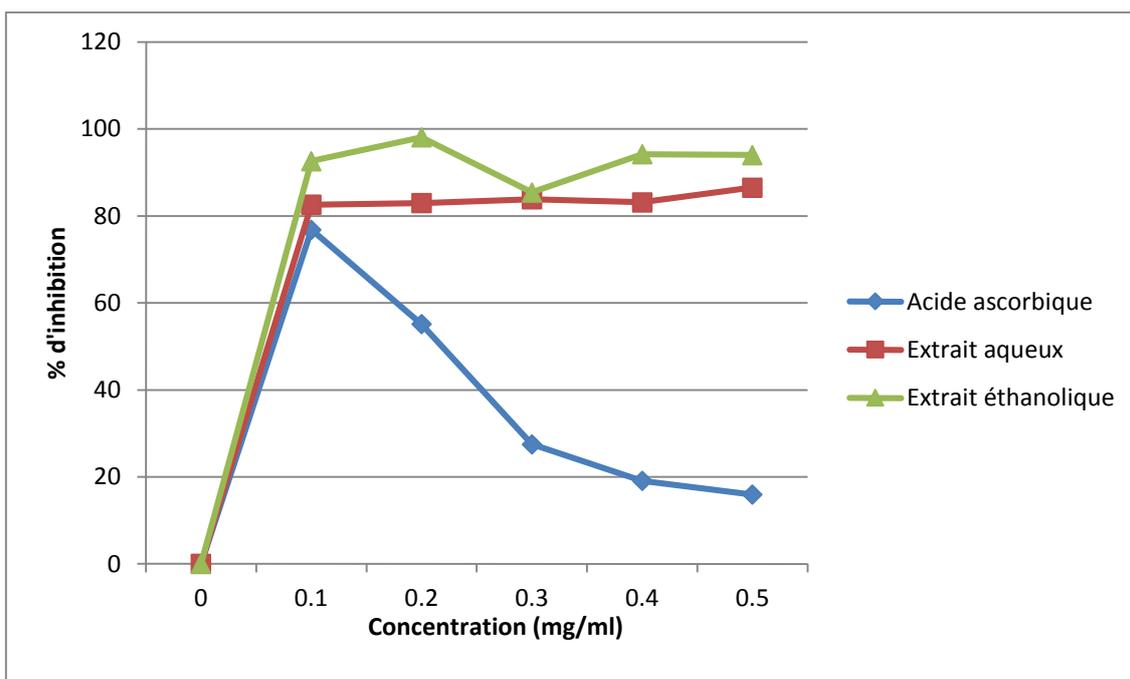


Figure 05 : % d'inhibition en fonction de la concentration par la méthode Ferricyanure.

III.5.2. Résultat de l'activité antioxydante par méthode Molybdate Phosphate

Les résultats du test antioxydant par la méthode Molybdate phosphate sont représentés respectivement par les figures 8 et 9 (tableau XI annexe II):

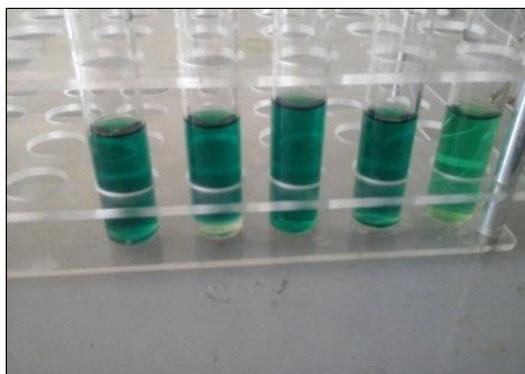


Figure 06 : Résultats de l'activité antioxydante (Molybdate Phosphate).

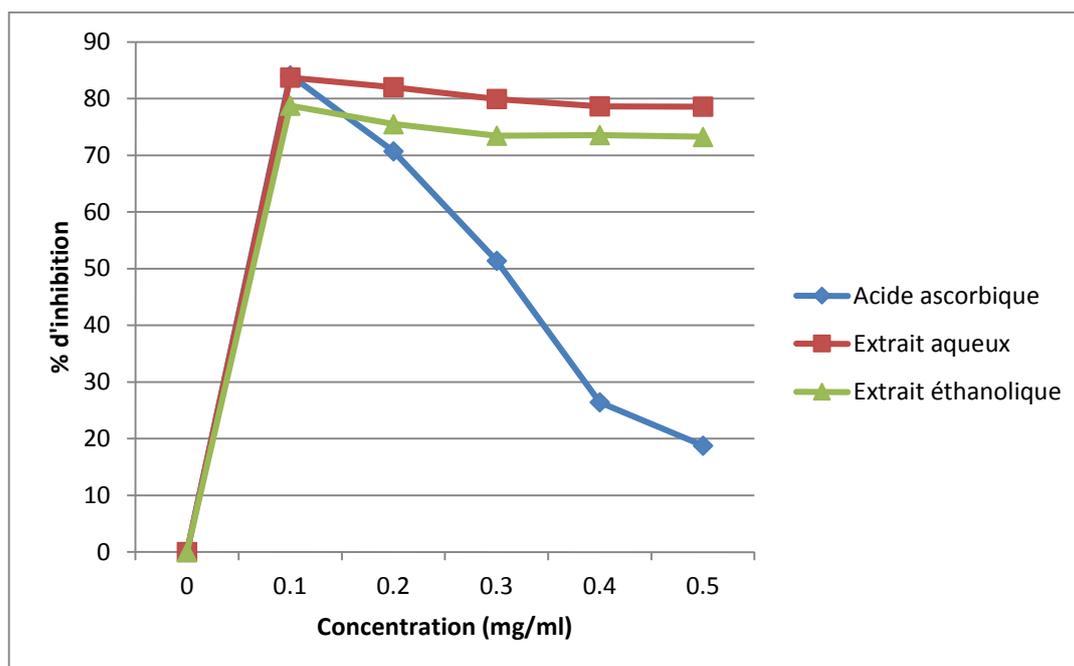


Figure 7 : % d'inhibition en fonction de la concentration par la méthode Molybdate Phosphate.

D'après les figures 04 et 06, nous constatons que la couleur des deux extraits a été changée vers la couleur verte. Le virage de la couleur indique la présence d'une activité antioxydante.

Afin de comparer l'activité antioxydante des deux extraits de la plante par les deux méthodes, nous avons calculé IC_{50} . Les résultats obtenus ont montré que les IC_{50} (mg/ml) des deux extraits par les deux méthodes par rapport à l'acide ascorbique sont respectivement 0,05mg/ml et 0,07mg/ml (figure 8).

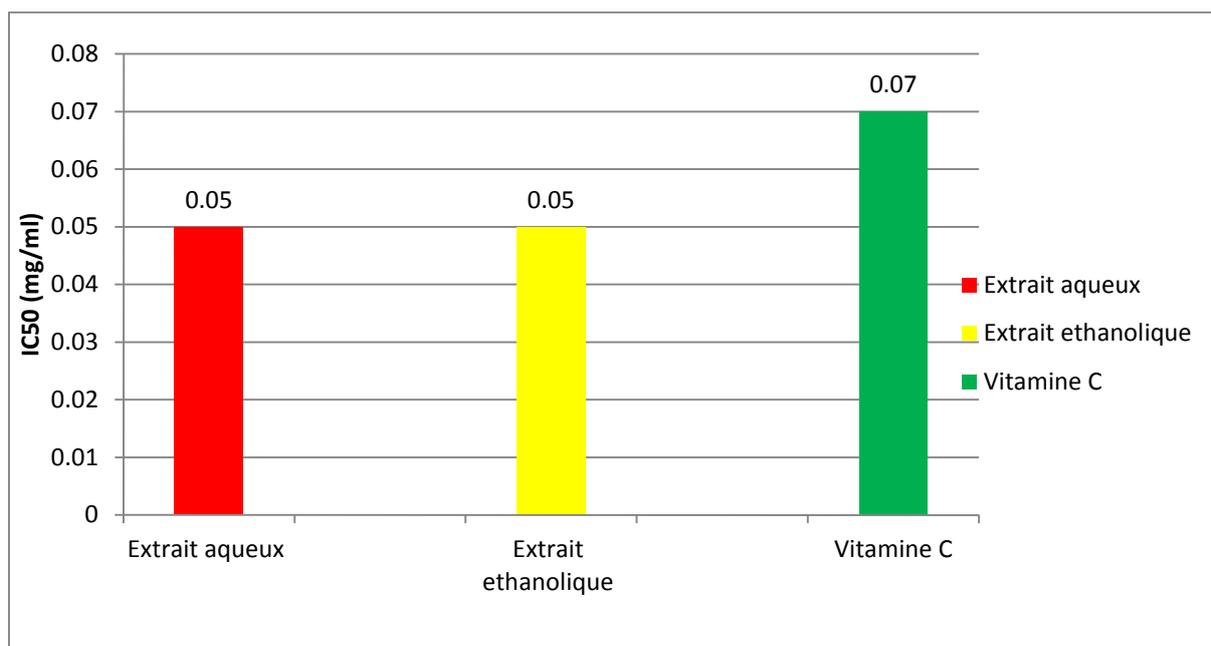


Figure 8 : Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50 % du fer et de Molybdate phosphate en fonction des différents extraits.

Selon **Barkat et Laib (2011)**, plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

Nous pouvons dire que notre plante a montré un pouvoir antioxydant plus important que *Helianthemum lippii*. Les IC₅₀ (mg/ml) de l'extrait méthanolique des feuilles, tiges et partie fleurie d'*Helianthemum lippii* originaire d'Algérie sont respectivement 0.466 ± 0.009 , 0.253 ± 0.004 et 0.353 ± 0.009 (**Belyagoubi, 2012**).

L'activité antioxydante de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de *Cistus albidus* atteint respectivement 86,53% et 98,11% pour des concentrations 0,5mg/ml et 0,2mg/ml par la méthode de ferricyanure, alors que cette activité atteint par la méthode de Molybdate de Phosphate 83,72% et 78,77% pour la concentration 0,1mg/ml.

Nos résultats ne concordent pas avec les résultats de **Benayad (2013)**, qu'a trouvé que l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *Cistus ladaniferus* originaire de Maroc ont présenté une forte activité antioxydante, cette activité atteint 100% pour une concentration de 10 µg/ml pour les deux extraits. Les extraits de dichlorométhane et de l'hexane prononcent une activité moyennement faible qui peut atteindre respectivement 38% et 20% (**Benayad, 2013**).

Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier (**Brand-Williams, 1995**).

L'étude menée par **Jeong et al. (2004)**, a montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Par ailleurs, **Yildirim et al. (2001)** indiquent qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes.

Le pouvoir réducteur de l'espèce *Cistus albidus* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques et flavonoïdes qui peuvent servir comme donneur d'électron. Selon **Heim et al (2007)**, plusieurs études ont montrés que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants ((**Shahidi et Naczk, 2004 ; Siddhuraju et Becker, 2007**).

Dudonné et al. (2009) ont prouvé que l'extrait aqueux de *Cistus ladaniferus* originaire d'Espagne contient une importante composition en polyphénols et une bonne activité antioxydante et ceci en utilisant les différentes méthodes de la détermination de cette activité.

Jusqu'à présent, il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (**Prior et al., 2005**). Pour cette raison, nous avons combiné deux techniques complémentaires.

III.6. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de *Cistus albidus* a montré que :

- les diamètres d'inhibitions des deux extraits sont très faibles ;
- les *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* sont sensibles aux deux extraits ;
- les *Pseudomonas aeruginosa* sont très sensibles aux deux extraits ;
- les *Aspergillus brasiliensis* résistent aux deux extraits.

En 2005, une étude a été faite sur cinq espèces de *Cistus* se trouvant en Turkey, il s'agit de *C. creticus* L., *C. laurifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. parviflorus* L., et *C. salviifolius* L.

Dans cette étude l'activité antibactérienne des extraits : aqueux, méthanolique, chloroformique, butanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle, qui ont été testées sur *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Tous les extraits testés ont inhibé la croissance des bactéries testées sauf *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* qui ont montré une certaine résistance (**Güvenc et al., 2005**). Ces résultats ne concordent pas avec nos résultats, l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de *C.albidus* ont inhibé la croissance des bactéries testées (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E.coli* *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*) sauf *Aspergillus brasiliensis* qui a montré une résistance.

Nos résultats concordent avec les résultats de **Bouamama et al (2006)**, qu'ont montré que les extraits aqueux et organiques des espèces *C. villosus L* et *C. monspeliensis L* marocaines sont dotés d'un pouvoir antimicrobien intéressant vis-à-vis des microorganismes responsables de beaucoup d'infections chez l'homme.

Il ressort des résultats obtenus que l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de *Cistus albidus* de la région de Médéa prononce une activité inhibitrice sur l'ensemble des bactéries testées aussi bien les bactéries Gram négatives que Gram positives malgré que les diamètres d'inhibitions ne sont pas vraiment grandes.

Selon **Mann et al. (2000)**, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont la réputation d'être des germes résistants aux agents biocides, cela est lié à leur grande capacité à développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, leur implication fréquente dans les infections nosocomiales. Alors cette bactérie a été très sensible aux deux extraits de notre plante.

Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en composés polyphénoliques. Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs.

Selon **Sarker et al (2005)**, l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants, qui lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes, les polyphénols (**Rojas et al., 1992**), et les coumarines (**Lansing et al., 2003**).

III.6.1. Résultats de la détermination des CMI des deux extraits

Après la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, nous avons déterminé les CMI de l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de *Cistus albidus* par la méthode des dilutions,

Les résultats montrent que les diamètres des zones d'inhibition décroissent jusqu'à la dilution correspondante à la CMI, celle-ci est variable selon les souches testées.

D'après les tableaux VII et VIII, nous constatons que :

-les CMI de l'extrait aqueux varient entre 25 µg/ml et 125 µg/ml alors que celles de l'extrait éthanolique sont entre 2,5mg/ml et 5mg/ml ;

-les CMI de l'extrait aqueux sont faibles que celles de l'extrait éthanolique ;

-contre les *Staphylococcus aureus* et les *Bacillus cereus*, les CMI de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique sont respectivement 125 µg/ml et 5mg/ml;

-contre les *Pseudomonas aeruginosa*, les CMI de l'extrait aqueux et éthanolique sont respectivement 125 µg/ml et 2,5mg/ml.

- contre les *E.coli* et les *Candidas albicans*, 25 µg/ml et 5mg/ml sont respectivement les CMI de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique.

D'après ces résultats nous constatons que l'extrait aqueux a un bon pouvoir antimicrobien par rapport à l'extrait éthanolique.

Selon **Cimanga et al. (2002)**, la taille de la zone d'inhibition ne reflète pas la réelle efficacité antibactérienne d'un composé. Cependant, selon **Lewis et Ausubel (2006)**, une molécule phytochimique est considérée comme antimicrobienne si elle inhibe la croissance des microorganismes pour des valeurs de CMI comprises entre 0,1 mg/ml et 1 mg/ml. Donc l'extrait aqueux des feuilles de *C.albidus* est considéré comme un antimicrobien car les CMI allant de 25µg/ml à 125µg/ml.

Bouamama et al. (2006), a déterminé la sensibilité de *S. aureus* à différents extraits des feuilles de *C. villosus* et *C. monspeliensis* avec des CMI comprises entre 0,78 mg/ml et 1,56 mg/ml. Ces résultats ne concordent pas avec nos résultats, qui ont démontré que les concentrations minimales inhibitrices de *S. aureus* sont respectivement pour l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique 125µg/ml et 5g/ml.

III.7. Résultats de l'évaluation de l'activité antispasmodique

Les résultats de l'activité antispasmodique de nos quatre lots sont exprimés par la figure 9 (tableau XIII, annexe II) :

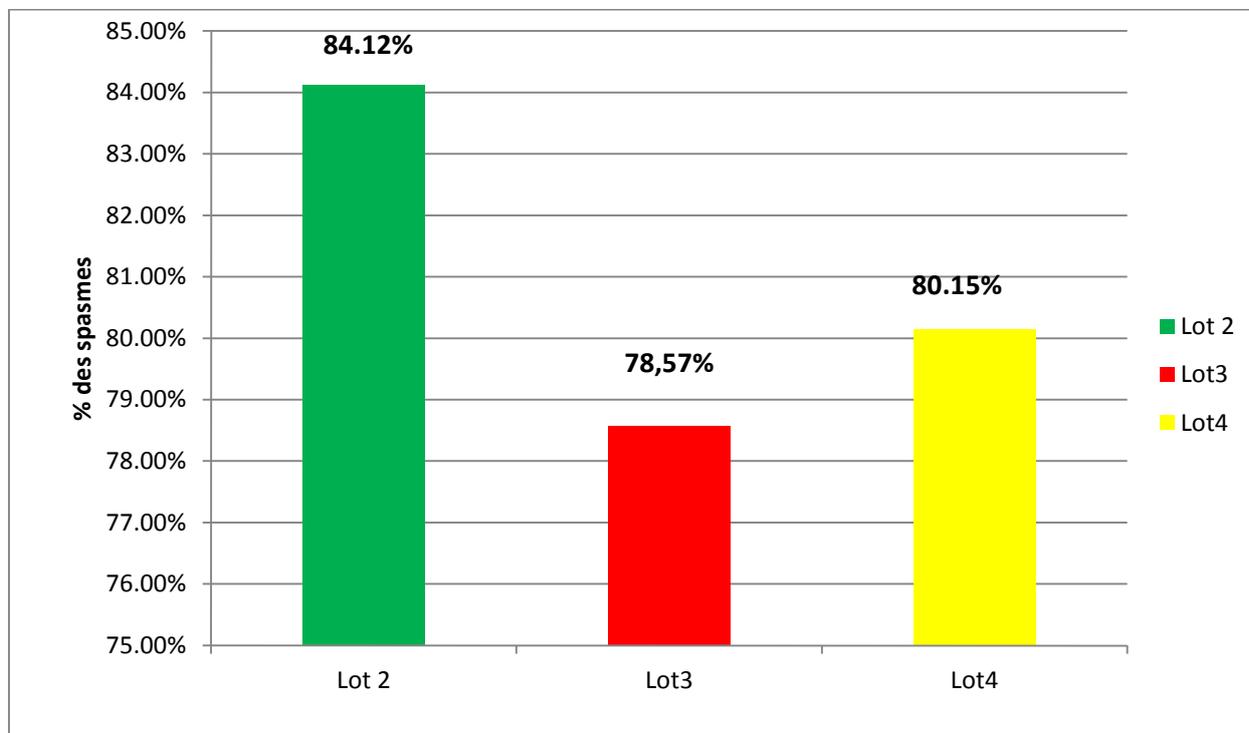


Figure 9: Résultats du test de l'activité antispasmodique des feuilles de *Cistus albidus*.

Lot 2: Phloroglucinol© (25mg/ml). Lot 3: *C.albidus* (2,27g/k). Lot 4: *C.albidus* (2,72g/kg).

D'après les résultats de la figure 9, nous constatons que l'effet antispasmodique des feuilles de *Cistus albidus* est apparent.

Le lot traité par Phloroglucinol© a réduit le nombre de spasme à 84,12%, tandis que pour les feuilles de *C.albidus* le pourcentage de diminution des spasmes par rapport au lot témoin (lot 1) est de 78,57% et 80,15%, respectivement pour la dose de 2,27g/kg et 2,72g/kg, cette dernière a donné un résultat presque aussi bon que le médicament de référence, nous déduisons donc que les feuilles de *Cistus albidus* montrent une bonne activité antispasmodique.

D'après les résultats de l'étude statistique par logiciel ANOVA (Annexe III), nous pouvons dire qu'il n'y a aucune différence significative ($p < 0.001$) entre le lot R (témoin +) et les 2 lots Essais (1 et 2) donc un effet antispasmodique similaire des extraits en comparaison avec le médicament de référence.

L'activité antispasmodique des feuilles de *Cistus albidus* serait due à l'action des quinones et/ou des alcaloïdes (**Arnal-Schnebelen et al., 2007 ; Gazengel et Orecchioni, 2013**).

Les cistes ou les Cistacées sont des arbrisseaux particulièrement aromatiques, surtout au niveau de leurs feuilles (**Boullard, 1997**). De nombreuses études *in vitro*, réalisées sur des préparations isolées d'intestins tels que l'iléon de cobaye, la souris ou le chat, ont prouvé que ces plantes aromatiques antagonistes (**Wichtl et Anton, 2003**).

