

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de BLIDA1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de fin d'Etude
En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Sciences de la Nature et de la Vie
Option : Phytothérapie et Santé

Thème

**Etude phytochimique et évaluation des quelques activités
biologiques de *Cistus monspeliensis* L.**

Présenté par :
Korchi Ilhem
Djaadi Nassima

Soutenue le: 28/09/2016

Devant le jury composé de :

Mme TAKARLI. S	M.A.A	UB1	Présidente
Mme FAIDI. H	M.A.A	UB1	Examinatrice
Mme BRADEA. M.S	M.C.A	UB1	Promotrice
Mme BOUBKEUR. S	Chef Département	CRD-El Harrach	Co-promotrice

2015-2016

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 Mme **BRADEA. M.S** Maître Conférence 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.*

*Ma co-promotrice Mme **BOUBKEUR. S** Chef département de chimie analytique de CRD-EL Harrach qui bien voulu de nous encadrer et nous encadrer et nous accueillir dans ce laboratoire et dans son équipe pendant ce projet.*

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent aux membres de jury :
La présidente Mme **TAKARLI. S** Maître Assistante A au département de Biologie des Populations et Organismes à l'université Blida 1, qui nous a fait l'honneur de présider ce travail.*

*L'examinatrice Mme **FAIDI. H** Maître Assistante A au département de Biologie des Populations et Organismes à l'université Blida 1.*

Mes remerciements vont également à tous mes enseignants, pour ses informations et ses aides.

Sans oublier de remercier tout le personnel de CRD d'el Harrach.

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

Dédicaces

A ma mère, mon Deuxième

Souffle, qui m'a mis au monde, veillé sur moi, et qui a su me transmettre ses valeurs et son chaleureux amour, durant toutes ces années qui m'a encouragé et qui a veillé à ce que je réussisse à mes études,, qui m'a permis de donner le meilleur de moi-même et me surpasser. Je t'aime aujourd'hui plus qu'hier mais bien moins que demain. Que Dieu te Garde pour nous ;

A mon très agréable père, qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est, toujours donné du mal pour assurer mon bien être. J'espère que je suis à la hauteur de ce qu'il attend de moi. Je t'aime papa ;

A mes frères, Mourad et moussa

A ma chère sœur, Fahima

A mon oncle Rachid ;

A mes oncles et mes tantes ;

A mes cousins et mes cousines ;

Et à tous les membres de Ma famille

A mes amies et mes collègues ; A tous les personnes, qui m'ont encouragé, aidé, conseillé et orienté de près ou de loin.

Ilhem

Dédicaces

Je dédie tout particulièrement ce modeste travail à l'être le plus cher à mon cœur ma mère symbole de sacrifice pour son soutien morale et assistance inestimable pendant toute mes longues années d'études et pour tout l'amour qu'elle ma donnée pour tout ça Merci maman et que dieu te garde pour moi.

A mes amis(es) et à tous ceux qui me sont chers ;

A moi, je dédie ce travail.

Nassima

Liste des abréviations

APG III: The Angiosperm Phylogeny Group III.

ATCC: American Type Culture Collection.

CRD: Centre de recherche et de Développement.

EAG: Equivalent acide gallique

EA: Equivalent acide tannique.

EQ: Equivalent en Quercétine.

NMRI: Naval Medical Research Institute.

ONAB: Office National de l'Alimentation du Bétail.

Liste des tableaux

Tableau I : Classification scientifique de <i>Cistus monspeliensis</i> L.....	4
TableauII : Principales classes de composés phénoliques.....	9
Tableau III: Caractérisation de souches microbiennes utilisées.....	18
Tableau IV : Diamètres des zones d'inhibition selon le degré de sensibilité.....	30
Tableau V: Résultats du screening phytochimique.....	35
Tableau VI: Les résultats du test limite de toxicité aigüe de l'extrait aqueux.....	39
Tableau VII: Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches microbienne testés vis-à-vis des deux extraits (aqueux et methanolique) des feuilles de <i>Cistus monspeliensis</i> L.....	43
Tableau VIII : Appareillages, Verreries et Réactifs.....	Annexe I
Tableau IX: les résultats de l'activité antimicrobienne.....	Annexe III

Liste des figures

Figure N°1 : La plante de <i>Cistus monspeliensis</i> L.....	5
Figure 2: Les feuilles de <i>Cistus monspeliensis</i> L.....	5
Figure 3: Les fleurs de <i>Cistus monspeliensis</i> L.....	6
Figure 5: Structure Générale des flavonoïdes.....	11
Figure 6: Structures des squelettes de base des flavonoïdes.....	12
Figure 7: Structure chimique des acides gallique et ellagique.....	14
Figure 7: Les feuilles de <i>Cistus monspeliensis</i> L. séchées.....	17
Figure 8: Souris mâles et femelles Albinos.....	17
Figure 9: protocole d'extraction.....	20
Figure 10: préparation de l'extrait aqueux.....	21
Figure 11: Principe de la méthode de diffusion par disque.....	29
Figure 12: Coupe transversale de tige de <i>Cistus monspeliensis</i> L. vue au microscope photonique au grossissement $\times 40$	31
Figure 13: Coupe transversale au niveau de la feuille de <i>Cistus monspeliensis</i> L. vue au microscope photonique au grossissement $40\times$	33
Figure 14: Coupe transversale au niveau de la feuille de <i>Cistus monspeliensis</i> L. vue au microscope photonique au grossissement $100\times$	33
Figure 15: Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	36
Figure 16: Courbe d'étalonnage de quercitine.....	41
Figure 17: Courbe d'étalonnage d'acide tannique.....	42
Figure 18: Pourcentage d'augmentation de l'œdème de la patte arrière gauche en fonction de temps.....	40
Figure 19: Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte arrière gauche.....	41
Figure 21 : Etuve.....	Annexe I
Figure 22 : Plaque chauffante.....	Annexe I

Figure 23 : Rota vapeur.....	Annexe I
Figure 24 : Pieds à coulis.....	Annexe I
Figure 25 : Spectrophotométrie.....	Annexe I
Figure 26 : Gamme acide gallique.....	Annexe II
Figure 27 : Gamme quercitine.....	Annexe II
Figure 28 : Injection de carragénine.....	Annexe IV
Figure 29 : Gavage de l'extrait aqueux.....	Annexe IV
Figure 30 : Mesure de l'épaisseur de l'œdème par pied à coulis.....	Annexe IV

Résumé :

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Cistus monspeliensis* L. Cette plante appartient à la famille des cistacées, elle est très commune en régions méditerranéennes.