Conclusion et perspectives

**Conclusion
Et
Perspectives**

Conclusion et perspectives

Conclusion

A l'issu de ce présent travail qui a porté sur l'étude phytochimique des feuilles de *Cistus albidus* et les tests de certaines activités biologiques de son extrait aqueux et éthanolique, nous sommes arrivé aux conclusions suivantes :

- Le screening chimique a révélé que les feuilles de *Cistus albidus* sont riches en métabolites secondaires : les tanins, les tanins catéchiques, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les saponines.
- L'analyse HPLC a permis d'identifier acide cinnamique à $t=5,19$ min et Kaémphérol à $t= 9,34$ min.
- L'infusé des feuilles de *Cisutus albidus* n'est pas toxique.
- L'étude de l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *Cistus albidus* par la méthode de la réduction du fer et celle du Molybdate Phosphate a montré que l'extraits éthanolique et l'extrait aqueux possèdent une activité antioxydante modérée avec $IC_{50} 0,05$ mg/ml inférieure à celle de l'acide ascorbique ($IC_{50}=0.07$ mg/ml).
- Le test de l'extrait aqueux et la concrète éthanolique sur les germes microbiens a montré leur efficacité contre les *Staphylococcus aureus*, les *Bacillus cereus*, les *E.coli*, les *Condida albican* et les *Pseudomonas aeruginosa* alors que les deux extraits sont inefficaces contre les *Aspergillus brasiliensis*.
- La recherche de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des deux extraits, a révélé que l'extrait aqueux à un bon pouvoir antimicrobien par rapport à l'extrait éthanolique. Les CMI de l'extrait aqueux varient entre $25\mu\text{g/ml}$ et $125\mu\text{g/ml}$, alors que celles de l'extrait éthanolique allant de $2,5\text{mg/ml}$ à 5mg/ml .
- Les feuilles de *Cistus albidus* ont montré également une activité antispasmodique importante.

Perspectives

Comme perspectives et en vue de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait nécessaire également :

-caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques par des méthodes spécifiques;

Conclusion et perspectives

-réaliser étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits testés ;

-évaluer d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aït Youssef, 2006 «Plantes médicinales de Kabylie. Thèse de Magister en Biotechnologie, option : Intérêt des microorganismes en agriculture et en agroalimentaire. Thème : Etude des associations mycorhiziennes entre quatre espèces de Terfèze et diverses plantes Cistacées et ligneuses en conditions contrôlées, Université d'Oran Es-Senia, Faculté des Sciences, Département de Biotechnologie» P : 68 et 69.

Arnal-schnabelen b., Goetz P., Hunin M., Iserin p., Jacquemin M., Lejene K., Rureau L., Delaporte D., Caffin M., Leroux J., Martin G., Paris M., Perry F., Schnabelenj-C., orecchioni A-M., Devecchy H., Raphal S., Illequin F., Tubery P., Gheoria K., Van vassart S., Vernet A., Morel M., 2007 «La santé par les plantes, Sélection du Reader's Digest, Phytothérapie» 447p.

Bahorun, T, 1997 «Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius» 94p.

Barajón-Catalán E., Fernández-Arroyo S., Rodlän C., Guillén E., Saura D., Segura-Carretero A.,Micol V, 2011 «Asystematic Study of the polyphenolic composition of aqueous Extracts Deriving from Several *Cistus* Genus Species: Evolutionaray Relationship.DOI 10.1002/pca.1281.Phytochem.Anal.2011, 22, 303-312»

Basaba Elisabeth , Fernando Calzada, Rafael Compos , 2007 «In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea Journal of Ethopharmacology» P: 109.

Belyagoubi N, 2012 -Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. THÈSE Pour l'obtention d'un Doctorat en Biologie Option : Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèse. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers .Département de Biologie. Algérie» P : 62.

Benayad Nisrin, 2013 «Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. Thèse de Doctorat. Université MOHAMMED V – AGDAL. Faculté des Sciences. Rabat.N° d'ordre : 2691» P :103

Références bibliographiques

Beniston N.T et Beniston W.S, 1984 «Fleurs d'Algérie. Edition Entreprise nationale du Livre. Algérie» 359p.

Benmansour Aoicha, 2013 «Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques des fruits d'*Helianthemum lippii* (Rguig). Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme Master en Biologie Option Science des aliments. Université Aboubakr Belkaid. Tlemcen. Alger» P : 33.

Botineau Michel, 2010 «Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Edition TEC & DOC. Lavoisier. Paris» 1403p.

Bouamama H. Noël T, Villard, Benharref A, Jana M ,2006 «Antimicrobial activity of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species, Journal of Ethnopharmacology, Vol 104 : 104-107».

Boustaa D., Faraha .A, Elyoubi-EL Hamsasa , EL Mansourib. L. Soidroua .SH, Benjlalia J, Adadi I, Grechea H, Lachkarc M , Alaoui Mhamdi M, 2013 «Phytochemical screening, antidepressant and immunomodulatory effects of aqueous extract of *cistus ladanifer l.* from morocco. International Journal of Phytopharmacology. Dalila Boustaa. et al. / International Journal of Phytopharmacology. 4(1), 2013, 12-17».

Boullard Bernard, 1997 «Dictionnaire. Plantes & champignons. Editions ESTEM. Paris» 875p.

Boussaroque Christine,Élisabeth Haentjens et Frédérique Jaquet, 2006 «Manuel pratique de l'auxiliaire de puériculture en pédiatrie et en néonatalogie. Edition estem.Issy-les-Moulineaux» 244p.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C, 1995 «Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie ,28, 25-30»

Brosse-Genevet Emmanuelle, Jeanne-Marie Albertini, Michel Etienne, Bernard Lambert, Eric Rigolot et Pascal Thavaud, 2003 «Gestion des Cistaies sur coupures de combustibles,N°07, RCC.qxd 19/09/03, édition de la Cardère Morières.»85p.

Bruneton. J, 1993 «Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème}édition : TEC et DOC, Paris» 915p.

Bruneton, J, 1999 «Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier. Paris»1120p.

Références bibliographiques

Bruneton Jean, 2009 «Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.) édition TEC& DOC , Lavoisier. Paris» 1292 p.

Chaumont Jean-Pierre et Millet-Clerc Joëlle, 2011« Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie, Editions TEC& DOC, Lavoisier. France» 263p.

Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., Verbist, J.F., 1994 «Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. Planta Medica 60. Thèse pour l'obtention du diplôme master en biotechnologie microbienne, Evaluation de l'effet antimycobactérien des extraits de plantes d'origine Marocaine, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et techniques de Fés» P :35.

Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ,2002 «Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo.*Journal of Ethnopharmacology*, 79(2): 213-220.»

Collectif, 2003 «Plantes couvre-sol : plantes du jardin. Edition Losange. Espagne» 127p.

Comandini O, Contu M, Rinaldi AC, 2006 «An overview of Cistusectomycorrhizalfungi, Mycorrhiza. Thèse de magister en Biotechnologie: Etude des associations mycorrhiziennes entre quatre espèces de terfez et diverses plantes Cistacées et ligneuses en conditions contrôlées, Université d'Oran Es-Senia » P : 68.

Dajoz Roger, 2010 «Dictionnaire d'entomologie : Anatomie, Systématique et Biologie. Edition TEC& DOC. Lavoisier. Paris» 348p.

Debray M, Jacquemin H et Razafindrambo R., 1971 «Travaux et documents de l'Orstom. N°08. Paris. France»

Delarras Camille, 2014 « Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier. Paris »772p.

Demetzos C, Angelopoulou P, Perdetzoglou P, 2002 «A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* **30**: 651-665 Denyer SP»

Références bibliographiques

Dimas K., Demetzos C., Angelopoulou, D., Kolokouris A., Mavromoustakos, T., 2000 Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines *in vitro*. Pharmacological Research. Thèse pour l'obtention du diplôme master en biotechnologie microbienne, Evaluation de l'effet antimycobactérien des extraits de plantes d'origine Marocaine, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et techniques de Fés» P :35.

Doukani Koula¹ ,TabakSouhila , Derriche Asma , HaciniZahira, 2014 «Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens, Revue Ecologie-Environnement (10) : 2014 ISSN: 1112-5888» P : 45.

Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM, 2009 «Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. J. Agric. Food Chem, 57 (5) : 1768-1774»

Dupérat Maurice, Polese Jean-Marie, 2008 «Encyclopédie visuelle des arbres &arbustes, Editions Artemis. Espagne» 239 p.

El RhobariKhaoula, 2014« Etude de stabilité d'un produit pharmaceutique dont le principe actif est la BENFOTIAMINE, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des sciences et techniques, Département de chimie. Maroc» 27p.

Felidj .M, Bouazza M, et T. Ferouani, 2010 «Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoidespussila (verticillata)* dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale) Short paper about the floristiccommunity and the interest of *Ammoidespussila (verticillata)*, a medicinal plant fromMounts of Tlemcen National Park (Western Algeria), Geo-Eco-Trop., 2010, 34 : 147 - 154 » P :154.

Gazengel Jean-Marie, Orecchioni Anne-Marie, 2013 «Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique (2e ed.), Lavoisier, Paris» 1761 p.

Grotenhermen , 2009 «Cannabis en médecine: un guide pratique des applications médicales du cannabis et du THC, Editions Indica, Sélestat. Hamburg» 212p.

Références bibliographiques

Guézennec Jean, 2014 «Bactéries marines et biotechnologies, Carnets de sciences, éditions Quæ, France» 176p.

Guignard, 2001 «Botanique. Systématique moléculaire. Thèse de magister en Biotechnologie: Etude des associations Mycorhiziennes entre quatre espèces de terfez et diverses plantes Cistacées et ligneuses en conditions contrôlées, Université d'Oran Es-Senia » P : 68.

Güvenç Ayşegül, Sulhiye Yıldız, Ayşe Mine Özkan, Ceyda Sibel Erdurak, Maksut Coşkun, Gülderen Yılmaz, Toru Okuyama et Yoshihito Okada, 2005 «Antimicrobial studies on turkish cistus species, Pharmaceutical biology. Vol. 43, n°2 : 178-183»

Haouat A.C, Sqalli H, Farah A, Haggoud A, Iraqui M, 2013 «Activité antimicrobienne des extraits de deux espèces marocaines du genre Cistus, Volume 11, //Issue 6, DOI 10.1007/s10298-013-0806-6 France» P : 365-372

Heim K.E., Tagliaferro A.R., et Bobilya D.J, 2002 «Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationship; Journal. Nutr. Biochem. 13: 572-584».

Hill S.E, 1994 «Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER, Spécialité : Chimie Option : Chimie organique physico-chimie et moléculaire Présenté par HadbaouiZine : Etude de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéique et phénoliques des grains de Sorgho local, Université Kasdi Merbah Ouargla» p76.