Deux extraits ont été réalisés sur les feuilles de notre plante, le premier c'est un extrait méthanolique qui est obtenu à partir d'une macération dans le méthanol. Le rendement était 21.4%. Mais le deuxième c'est un extrait aqueux qui est obtenu à partir d'une infusion pendant 30min.

Les résultats de test phytochimique réalisés ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires, parmi lesquels les leuco-anthocyanes, les tannins, les tannins galliques, quinones combiné, saponosides, coummarines, flavonoïdes et les composés réducteurs.

Les teneurs des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins hydrolysables de l'extrait méthanolique est de 3.616 mg équivalent l'acide gallique/g de matière fraîche, 0.2084 mg équivalent la quercitine /g de matière fraîche et 0.6728 mg équivalent l'acide tannique/g de matière fraîche respectivement.

Les résultats du test de l'activité anti-inflammatoire sur les souris *albinos* ont révélé que l'extrait aqueux des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. à dose 2 g/kg présente un pourcentage de diminution de l'œdème de 48.03%.

L'extrait aqueux et l'extrait méthanolique des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. sont dotés d'un pouvoir antimicrobien contre certaines souches testées tel que *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, par contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* résistent aux deux extraits et *Bacillus subtilis* présente seulement une résistance vis-à-vis de l'extrait aqueux.

Mots clés : *Cistus monspeliensis*, polyphénols, activité anti-inflammatoire, activité antimicrobienne.

ABSTRACT

Our study was performed on the leaves of *Cistus monspeliensis* L. This plant belongs to the family Cistaceae, it is very common in the Mediterranean region.

Both results were achieved on the leaves of our plant, the first is a methanolic extract obtained from maceration. The yield was 21.4%. But the second is an aqueous extract which is from an infusion for 30 minutes.

Phytochemical test results achieved helped to highlight the presence of several secondary metabolites, including the buffy anthocyanins, tannins, gallic tannins, quinones handset, saponins, coummarines, flavonoids and reducing compounds.

The contents of total polyphenols, flavonoids and hydrolysable tannins of methanolic extract is 3.616 mg equivalent gallic acid/g of fresh material, 0.2084 mg equivalent quercetin /g of fresh matriel and 0.6728 mg equivalent tannic acid/g of fresh matriel respectively.

The test results of the anti-inflammatory activity on albino mice revealed that the aqueous extract of the leaves of *Cistus monspeliensis* L. dose 2 g / kg has an average percent decrease of the edema.

The aqueous extract and the methanol extract of the leaves of *Cistus monspeliensis* L. are provided with a antimicrobial potency against some test strains such as *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* where as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* resist to the two extracts and *Bacillus subtilis* represent only one vis-a-vis the resistance of the aqueous extract.

Keywords: *Cistus monspeliensis*, polyphenols, anti-inflammatory, antimicrobial activity.

الملخص

دراستنا أجريت على أوراق *Cistus monspeliensis*. هذا النبات ينتمي إلى عائلة Cistacées وهو جد شائع في منطقة البحر الأبيض المتوسط.

أجرينا مستخلصين على أوراق نبتتنا، الأولى عبارة عن مستخلص ميثانولي تحصلنا عليه عن طريق النقع. وكان مردوده 21.4%. لكن الثاني هو عبارة عن مستخلص مائي تحصلنا عليه عن طريق النقع في الماء المغلي لمدة 30 دقيقة.

كشفت نتائج الفحوصات الكيميائية لأوراق نبات *Cistus monspeliensis* على وجود العديد من المركبات الثانوية، بما في ذلك leuco-anthocyanes، Tannins hydrolysables، coumarine، Tannins، quinones، composés réducteurs، flavonoïdes، combinés، saponosides.

تحتوي أوراق *Cistus* على 3.616 ملغ من إجمالي البوليفينول مكافئ حمض الغاليك/غ مادة طازجة و0.2084 مع من الفلافونويدات مكافئ الكرسيتين/غ مادة طازجة و0.6728 من التانات المذابة مكافئ حمض التانيك/غ مادة طازجة.

وكشفت نتائج اختبار النشاط المضادة للالتهابات على الفئران البيضاء أن المستخلص المائي لأوراق *Cistus* بجرعة 2 غرام / كغ لديه تأثير بنسبة 48.03%.

المستخلص المائي و المستخلص الميثانولي لديه ميزة مضادة للميكروبات المختبرة مثل *Staphylococcus aeruginosa* لديها مقاومة للمستخلصين بينما *Bacillus subtilis* لديها مقاومة ضد المستخلص المائي فقط. *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans, aureus* لكن كل من *Escherichia coli* و *Pseudomonas*

كلمات المفتاح: *Cistus monspeliensis*، بوليفينول، المضادة للالتهابات والنشاط المضادة للميكروبات.

Table de matière

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Etude Bibliographique

I.1. Généralité sur la plante.....3

I.1.1.Présentation générale.....3

I.1.2.Classification.....4

I.1.3.Etymologie.....4

I.1.4. Caractéristiques morphologiques.....4

I.1.5. Noms vernaculaires.....6

I.1.6. Répartition géographique et écologie de la plante.....6

I.1.7. Compositions chimiques de la plante.....7

I.1.8. Utilisation et propriétés biologiques de *Cistus L*.....7

I.2.Les métabolites secondaires.....8

I.2.1.polyphénols.....8

I.2.1.1.Présentation générale des polyphénols.....8

I.2.1.2.La biosynthèse des polyphénols.....8

I.2.1.3.Les principes classes des polyphénols.....9

I.2.1.3.Le rôle et l'intérêt des composés phénoliques.....10

I.2.2.Les flavonoïdes.....10

I.2.2.1.Présentation générale des flavonoïdes.....10

I.2.2.2.Structure chimique et classification.....11

I.2.2.3.Localisation et distribution.....12

I.2.2.4.Propriétés biologiques.....13

I.2.3.Les tanins.....13

I.2.3.1.Présentation générale.....	13
I.2.3.2.Types des tanins et leurs structures.....	14
I.2.3.3.Utilisation des tanins.....	14

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1.Matériel

II.1.1. Matériels biologiques.....	16
II.1.1.1. Matériel végétal.....	16
II.1.1.2.Matériel animal.....	17
II.1.1.3.Microorganismes	17
II.1.2.Matériels non biologiques.....	18
II.2.Méthodes d'étude.....	18
II.2.1. Etude microscopique (histo-anatomique).....	18
II.2.2.Extraction des principes actifs.....	19
II.2.3.Méthode de screening phytochimique préliminaire.....	21
II.2.4.Dosage quantitatif par les réactions colorimétriques.....	24
II.2.4.1.Dosage quantitatif des polyphénols totaux.....	24
II.2.4.1.Dosage quantification des flavonoïdes.....	25
II.2.4.2.Dosage quantitatif des tanins hydrolysables.....	25
II.2.5. Les activités biologiques.....	25
II.2.5.1.Etude de la toxicité aigüe de l'extrait brut aqueux.....	25
II.2.5.2.Etude de l'activité anti-inflammatoire	27
II.2.5.3.Etude de l'activité antimicrobienne	28

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1.Etude histo-anatomique.....	31
III.2.Rendement.....	34
III.3.Résultat de screening phytochimique.....	35

III.4.Dosage quantitatif par les réactions colorimétriques.....	36
III.4.1.Dosage quantitatif des polyphénols.....	36
III.4.2.Dosage quantitatif des flavonoïdes.....	37
III.4.3.Dosage quantitatif des tanins hydrolysables.....	38
III.5.Etude des activités biologiques.....	38
III.5.1.Etude de la toxicité aigüe de l'extrait brut aqueux.....	38
III.5.2.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	39
III.5.3.Evaluation de l'activité antimicrobienne	43
Conclusion.....	46

Référence bibliographique

Annexes

Introduction

Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'homme utilise les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies (**Sanago, 2006**). En effet, l'origine de nos médicaments actuels se confond avec l'origine de la connaissance des « plantes-médicaments », c'est-à-dire avec l'origine de la phytothérapie. Cette dernière est basée, encore actuellement, sur la connaissance empirique, ancestrale, sur l'usage traditionnel, transmis oralement au cours des siècles et des millénaires. Peu à peu, le nombre des plantes utilisées s'est accru et leur mode d'emploi a été constamment perfectionné, grâce aux progrès réalisés par l'expérience et l'intelligence humaine (**Girre, 2006**).

Certainement 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**). Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

A ce sujet, de nombreuses études ont mis en évidence la présence des métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicaux, en particulier les flavonoïdes et les proanthocyanidines (**Bahorun, 1997**).

Dotée d'un couvert végétal riche et hétérogène, l'Algérie recèle une flore diversifiée en plantes médicinales dont le genre *Cistus* qui est fréquemment utilisé en médecine traditionnelle.

En effet, toutes les espèces de genre de *Cistus*, notamment en Espagne, en Italie, en Grèce et en Turquie, sont utilisées dans la médecine traditionnelle. Ceci, comme traitement pour lutter contre les diarrhées et les ulcères peptiques et même comme remèdes généraux pour plusieurs maladies (**Attaguile et al., 2004**).

Introduction

Par ailleurs, le genre *Cistus* englobe de nombreuses espèces dont le *Cistus monspeliensis*.L qui fait l'objet de la présente étude.

Plusieurs études ont confirmé l'efficacité de Ciste de Montpellier par contre en Algérie cette plante est délaissée. Pour cela nous avons choisi cette espèce.

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

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

- ❖ Etude microscopique pour l'identification de la plante.
- ❖ Une extraction methanolique par la macération des feuilles de la plante étudiée et une extraction par l'infusion.
- ❖ Une étude phytochimique qui consiste à un screening chimique de l'extrait aqueux de la plante étudiée.
- ❖ Un dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins hydrolysables.
- ❖ Une étude biologique permettant d'évaluer quelques activités biologiques telles que l'effet antimicrobien, anti-inflammatoire avec un test de toxicité de la plante.

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1. Généralité sur la plante:

I.1.1. Présentation générale:

Les Cistacées sont des arbrisseaux aromatiques, sous-arbrisseaux ou plantes herbacées qui poussent souvent dans les régions aérées ensoleillées et sur des sols sablonneux ou calcaires (**Quezel et santa, 1963**).

Les cistacées forment une famille qui comprend environ 180 espèces des régions tempérées et chaudes bien représentées en particulier sur le pourtour méditerranéen, réparties en 8 genres (**Botineau, 2010**).

Le genre de ciste ou bien « *Cistus* » est un genre qui renferme une vingtaine d'espèces dont les principaux caractères sont: de pousser généralement en masse, d'exiger une exposition ensoleillée (d'où leur prédilection pour les régions méditerranéennes) et de renfermer des essences aromatiques et des substances résineuses qui les rendent très combustibles. Autre particularité : leurs fleurs ressemblent à celles des rosiers sauvages (rosier des champs, rosier pimprenelle, églantier...). En Algérie on compte environ une douzaine d'espèces et quelques hybrides bien déterminés (**Baba Aïssa, 2011**).

Parmi les espèces de *Cistus* il y a «le Ciste de Montpellier » (**Couplan, 2012**) qu'est un arbuste d'origine du Sud de l'Europe et d'Afrique du Nord, (**Anonyme, 2007**).

I.1.2. Classification:

Selon **Guignard et Dupont (2007)**, et l'**APG III** la position systématique du Ciste de Montpellier est comme suit :

Tableau I : Classification scientifique de *Cistus monspeliensis* L.

Rang	Nom scientifique
Cladus	Plantae
Cladus	Plasmodesmophytes
Cladus	Embryophytes
Cladus	Stomatophytes
Cladus	Hemitracheophytes
Cladus	Tracheophytes
Cladus	Euphyllophytes
Cladus	Spermatophytes
Cladus	Angiospermes
Cladus	Dicotyledones Vraies
Cladus	Dicotyledones Vraies Superieures
Cladus	Rosidees
Cladus	Malvidees
Ordre	Malvales
Famille	Cistaceae
Genre	Cistus
Espèce	<i>Cistus monspeliensis</i>

I.1.3. Etymologie :

«Ciste» est l'appellation française de *Cistus*, qui désignait des arbrisseaux en latin il est noté (également Cisthos) et en grec (kisthos ou kistos). Tout ces noms proviens du grec kistê, qui évoque la forme des leurs fruits (Couplan ,2012).