Huang H.Y., Chang C.K., Tso T.K., Huang J.J., Chang W.W. et Tsai W.C., 2004 «Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. International Journal of Food Science and Nutrition, Taiwan, Vol.55» p 423-429.

IPGRI, 2002 «Bulletin pour l'Afrique au sud du Sahara, la place des ressources phylogénétiques dans le renouveau de l'Afrique, Institut Internationale des ressources Phylogénétiques N° 17 Juillet 2002» 12p.

Iserin Paul, 1997 «Encyclopédie des Plantes Médicinales, 2eme édition, Paris, France : Thèse magister, Etude phytochimique de la plante *HelianthemumKahiricum*, université Hadj Lahkdar-Batna» P : 3.

Iserin Paul, 2001 «Encyclopédie des Plantes Médicinales, Larousse, Paris » 335p.

Références bibliographiques

Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., et Lee S.C, 2004 «Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 3389–3393»

Kahouadji, 1995 «Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de ZAËR (maroc occidental), publié avec l'aide financière du ministère de la communauté française (direction générale de l'enseignement non obligatoire et de la recherche scientifique), LEJEUNIA, revue de botanique, Nouvelle série N° 186, Décembre 2009, BE ISSN 0457-4184» P : 10.

Kaloustian Jacques, Hadji-Minaglou Francis, 2013 «La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, édition Springer Science & Business Media, collection phytothérapie pratique 4 juil. 2013» 226 p.

Lamnaouer Driss, 2002 «Phase III, Etat d'avancement : Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT Programme de l'UICN en Afrique du Nord» P5.

Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein, 2003 «Microbiologie, 2e édition française, Edition De Boeck Supérieur, Bruxelles» 1137p.

Lefief-Delcourt Alix, 2012 «L'ail malin: Les 1001 secrets de cet ingrédient magique pour la santé, la maison et la cuisine, Leduc.s Éditions. France» 160p.

Lemoine Cécile, 2005 «Les fleurs méditerranéennes, Editions Jean-Paul Gissero. France» 32p.

Lewis K, Ausubel FM, 2006 «Prospects for plant derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, 24(12): 1504-1507. »

Li H., Wang X., Li Y., li P. et Wang H., 2009 «Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected china wines. *food chemistry, china*, vol.112» p 454-460.

Linden G., Lorient D. ,1994 «Biochimie Agro-indusrielle. Ed. Masson, Paris. These de Magister, Université El HADJ Lakhdar Batna, Faculté des Sciences, Département de Biologie, option Biochimie appliquée. Thème : Etude de l'activité Biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris L.* et *Laurusnobilis L*» P : 35.

Références bibliographiques

Macheix Jean-Jacques, Annie Fleuriet, Christian Jay-Allemand, 2005 «Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, collection biologique, presses polytechniques et universitaires romandes, Edition PPUR presses polytechniques» 192 p.

Mann CM, Cox SD et Markham JL, 2000 «The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett Appl Microbiol*» 30: 294-297».

Martini Marie-Claude, 2011 «Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie, 3eme édition, Edition Lavoisier. Paris» 500p.

Mathieu Marie-José et Fonteneau Jean-Marie, 2008 «Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie, préparation du BP, formation continue, collection porphyre, Wolters Kluwer France» 1410p.

Metuedjo Amélie, 2003 «Les plantes médicinales en Afrique et en Europe, mémoire de fin d'étude. Diplomarbeit an der Universität des Saarlandes. Abgabe» 149p.

Moulin Anne-Marie, Jeanne Orfila, Jean-François Schémann, Doulaye Sacko, 2006 «Lutte contre le trachome en Afrique subsaharienne, *Trachoma Control in Sub-Saharan Africa*. Edition IRD. Paris» 296p.

Ouédraogo N, Lompo M, Sawadogo RW, Tibiri A, Hay AE, Koudou J et Guisson IP, 2012 «Etude activité anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *pterocarpuserinaceuspoir* (Fabaceae) phytothérapie, 10 (5)» pp286-292.

Oyaizu, 1986 «Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, N° 44: 307-315».

Paolini J, 2005 Thèse du Doctorat, Discipline Chimie organique et Analytique : Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN-13 de *Cistus albidus* et de deux *Asteraceae Endemiques* de corse : *Eupatorium cannabinum* Subp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*. Université de Corse Pascal Paoli, Faculté des sciences et techniques» P : 60.

Références bibliographiques

Paris R.R., Moysse H. 1969 «Matière médicale. Collection de précis de pharmacie. Edition Masson. 2^{ème} édition. Tome II, Paris» p518.

Paris R.R., Moysse H, 1981 «Collection de précis de pharmacie.Matière médicale. Edition Masson. 2^{ème} édition. Tome II, Paris» p518 .

Pharmacopée Caribéenne, 1999 «Pharmacopée Européenne. 1^{er} édition. France» 493 p.

Pharmacopée Européenne, 2004 «Conseil de l'Europe, Strasbourg».

Pivodori Isabelle et Le Heurt Céline, 2011 «Infectiologie et hygiène: cahier des sciences infirmière. U.E. 2.10.Elsevier Masson, France» 168 p.

Prior, R.I., Wu, X.L., Schaich. K,2005 «Standardize methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric Food Chem*, 53 (10): 4290-4302. »

Primrose Sandy, Twyman et OLD, 2004 «Principes de génie génétique, traduction de la 6^e édition anglaise par Lionel Domenjoud et Raymond Cunin, éditions de boeck. Bruxelles» 400p.

Qa'dan F, Petereit F et Nahrstedt A, 2003 «Prodelphinidin trimers and characterization of a proanthocyanidin oligomer from *Cistus albidus*. Pharmazie, Faculty of Pharmacy1, The University of Petra, Amman, Jordan and Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie2, Westf. Wilhelms-Universität, Münster, Germany» P: 416-419.

Radford E.A, Catullo G. et Montmollin B, 2011 «Zones importantes pour les plantes en Méditerranée méridionale et orientale Sites prioritaires pour la conservation, Publié par UICN, Gland, Suisse et Málaga, Espagne ISBN 978-2-8317-1372-4» 88p.

Rameau Jean-Claude ,Dominique Mansion et Dumé G , 2008 «Flore forestière française, guide écologique illustré, 3 Région méditerranéenne, forêt privée française. Paris» 2426 p.

Raven Peter Hamilton, Evert Ray Franklin et Eichhorn Susan E, 2000 «Biologie végétale De Boeck Supérieur, Paris» 944 p.

Rémésy Christian, 2005 «Que mangerons-nous demain ?, Edition Odile Jacob. Paris» 304p.

Références bibliographiques

Ribeiro S.M.R., Barbosa L.C.A., Queiroz J.H., Knodler M. et Schieber A, 2008 «Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. Food Chemistry, Brazil, Vol.110» P: 620-626.

Rizk A.M, 1982 «Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterrapia, 52 (2) 35-42».

Robert Daniel et Catesson Anne-Marie, 2000 «Organisation végétative, biologie végétale Volume 2, Wolters Kluwer .France» 356p.

Rojas A, Hernandez L, Pereda-Miranda, Ret Mata R.1992 «Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants.J. Ethnopharmacol.: 275-283» P:35.

Rouibi A , Chabane D , Saidi F et Azine k, 2012 «Étude comparative de l'activité antispasmodique de l'extrait aqueux d'*Ajuga reptans* L. et de l'ibuprofène chez les souris, Afrique SCIENCE 08(2) (2012) 131 – 137 131 ISSN 1813-548X» P : 131-137.

Roux Danielle et Catier Odile, 2007 «Cahiers du préparateur en pharmacie Botanique, pharmacognosie, phytothérapie, collection porphyre 3^e édition, Wolters Kluwer. France» 141p.

San Andrés M. I, Rafael Jurado Couto et Emilio Ballesteros Moreno, 2000 «Toxicología animal originada por plantas: (flora silvestre española), Editorial Complutense, Madrid» 252 p.

Sarker S.D, Latif Z et Gray A.I, 2005 «Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en science option biologie végétale intitulé. Faculté des sciences département de biologie, Université BADJI MOKHTAR – ANNABA : Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. » P : 70.

Sauvion Nicolas, Calatayud Paul-André, Thiéry Denis, Marion-Poll Frédéric, 2013 «Interactions insectes-plantes, Editions Quae, Editions IRD. France» 784p.

Shahidi F et Naczek M, 2004 «Extraction and analysis of phenolics in food; Journal of Chromatography A 1054; Ed: ELSEVIER. 95-111».

Références bibliographiques

Siddhuraju P et Becker K, 2007 «The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*. 101(1) » P : 10-19.

Singleton P, 2005 «Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies 6^e édition Dunod, Paris» 468p.

Small Ernestet et Catling Paul M. , 2000 «Les cultures médicinales canadiennes. Edition NRC Research Press, Canada» 281p.

Stora D, 2013 «Pharmacologie et thérapeutique, validation des UE 2^e édition LAMARRE. France »240p.

Suty Lydie, 2014 «Les végétaux : Évolution, développement et reproduction, les notions essentielles, 28 schémas pédagogiques, une synthèse par chapitre les mémos de Quœ, Editions Quœ, France» 64p.

Suty Lydie, 2015 «Les végétaux: Les relations avec leur environnement, Editions Quae, France » 56p.

Trease E, Evans WC, 1987 «Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition 61-62. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO, 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pomme). *Journal of Medicine and scintific*. 4(3), 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474».

Wichtl M et Anton R, 2003 «Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2eme Edition Tec Doc, EM INTER, Paris, France»

William G. Hopkins, 2003 «Physiologie végétale, édition de Boeck, Bruxelles» 532p.

Yildirim A., Mavi A., Kara A.A., 2001 «Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4083- 4089».

Zerioul Jawhara, 2011 «Mémoire pour l'obtention du diplôme master en biotechnologie microbienne, Evaluation de l'effet antimycobactérien des extraits de plantes d'origine Marocaine, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et techniques de Fés» P :72.

Annexe I

Annexe I

Appareillage et petit matériel :

1. Appareillage :

- Moulin électrique (Moulinex).
- Bain-marie (Mo.Acq.251).
- Etuve (MoAcq.023).
- Hotte (Mo.Acq.085).



Figure 10. Balance



Figure 11. Appareil HPLC (Schimadzu logiciel Class VP version 5.3.)



Figure 12. Voltrex



Figure 13. Plaque chauffante



Figure 14: Spectrophotomètre

2. Petit matériel :

- Coton, gaz, gants, étiquettes.
- Seringue à gavage.
- Papier filtre.
- Entonnoir.
- Boite de Pétri.