Le terme *Monspeliensis* ne signifie pas que cette espèce est originaire de Montpellier mais qu'elle a été tout d'abord identifiée par des botanistes de l'ancienne université de cette ville de la France (Beniston. NT et WS, 1984).

I.1.4. Caractéristiques morphologiques :

Arbuste persistance, compact, jusqu'à 1.5 m de haut, fortement aromatique, glanduleux et poisseux dans ses parties supérieures (Bärtels, 1998), très ramifier à écorce brune rougeâtre (Bayer et al., 2001).



Figure 1 : La plante de *Cistus monspeliensis* L. (Originale 2017).

a. Feuille :

Les feuilles opposées, sessiles, étroitement lancéolées, de 4-8 cm de long, vert foncé, ridées et légèrement poisseuses dessus. Plus claire et couvertes de poils étoilés dessous, à marge un peu enroulée (Lippert et Podlech, 2010).



Figure 2: Les feuilles de *Cistus monspeliensis* L. (Originale 2017).

Fleurs :

Les fleurs sont blanches, jusqu'à 3 cm de diamètre, par 2-8 en inflorescences terminales, en grappes, enroulées jeunes, sans bractées, 5 sépales, à veines rouges, les extérieurs un peu plus grands, pétales délicats, légèrement échancrés. Nombreuses étamines jaunes, ovaire supère à style court et stigmate globuleux à 5 lobes (Bayer et al., 2001).



Figure 3: Les fleurs de *Cistus monspeliensis* L. (Originale 2017).

b. Fruits :

Les fruits de Ciste de Montpellier sont des capsules déhiscentes à 5 valves contenant de nombreuses graines (Quezel et Santa, 1963).

c. Tige :

La tige est sous forme d'un rameau cylindrique de couleur marron (Anonyme, 2007).

I.1.5. Noms vernaculaires :

En arabe : oum aliya et en berbère : Touzzelt, Tamechtibt (Damerdji et Mebarek, 2014).

En France : Ciste de Montpellier ou fleur d'un jour (Damardji et Mebarek, 2014),

En anglais : Narrow-leaved Cistus, en Italie Cisto di Montpellie et en Espagnol : Estepa negra (Anonyme, 2007).

I.1.6. Répartition géographique et écologie de la plante :

Cet arbuste est caractéristique de la région méditerranéenne occidentale de l'Europe et de l'Afrique jusqu'à la Grèce (Anonyme, 2007). Il est très commun dans les forêts françaises où l'on trouve en Provence, Languedoc-Roussillon et Corse (Rameau, 2008). En Algérie, le ciste est réparti partout sur le tell et le littoral, dans les forêts, broussailles, coteaux secs, terrains siliceux, rocaillieux et calcaires (Beniston, 1984).

Le ciste est une plante pérenne qui adaptées à des climats variables, très sensible au froid, et pousse au soleil principalement sur des sols calcaires et siliceux, avec des pH varient entre 3,6 et 6,2 (in Henaoui, 2013).

I.1.7. Compositions chimiques de la plante :

Des études photochimiques qui effectuées sur les feuilles de *Cistus* montrent la présence des tanins, des terpènes, des polyphénols et principalement les flavonoïdes comme les aglycones, glycosides, pro-anthocyanidins et hydroflavonols (**Demetzos et al., 1989; Vogt and Gulz, 1991; Danne et al., 1993; Demetzos et al., 1999**).

Selon **Ben Jemia, 2008**, l'extrait d'hexane des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. est riche en hydrocarbures, composés carbonyliques, hydrocarbures de monoterpène, hydrocarbures de sesquiterpène, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes oxygénés, diterpènes et des acides gras et d'autres comme la vitamine E.

I.1.8. Utilisations et propriétés biologiques de *Cistus* L.:

Les espèces de genre de *Cistus* sont des plantes très inflammables grâce à la présence des résines. Elles sont cultivées comme des plantes ornementales (**Ferrandis et al., 1999 ; Rameau, 2008**).

Les feuilles des toutes les espèces de *Cistus* sécrètent les huiles essentielles et les résines (**Boumama et al., 2006**). La résine appelée ladanum est utilisée pour fixer le parfum dans les savons (**Clément, 2007**)

Toutes les espèces de *Cistus* sont fréquemment beaucoup employées dans en médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobiennes, antitumorale, antivirale et anti-inflammatoire (**in Boumama et al., 2006**). Ils sont utilisées en Italie, en Grèce, en Espagne et en Turquie comme traitement de la diarrhée et des ulcères peptiques ainsi pour des remèdes généraux pour plusieurs maladies de la peau et tant qu'agent antispasmodiques (**Attaguile et al., 2004**).

Selon (**Attaguile et al., 2004**) les extraits de *Cistus* modulent l'augmentation et la variabilité des leucocytes ainsi la sécrétion des cytokine.

Les fleurs de *Cistus monspeliensis*, en décoction, sont utilisées contre les douleurs d'estomac et le décocté de la plante entière est utilisé, en cataplasme, pour traiter les blessures ainsi la décoction des branches est employée contre l'asthme (**El Ouafi, 1997**) et les graines s'emploient comme apéritif (**Bammi et Douira, 2002**).

I.2. Les métabolites secondaires de la plante :

I.2.1. Les polyphénols

I.2.1.1. Présentation générale des polyphénols :

Les composés phénoliques sont des molécules du métabolisme secondaire spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1999**).

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Macheix et al., 2006**).

La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000**).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste (**Middleton et al., 2000**).

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (Acide hydroxybenzoïque, acide hydroxycinnamique,), les flavonoïdes qui comprennent à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes, les tanins et les lignines (**Sarni et Charneyer, 2006**)

I.2.1.2. la biosynthèse des polyphénols :

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de la l'acide shikimique. Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (**Bruneton, 1993**).

I.1.2.1.3. Les principales classes des polyphénols :

Les poly phénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 1). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau II: Principales classes de composés phénoliques.