3. Verrerie :

- Erlen Mayer.
- Pipette Pasteur.
- Fiole conique.
- Eprouvette.
- Becher.
- Tube à essai.

4. Réactifs:

- Ethanol (C_2H_5OH).
- Méthanol
- Acide chlorhydrique(HCl).
- Ether ($C_4H_{10}O$).
- Chlorure ferrique ($Fe Cl_3$).
- Acide acétique glacial
- Acide sulfurique (H_2SO_4).
- $Na OH$

- NH_4OH
- NaCl

- **Réactif amidon** préparé ainsi :

On a dissout 1,2g d'iode dans 50ml d'eau distillée contenant 2,5g d'iodure de potassium puis on chauffe le mélange pendant 5mn puis on dilue à 500ml avec l'eau distillée.

- **Réactif de Dragendorff** , ce réactif est composé de deux solutions :

Solution A : 2 g de subnitrate de bismuth, 25 ml d'acide acétique glacial et 100ml d'eau distillée.

Solution B : 40 g d'iodure de potassium et 100 ml d'eau.

Le réactif est préparé en mélangeant 10 ml des solutions A et B à 20ml d'acide acétique glacial et 100ml d'eau distillée.

- **Composition du milieu Mueller-Hinton**

Extrait de viande de boeuf	2.0g.
Peptone de caséine.....	17.5g.
Amidon de maïs.....	1.5g.
Agar.....	17.0g.
pH.....	7.4.

- **Composition du milieu Sabouraud**

Peptone.....	10,0 g.
Glucose massé.....	20,0 g.
Agar.....	15,0 g.
pH.....	6,0.

- **Composition du milieu gélose nutritive**

Extrait de viande.....	1,0g/l
Extrait de levure.....	2.5g/l
Peptone.....	5,0g/l
Chlorure de sodium.....	.5,0g/l
Agar.....	15,0g/l
pH	7,0

- **Rappel statistique**

Calculer les moyennes et les écarts types de chacune des séries :

$$\text{Ecart-type} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \text{moyenne})^2}{n-1}}$$

$$\text{Moyenne} = \frac{1}{N} \sum x_i$$

Annexe II

Annexe II

Résultats du test antioxydant

Tableau VI: Résultats du pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de *Cistu salbidus* vis-à-vis l'acide ascorbique par la méthode de ferricyannure.

Concentration (mg/ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Absorbance (nm) de l'Acide ascorbique	0	0,9800	1,8992	3,0700	3,4230	3,5600
% d'inhibition de l'acide ascorbique	100	76,86	55,15	27,51	19,10	15,49
Absorbance (nm) de l'extrait aqueux	0	0,2582	0,5300	0,9700	0,9804	1,5292
I (%) d'inhibition de l'extrait aqueux	100	82.61	82.98	83.85	83.15	86.53
Absorbance (nm) de l'extrait éthanolique	0	0,6740	1,7458	1,1761	2,5850	2,6660
I(%) de l'extrait éthanolique	0	92.63	98.11	85.43	94.22	94.03

Tableau VII: Résultats du pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de *Cistus albidus* vis-à-vis l'acide ascorbique par la méthode Molybdate Phosphate.

Concentration (mg/ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Absorbance (nm) de l'acide ascorbique	0	0,5164	0,9530	1,5826	2,3958	2,6445
% d'inhibition de l'acide ascorbique	100	84.14	70.73	51.40	26.42	18.78
Absorbance (nm) de l'extrait aqueux	0	0,2427	0,3958	0,5489	0,7314	0,8028
% d'inhibition de l'extrait aqueux	100	83.72	82.04	79.74	78.66	78.61
Absorbance (nm) de l'extrait éthanolique	0	0,1595	0,1934	0,2150	0,3346	0,3435
% d'inhibition de l'extrait éthanolique	100	78.77	75.52	73.46	73.57	73.27

Résultats de l'activité antimicrobienne



Figure 15 : Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles de *Cistus albidus*.

Résultats de l'activité antispasmodique

Tableau VIII: Résultats du test de l'activité antispasmodique de l'extrait aqueux des feuilles de *Cistus albidus*.

Traitement	Dose	Nbr des spasmes	% de protection
Témoin négatif (eau distillée)	0,5ml	25,2±5,85	/
Témoin positive (Phloroglucinol®)	25 mg/ml	4±1,2	84,12
Extrait aqueux	2.27g/kg	5,4±1,28	78,57
Extrait aqueux	2.72g/kg	5±0,8	80,15

Résultat de l'étude statistique de l'activité antispasmodique par logiciel ANOVA

Tukey HSD test; variable SPASMES (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 16,055, df = 16,000					
	TRAITEMENT	{1} - 25,200	{2} - 3,7500	{3} - 5,3333	{4} - 5,0000
1	T		0,000186	0,000186	0,000186
2	R	0,000186		0,926792	0,965679
3	E 1	0,000186	0,926792		0,999091
4	E 2	0,000186	0,965679	0,999091	

En rouge : Différence Très Hautement Significative (P<0.001)

En noir : Différence non significative

Tukey HSD test; variable SPASMES (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 16,055, df = 16,000				
	TRAITEMENT	SPASMES - Mean	1	2
2	R	3,75000	****	
4	E 2	5,00000	****	
3	E 1	5,33333	****	
1	T	25,20000		****

Annexe III

Annexe III



Figure 16 : Injection de l'acide acétique



Figure 17 : Souris au moment du spasme



Figure 18 : Gavage des souris



Figure 19 : Aspect général de *Cistus albidus* (Originale 2015).



Figure 20 : Feuilles de *Cistus albidus* (Originale 2015).

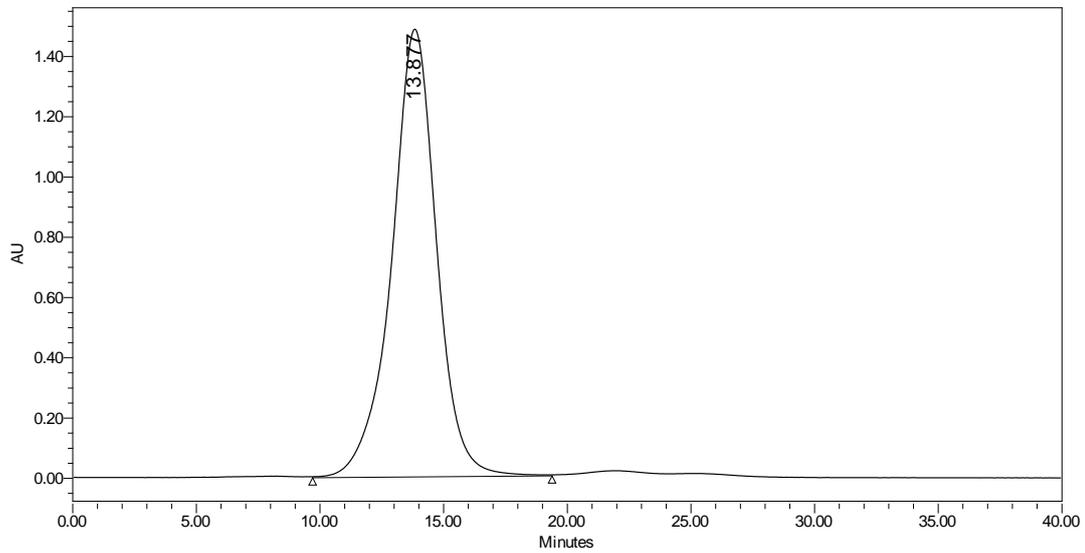
Annexe IV

Annexe IV



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	73	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 01 365
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 365nm
Date Acquired:	7/20/2015 3:37:49 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 10:01:02 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	13.877	185393106	100.00	1482273

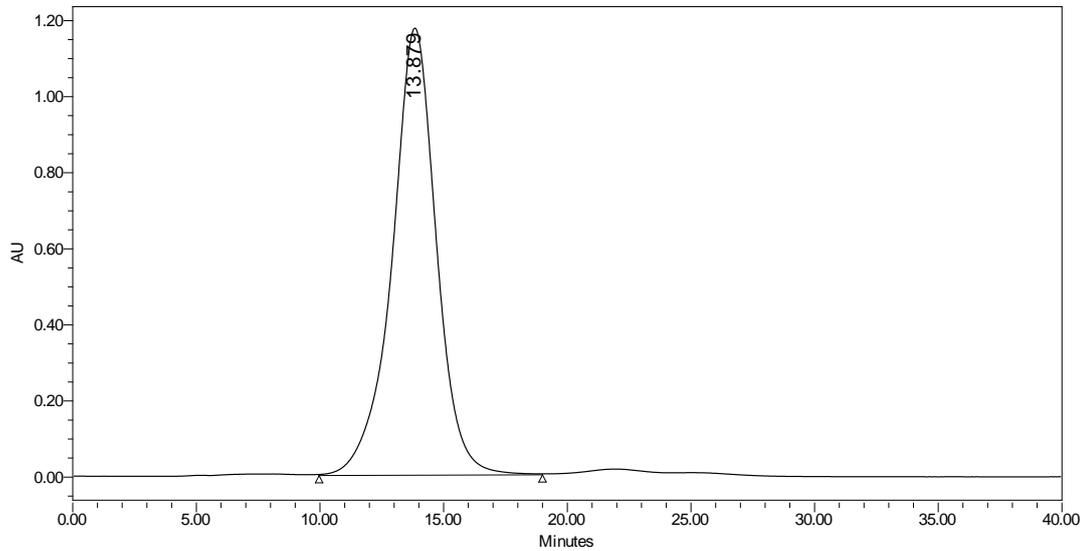
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed:
 7/26/2015
 10:02:05 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	73	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 01 365
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 3:37:49 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 10:00:38 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	13.879	144875960	100.00	1172695