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C_6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caphique scopolétine	Pomme de terre, pomme, citrus
C_6-C_4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
$C_6-C_2-C_6$	Stilbénes	resvératrol	Vigne
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs soja, pois
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	pinorésinol	Pin
$(C_6-C_3)_n$	Lignines		Bois, fruits à noyau
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés		Raisin, kaki

(Macheix et al., 2006 ; Sarni et Charnier, 2006).

I.2.1.4. Le rôle et l'intérêt des composés phénoliques :

❖ Chez les végétaux :

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV); soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux; dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par la transformation; dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini (**Macheix et al., 2005**).

❖ Chez les humains :

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Macheix et al., 2005**), et leurs activités veinotoniques, antitumorales, anti-radicalaires, analgésiques, antiallergiques, antispasmodiques, hépatoprotectrices, estrogéniques et/ ou anti-estrogéniques (**Muanda, 2010**), anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, et antiseptiques urinaires (**Bruneton, 1993**).

I.2.2. Les flavonoïdes :

I.2.2.1.. Présentation générale :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux (**Guinard, 1996**). Ils sont presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Bruneton, 1993**).

Ils sont très présents dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs de plante, abondants dans les légumes feuilles et présents dans les aliments d'origine végétale (légumes, céréales, légumineuse, fruits, etc.) et les boissons (vin, thé, cidre bière, cacao, etc.). cette

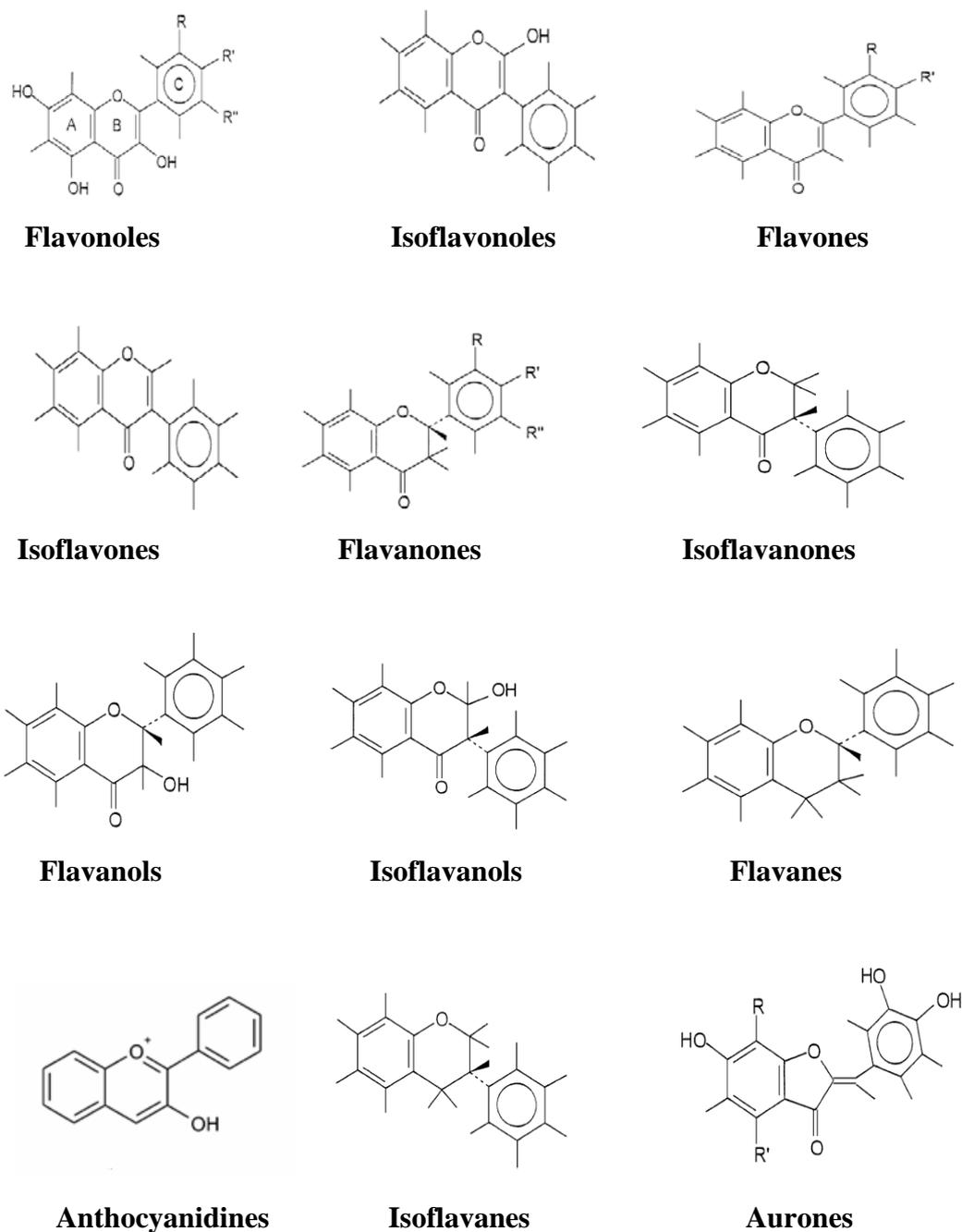


Figure 5: Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Sarni-Manchado et sheynier, 2006).