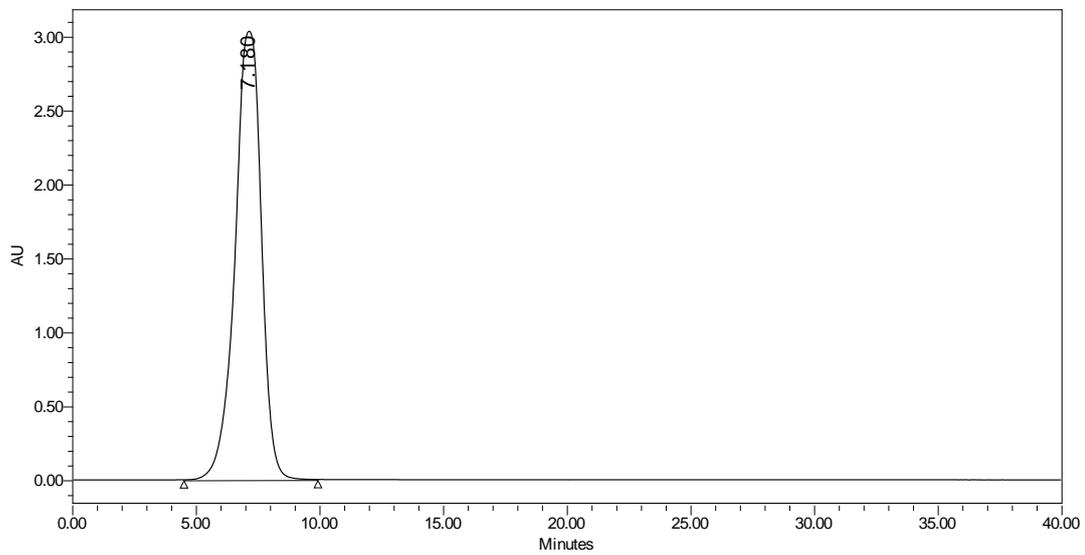
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:02:19 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 2	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	74	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 02 265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 4:18:33 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 10:00:16 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	7.180	223880792	100.00	3031566

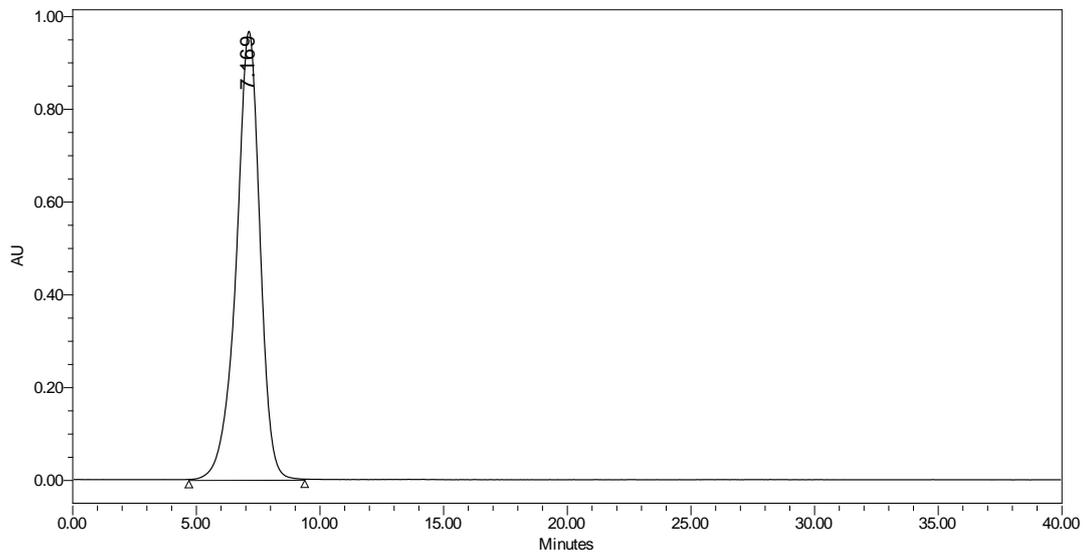
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:02:29 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 2	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	74	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 02 365
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 365nm
Date Acquired:	7/20/2015 4:18:33 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 10:00:02 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	7.169	64080346	100.00	965649

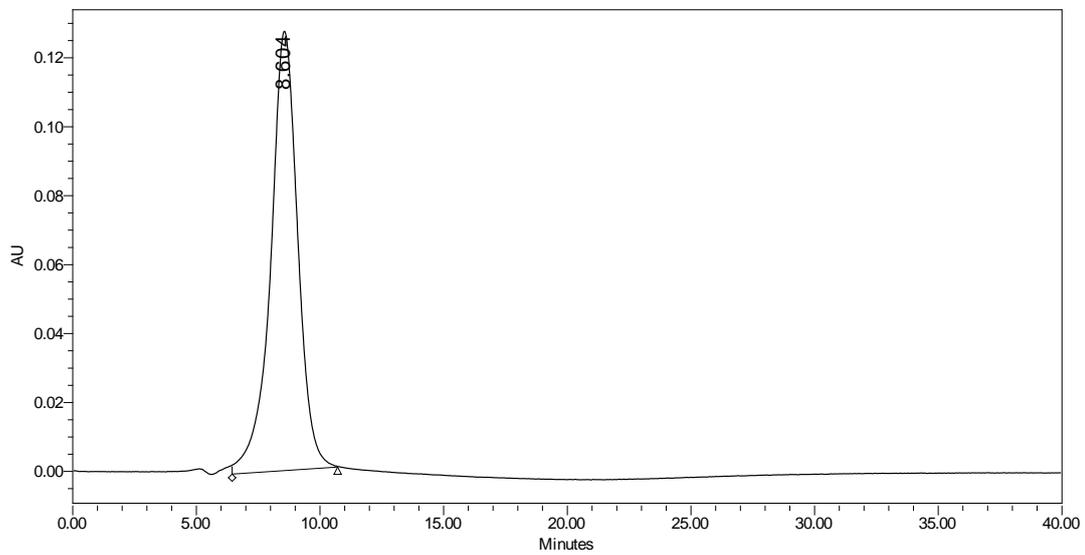
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed:
 7/26/2015
 10:02:37 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 3	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	75	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 03 265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 4:59:17 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:59:40 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	8.604	9637849	100.00	127140

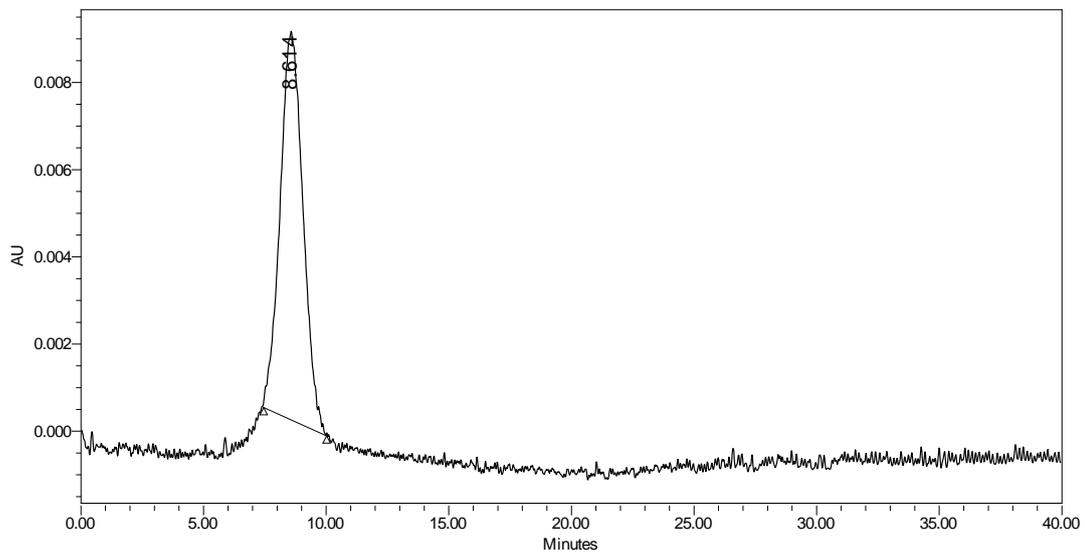
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed:
 7/26/2015
 10:02:46 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 3	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	75	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 03 265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 365nm
Date Acquired:	7/20/2015 4:59:17 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:59:12 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	8.614	576019	100.00	8902

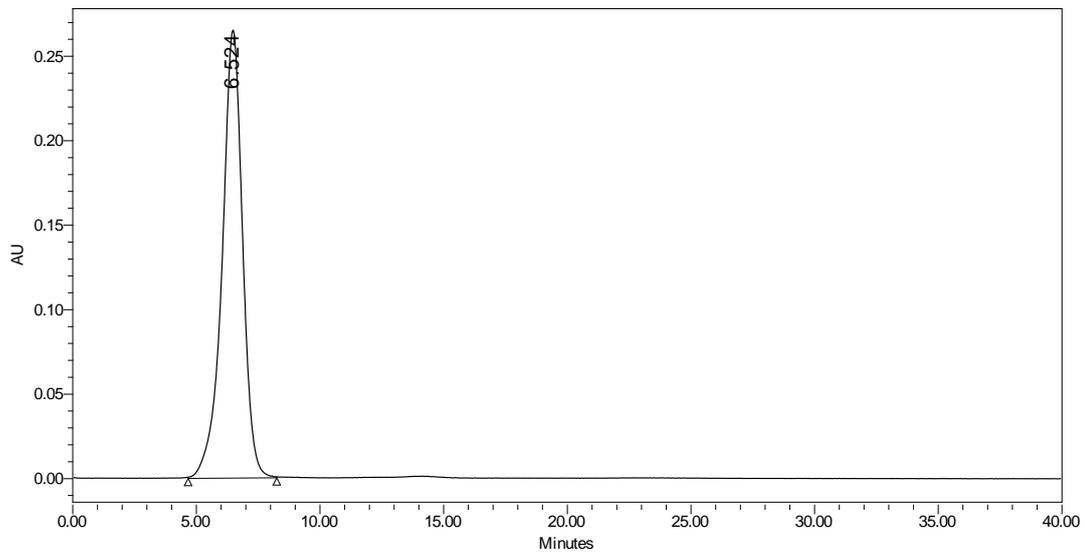
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed:
 7/26/2015
 10:02:55 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 4	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	76	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 04 365
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 5:40:02 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:58:44 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	6.524	15103256	100.00	264600