I.2.2.3. Localisation et distribution :

Les flavonoïdes sont très répandus chez les végétaux supérieures et surtout sous forme d'hétéroside (Vercauteren, 2012), qui sont des flavonoïdes hydrosolubles, s'accumulent dans les vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophyle (mais ces deux tissus peuvent

s'accumuler spécifiquement des structures différentes, comme cela a été démontré chez certains céréales). Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques. **(Bruneton, 2009).**

Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux, en particulier les épidermes des fruits et des feuilles **(Sarni-Manchado et Chaynier, 2006).**

I.2.2.4. Propriétés biologiques :

Les flavonoïdes ont une utilisation traditionnelle dans les symptômes de l'insuffisance veino-lymphatique (jambes lourdes, varices, hémorroïdes, ...) et de fragilité capillaire (purpuras, diabétiques, hypertendus) **(Vercauteren, 2012)**, dont la principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être "veino-actifs", c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance **(Bruneton, 1999).**

Ainsi qu'ils sont souvent anti-inflammatoire (ce qui est compatible avec ce qui est connu de leurs interactions dans les métabolismes de l'acide arachidonique), ils peuvent être antiallergiques, hépato-protecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques, antibactériens, antiviraux et antioxydants **(Bruneton, 1993).**

La quercétine est un flavonoïde qui a des effets bénéfiques sur la santé humaine, incluant une protection cardiovasculaire, une activité anticancéreuse, des effets anti-ulcéreux, ainsi qu'une activité antiallergiques, antivirales et anti-inflammatoire (inhibiteur de formation de médiateurs de l'inflammation) **(Anonyme, 2016).**

I.2.3. Les tanins :

I.2.3.1. Présentation générale:

Utilisés depuis l'Antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tanins ont une importance économique et écologique considérables et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et de leurs produits dérivés.

En première approximation, on peut considérer que les tanins sont des formes phénoliques condensés capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Aussi les premières estimations quantitatives des tanins ont-elles utilisé leur capacité d'interaction avec des protéines modèles : gélatine, albumines, hémoglobine... **(Macheix, 2005)**

I.2.3.2. Types des tanins et leurs structures :

Selon la structure, on a deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (pro anthocyanidines) :

a. Les tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont abondants chez les cotylédonés et certains arbres en sont des sources industriels : tanins de chêne, châtaignier... (Macheix, 2005)

Ce sont des esters d'acides phénoliques (acide gallique ou ellagique) associés à un polyol (habituellement le glucose). Ils sont divisés en ellagitannins et gallotannins.

Les gallotannins libèrent par hydrolyse acide, hydrolyse basique, à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique (Collin et Counet, 2011).

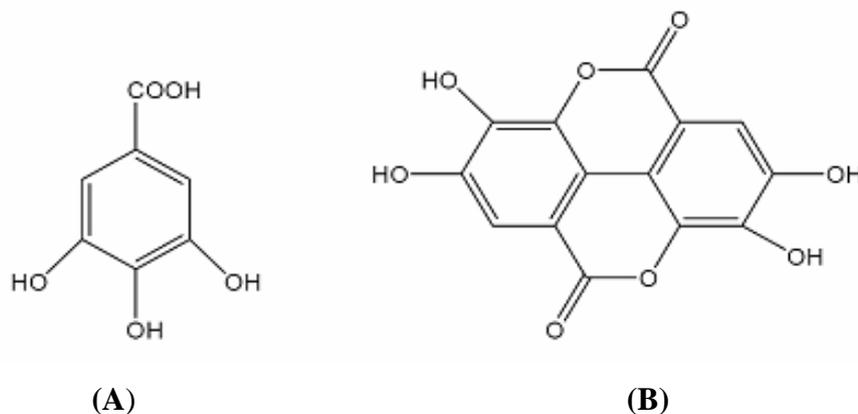


Figure 6: Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B) (Bruneton, 1993).

b. Les tanins condensés :

Ce sont des proanthocyanidines sont des polymères flavoniques.ils sont constitués d'unités de flavane-3ols liée entre elle par des liaisons carbone-carbone le plus souvent 4 → 8 ou 4 → 6 (Bruneton, 1993).

Les tanins condensés sont très abondantes dans certains organes végétaux consommés par l'homme, par exemple de nombreux fruits (pomme, prune, fraise...) ou des boissons fermentés ou non (thé, vin, cidre...) (Sarni- Manchado et Cheynier, 2006).

I.2.3.3. Utilisation des tanins :

Traditionnellement utilisé dans le traitement symptomatique des troubles digestifs tels que ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence, dans les troubles de l'érythisme cardiaque de l'adulte (coeur sain), aussi dans le traitement symptomatique des états neurotoniques des adultes et des enfants, notamment en cas de troubles mineurs du sommeil (Vercauteren, 2012).

La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines (enzymes digestives et autre, protéines fongiques ou virales ...) (**Bruneton, 1993**).

Avec les chênes et châtaigniers, ce sont des sources industrielles de tanins : revêtements, colles, teintures, tannerie (cuir de luxe), ... (**Vercauteren, 2012**).

Chapitre II: Matériel et Méthode

Notre travail a été réalisé durant une période de 04 mois de Février à juin 2016, au niveau des laboratoires du Centre de Recherche et Développement (C.R.D), SAIDAL d'El-Harrach à savoir :

- Laboratoire de chimie analytique pour le screening phytochimique, l'extraction, et le dosage des polyphénols.
- Laboratoire de Toxicopharmacologie, pour le test de toxicité aigue et l'activité anti-inflammatoire.
- Laboratoire de microbiologie pour l'activité antimicrobienne.
- Les coupes histologiques, ont été réalisées au niveau du laboratoire de botanique médicale de la faculté de médecine d'Alger.

II.1. Matériel :

I.1.1. Matériel biologique :

II.1.1.1. Matériel végétal :

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Cistus monspeliensis* L.

➤ Identification botaniques de la plante :

L'identification du *Cistus monspeliensis* L. a été faite à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'El-Harrach par les professeur Mr Abd Karim et Mr Ben houhou.

➤ La récolte

La plante a été récoltée mois de février-mars dans la forêt de Bainem, wilaya d'Alger, l'altitude de cette zone est 300 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 5kg.

➤ Séchage

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

Le broyage a été réalisé à l'aide d'un moulin à café électrique.

La conservation de la poudre obtenue s'est faite dans les bouteilles en verre hermétiquement fermées.



Figure 7 : Les feuilles de *Cistus monspeliensis L.* séchées.

II.1.1.2. Matériel animal :

Pour les besoins de l'expérimentation et afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire nous avons travaillé sur 38 souris albinos de souche NMRI des deux sexes (Male et femelle) et de poids variant de 22 à 25g (**Figure N°5**).

Les animaux sont acclimatés aux conditions de l'animalerie suivantes :

- Nourriture : granulé d'origine ONAB.
- Eau de ville est donnée de manière ad libitum.
- Température ambiante de 20 à 24°C.
- Taux d'humidité relative de 50%.
- Photopériode de 10 heures.



Figure 8 : Souris mâles et femelles Albinos (**Originale, 2015**).