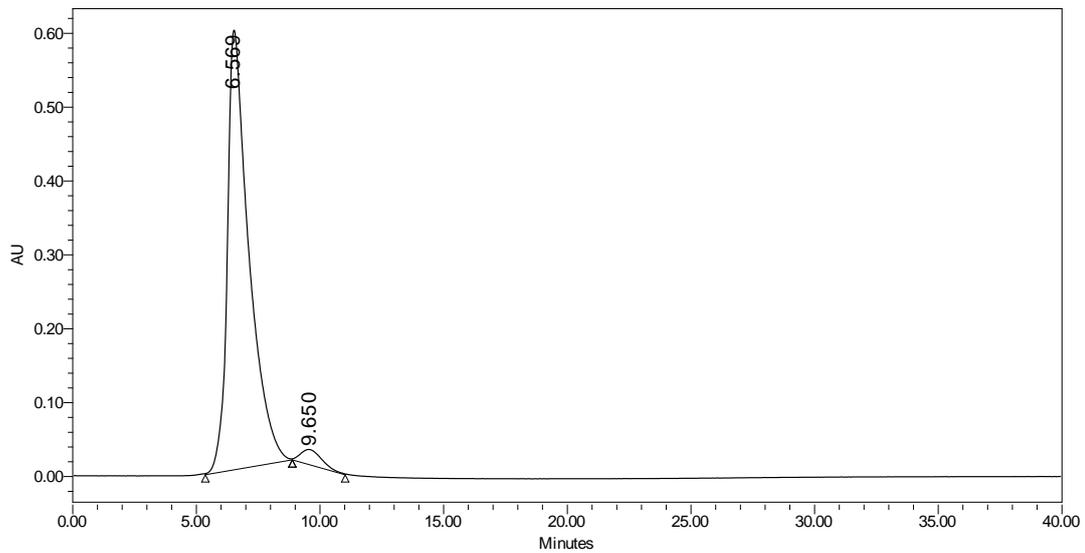
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:03:03 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 5	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	77	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 05 265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 6:20:46 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:58:27 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	6.569	35806415	97.00	593558
2	9.650	1105646	3.00	19646

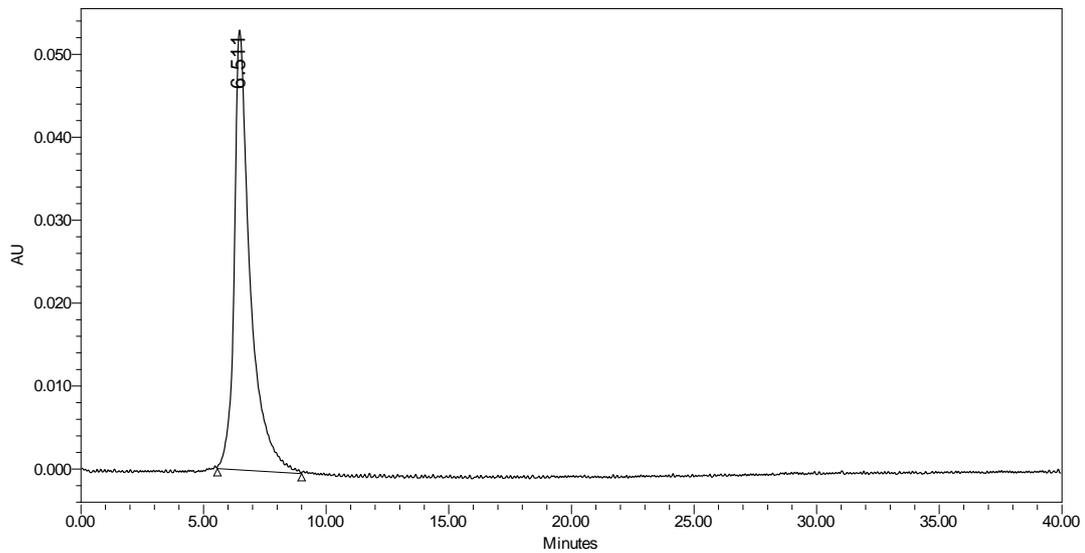
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:03:15 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 5	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	77	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 05 365
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 365nm
Date Acquired:	7/20/2015 6:20:46 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:57:48 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	6.511	2370222	100.00	52913

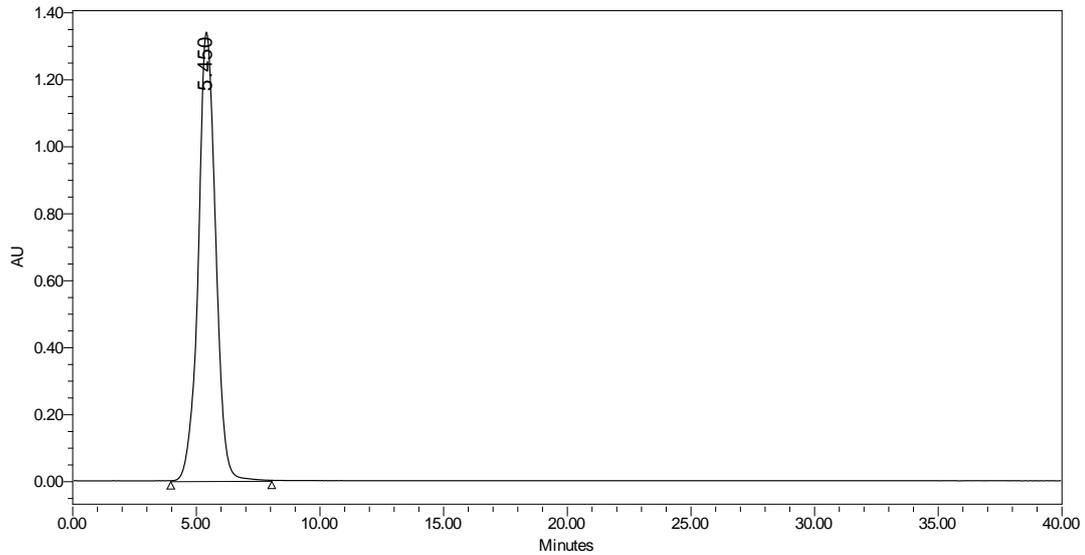
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:03:31 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 6	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	78	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 06 265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 7:01:30 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:57:27 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	5.450	65183747	100.00	1339086

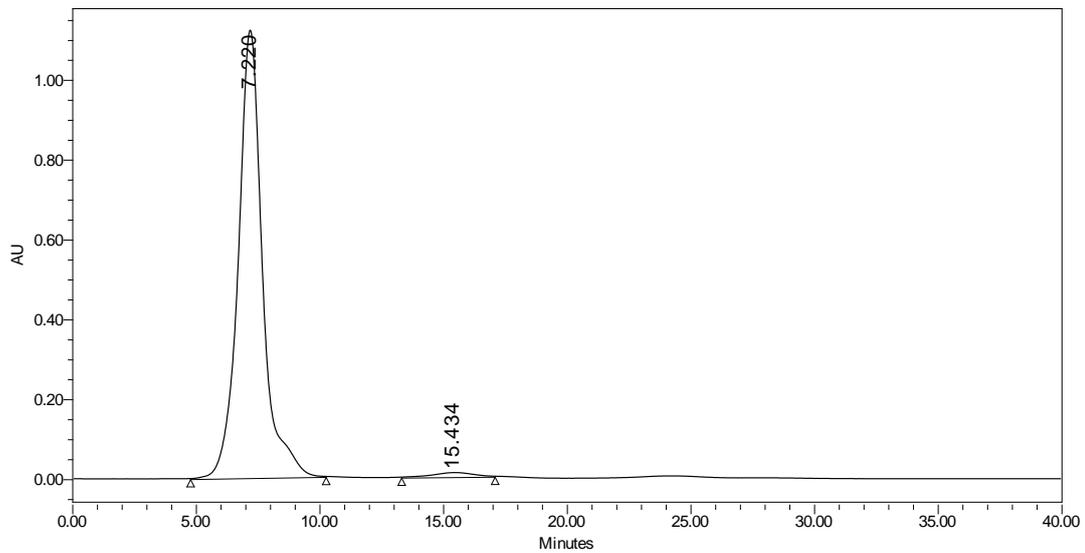
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed:
 7/26/2015
 10:03:41 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 7	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	79	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 07 265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 7:42:13 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:57:06 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	7.220	75900139	98.65	1120556
2	15.434	1041315	1.35	10126

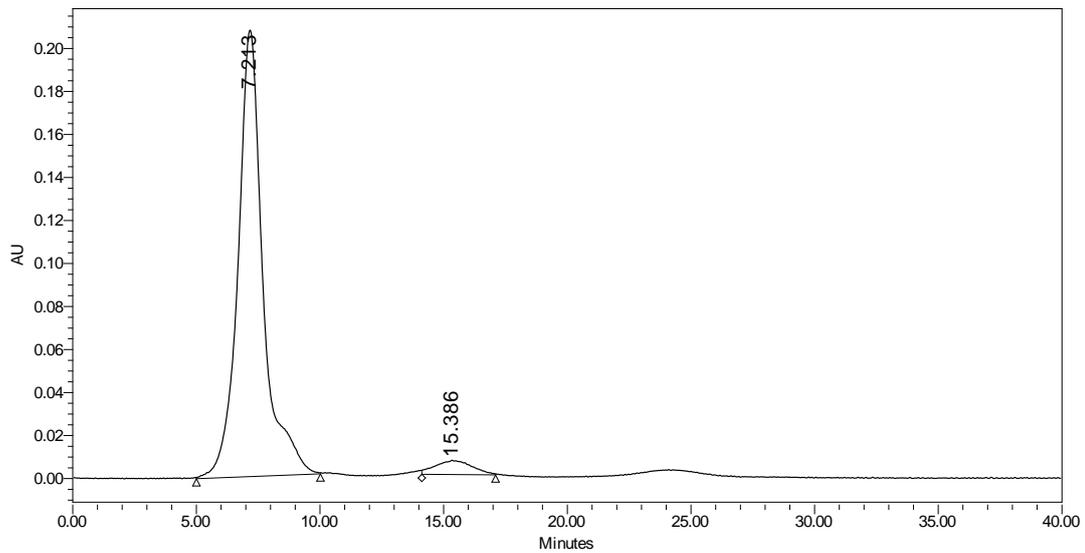
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:03:52 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 7	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	79	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 07 365
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 365nm
Date Acquired:	7/20/2015 7:42:13 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:56:44 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	7.213	14411989	96.01	207113
2	15.386	599027	3.99	6191