II.1.1.3. Microorganismes :

L'étude antimicrobienne a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL, nous avons utilisés les souches microbiennes de référence citées dans le tableau ci-dessous :

Tableau III : Caractérisation de souches microbiennes utilisées.

Souches bactériennes	Type des bactéries	Références
<i>Escherichia coli</i>	Gram-	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-	ATCC 9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram+	ATCC 6538
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram+	ATCC 6633
Levures		
<i>Candida albicans</i>		ATCC 10231
<i>Saccaromyose cerevisaie</i>		ATCC 97027

II.1.2. Matériel non biologique :

L'appareillage, les réactifs et la verrerie, utilisés sont récapitulés dans l'**Annexe I**.

II.2. Méthodes d'étude :

II.2.1. Etude microscopique (histo-anatomique) :

- **But :**

Relever les caractères anatomique de la famille et l'espèce elle lui-même.

- **Mode opératoire :**

Nous avons opté pour la technique de double coloration qui présente les étapes suivantes effectuez des coupes transversales très fines à main levée à l'aide d'une lame de rasoir neuve, les coupes récupérées sont trempées successivement dans :

- l'eau de javel pendant 10 à 15 minute, pour vider les cellules.
- rinçage abondamment sous le robinet.
- l'eau pendant 10 minutes, pour éliminer les surplus d'eau de javel
- l'acide acétique à 0.1% pendant 1 minute, pour rétablir le PH et assurer la fixation du colorant sur la paroi.
- rinçage abondamment sous le robinet.
- L'eau pendant 10minute, pour éliminer l'acide acétique.
- le vert de méthyle pendant 10 à 20mn (1^{er} colorant), pour la coloration de la paroi lignifiée et/ou subérifiées.
- rinçage abondamment sous le robinet.
- l'eau pendant 10minute, pour éliminer l'excès de colorant.

- le rouge Congo pendant 5 à 10 mn (2^{ème} colorant), pour la coloration des parois pectocellulosiques.
- l'eau pour le dernier rinçage des coupes.

Les meilleurs coupes sont sélectionnées et mises entre lame et lamelle en ajoutant une goutte d'eau pour l'observation au microscope photonique.

II.2.2. Extraction des principes actifs

➤ Préparation de l'extrait aqueux :

L'extrait aqueux de *Cistus monspeliensis* L. a été obtenu par l'infusion de 5g de broyat des feuilles dans 40ml d'eau distillée. La solution est laissée infuser pendant 15 minutes, le mélange est d'abord filtré sur une gaze et ensuite sur papier Whatman (n°3). L'extrait sec est conservé au réfrigérateur.

➤ Préparation de l'extrait méthanolique :

L'extraction des principes actifs est effectuée par la macération, qui est une opération consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant (méthanol) pour en extraire les principes actifs, est une extraction qui se fait à température ambiante.

La poudre de plante étudiée s'est mise à macérer pendant 24 heures à température ambiante, dans un mélange méthanol-eau (80:20 V/V). L'extraction est refaite 3 fois avec renouvellement du solvant. Les macéras sont réunis et filtrés sur papier filtre.

Le solvant est éliminé du filtrat sous vide à 40°C à l'aide d'un Rotavapor. Le principe de l'appareil consiste à évaporer le solvant sous vide en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation, le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide. L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite (40°C), évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés. C'est une méthode d'évaporation simple, utile, douce et rapide (**Penche, 2010**). Après l'évaporation du solvant, l'extrait sec est solubilisé dans le méthanol.