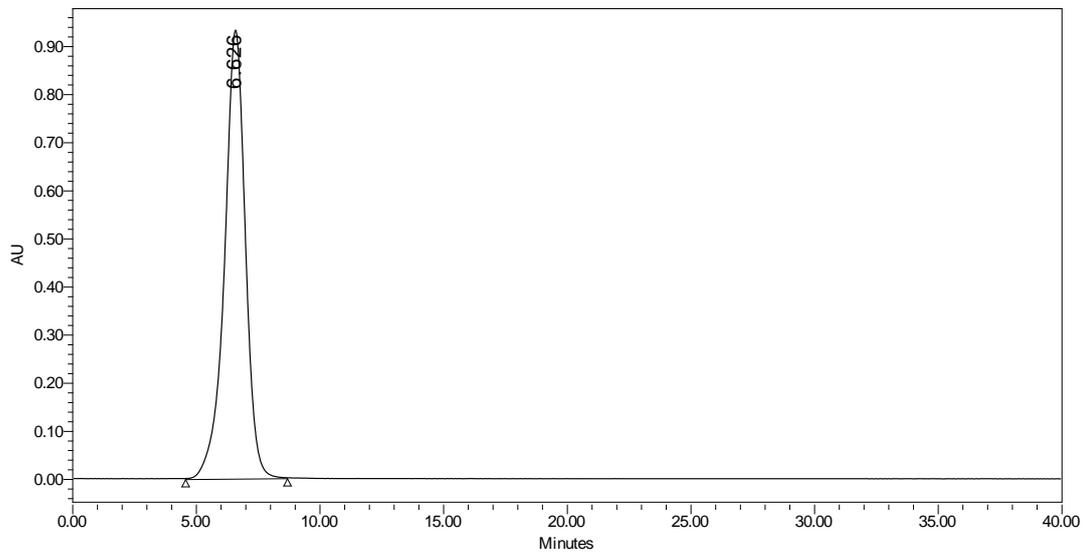
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:04:03 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 8	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	80	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 08 265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 8:22:57 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:56:13 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	6.626	54326478	100.00	931563

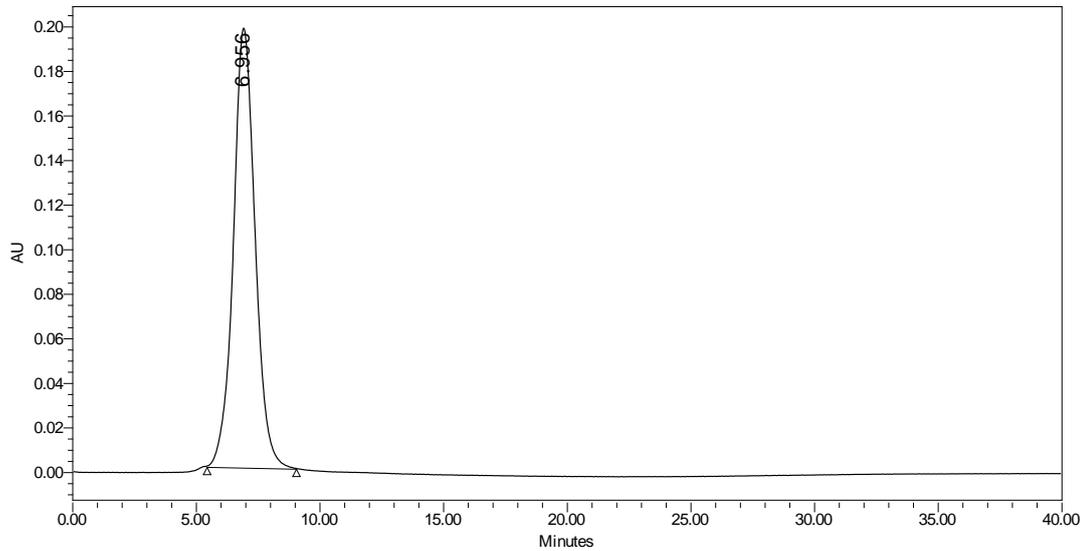
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:04:12 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 9	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	81	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 09 265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 9:03:39 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:55:56 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	6.956	12003831	100.00	197032

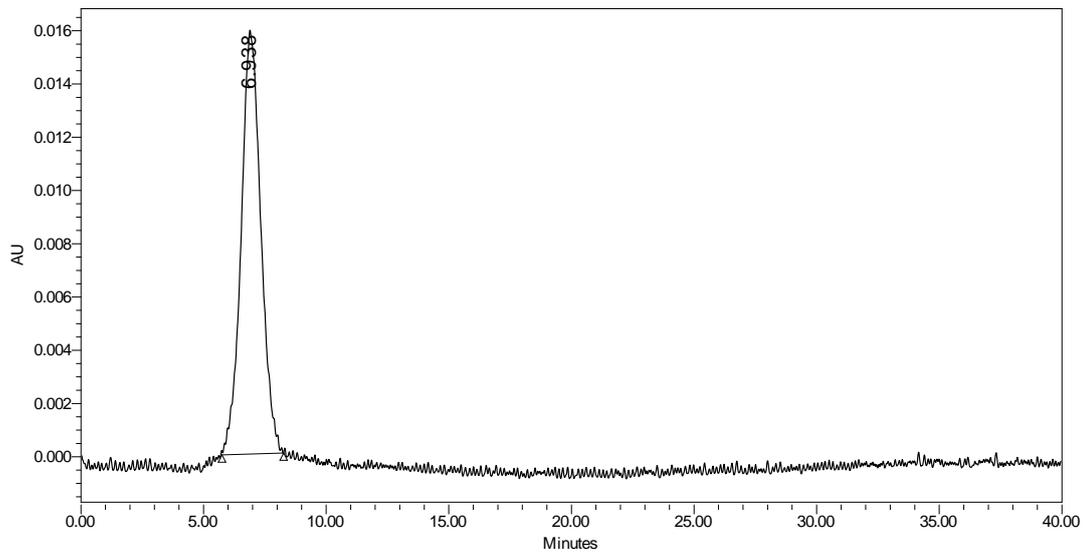
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:04:22 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Etalon 9	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	81	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	1	Processing Method:	ET 09 365
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 365nm
Date Acquired:	7/20/2015 9:03:39 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:55:25 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	6.938	881285	100.00	15876

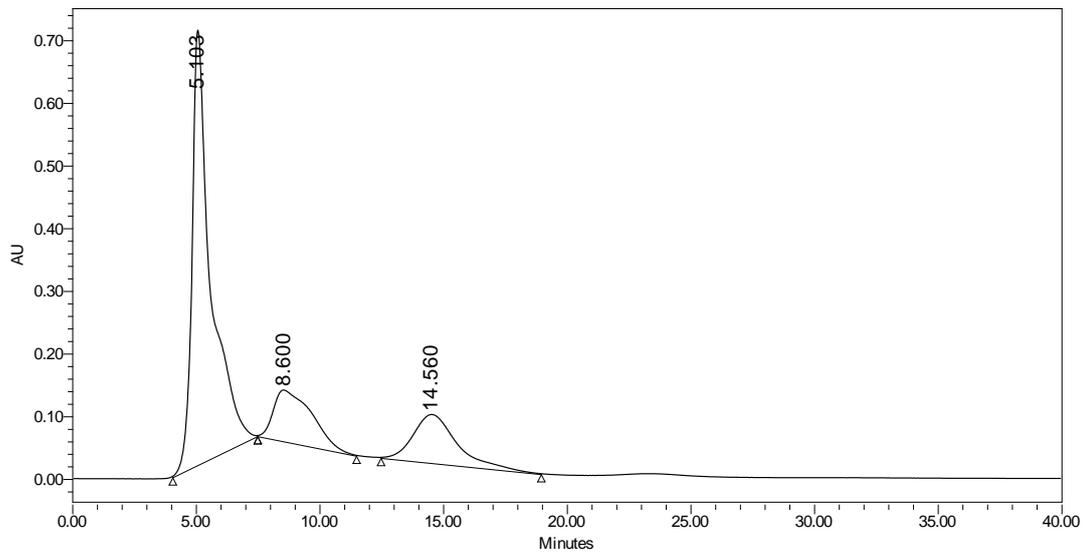
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:04:36 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Extrait	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	82	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	2	Processing Method:	EX265
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 265nm
Date Acquired:	7/20/2015 10:25:07 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:54:19 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	5.103	36339526	66.67	692549
2	8.600	8877009	16.29	81251
3	14.560	9290564	17.04	76757

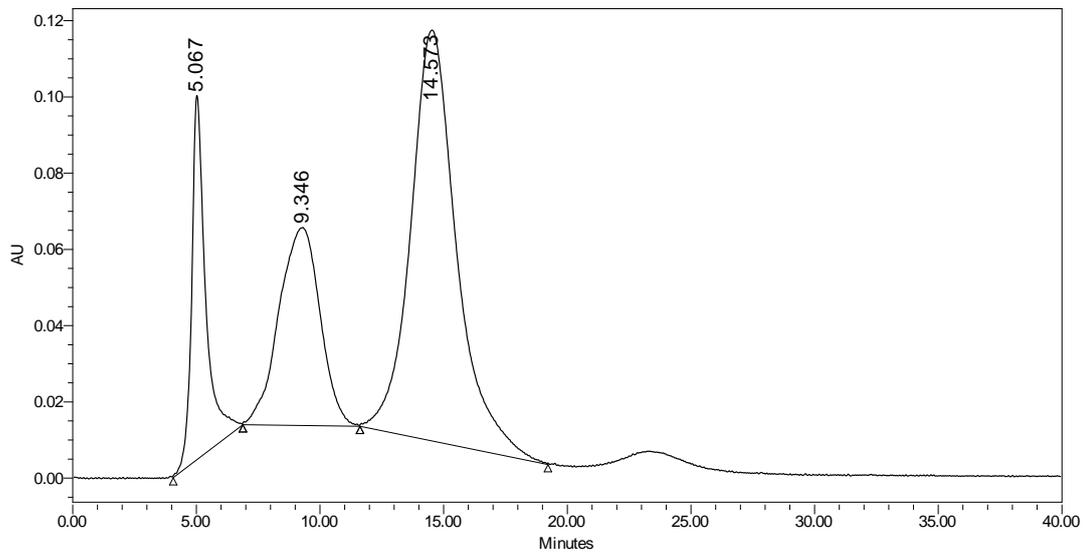
Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:04:54 AM Africa/Algiers



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Extrait	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Ex Mss
Vial:	82	Acq. Method Set:	Ex MI
Injection #:	2	Processing Method:	EX365
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 365nm
Date Acquired:	7/20/2015 10:25:07 PM CET		
Date Processed:	7/26/2015 9:53:22 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	5.067	3672388	15.70	95055
2	9.346	5932153	25.36	51710
3	14.573	13784074	58.93	107565

Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1134

Project Name: AZIMYCINE\200715
 Date Printed: 7/26/2015
 10:05:03 AM Africa/Algiers