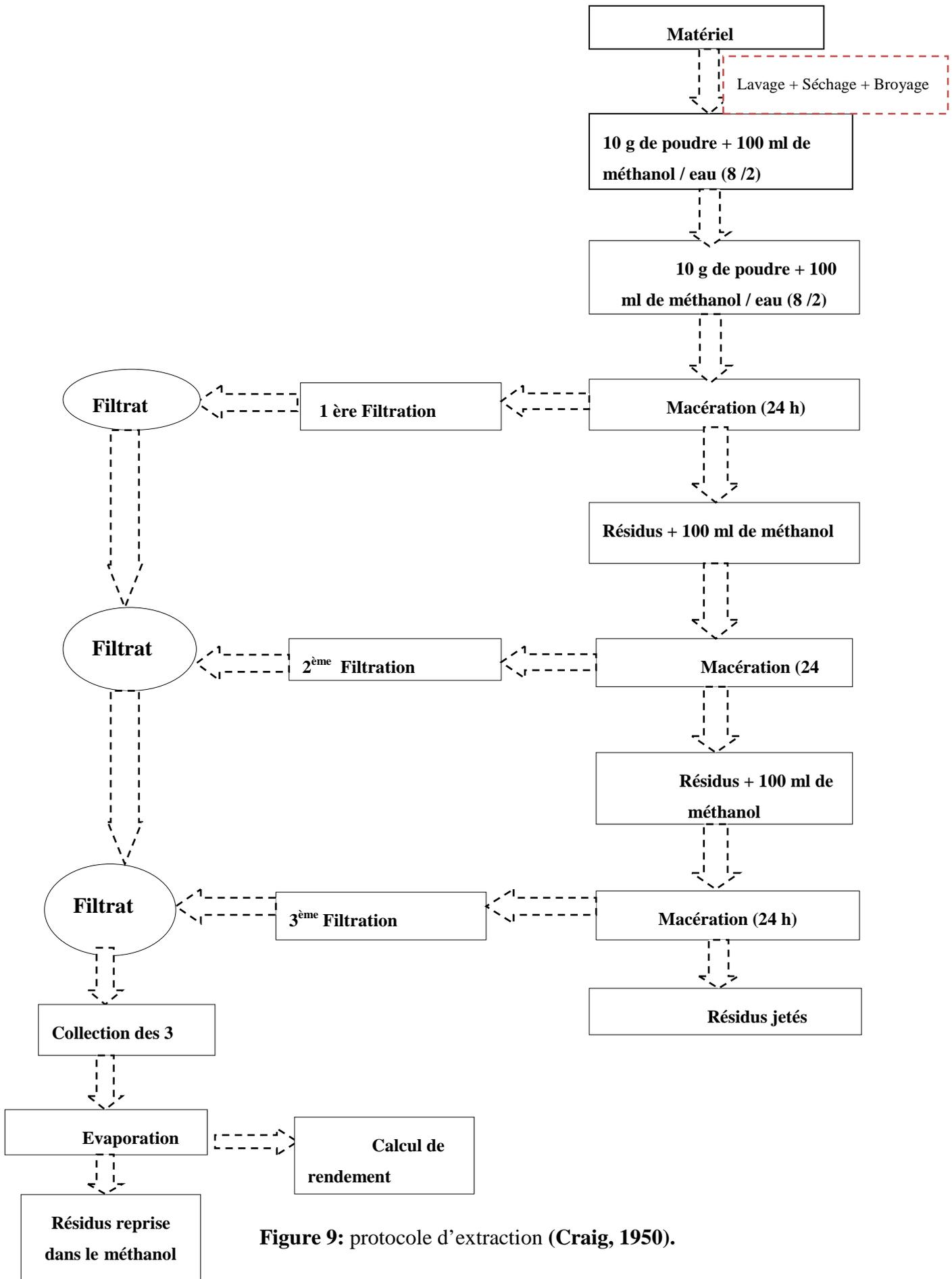


Figure 9: protocole d'extraction (Craig, 1950).

➤ **Rendement de l'extrait brut :**

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé via l'équation :

$$R \% = (Me/Mv) \times 100$$

R % : Rendement en %.

Me : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant.

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction (**Harborne, 1998**).

II.2.3. Méthode de screening phytochimique préliminaire :

Ces tests sont effectués sur la poudre et l'infusé. Cette analyse a été effectuée selon les méthodes préconisées par **Bruneton(1999)** et **Trease et Evans (1987)**.

➤ **Préparation de l'extrait aqueux:**

20 g de poudre sont introduit dans 100 ml d'eau bouillante, on laisse infuser pendant 30 minutes, après filtration, le filtrat est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée (**Figure N°10**).



Figure 10: préparation d'extrait aqueux (**Originaire, 2016**).

➤ **Identification des principaux constituants chimiques :**

a. Identification des Anthocyanes

A quelques gouttes d'acide chlorhydrique on ajoute 5 ml d'infusé, la réaction donne une coloration rouge en présence d'anthocyanes.

b. Identification des leuco anthocyanes

2g de poudre végétale dans 20 ml d'un mélange de propanol / Acide chlorhydrique (1-1 ; V-V), sont portés au bain marie bouillant pendant quelques minutes, une coloration rouge se développe en présence des leuco anthocyanes.

c. Identification des tanins

Quelques gouttes de FeCl_3 à 5 % sont ajoutées à 5 ml d'infusé. La réaction donne une coloration bleue noire en présence des tanins.

- **Tanins condensés (catéchique)**

15 ml d'infusé sont additionnés à 7 ml de réactif de STIASNY, la réaction donne une coloration rouge en présence de tanins catéchiques.

STIASNY : (méthanal-acide chlorhydrique concentré 2 : 1 V/ V).

- **Tanins galliques**

A 5 ml d'infusé, 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 . La réaction donne une coloration bleu foncés.

d. Identification des quinones

- **Quinones libres**

2 g de poudre végétale humectés par 2 ml d'acide chlorhydrique 1N, sont mis en contact pendant 3 heures dans 20 ml de chloroforme, puis filtrer. Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque $\frac{1}{2}$, il y a formation d'une coloration rouge en présence des **quinones libres**.

- **Quinones combinés**

2 g de poudre végétale additionnés à 15 ml d'acide sulfurique 2N et porter à reflux pendant 2h. La solution extractive est filtrée puis épuisée par 20 ml de chloroforme. Cette solution chloroformique est évaporée à sec puis épuisée par l'ammoniaque $\frac{1}{2}$, la réaction donne une coloration rouge en présence des **quinones combinées**.

e. Identification des saponosides :

Mettre dans un tube à essai 5 ml d'HCl à 0.1N, et dans une deuxième tube 5 ml de NaOH à 0.1N, puis rajouter dans chacune d'elles 2 à 3 gouttes d'infusé. La formation de mousses indique la présence des **saponosides**.

f. Identification des alcaloïdes :

5 g de poudre végétale sont humectés avec l'ammoniaque $\frac{1}{2}$ pendant 24h dans 50 mL d'un mélange éther chloroforme (3-1 ; V-V). Le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N.

Des réactions de précipitations sont effectuées sur la solution chlorhydrique. En présence d'**alcaloïdes**, le réactif de Dragendorff donne un précipité.

Dragendorff :

Solution A : dissoudre 0.85g de sous nitrate de bismuth dans un mélange composé de 10ml d'acide acétique glacial et de 40ml d'eau distillée.

Solution B : dissoudre 8g d'iodure de potassium dans 20ml d'eau distillée.

Immédiatement avant l'emploi, mélanger 15ml de la solution A et 15ml de la solution B, puis ajouter 20ml d'acide acétique glacial et compléter à 100ml avec de l'eau distillée.

g. Identification des sénosides :

On met dans une fiole conique 2,5 g de poudre végétale, puis on rajoute 50 ml d'eau distillée et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré.

Le mélange est chauffé dans un bain-marie pendant 15 minutes, après refroidissement on agite avec 40 ml d'éther. La couche étherée est séparée, et séchée avec le sulfate de sodium anhydre, ensuite évaporation à siccité.

Au résidu refroidi, on rajoute 5 ml d'Ammoniaque diluée $\frac{1}{2}$, il se développe une coloration, jaune ou orangé, le chauffage de cette solution au bain marie pendant 2 minutes donne une coloration violette rouge en présence des **sénosides**.

h. Identification des coumarines

Préparation de l'extrait : faire bouillir à reflux 2 g de poudre dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 minutes puis filtrer.

A 5 ml du filtrat, rajouter 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'HCl à 10 %, formation d'un trouble indique la présence des **coumarines**.

i. Identification des flavonoïdes :

A 5 ml d'infusé, on additionne 5 ml d'HCl, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool iso-amylque, la réaction donne une coloration rouge orangé en présence de flavonoïdes.

• Glycosides :

2g de poudre végétale on rajoute 10ml de H_2SO_4 . La formation d'une coloration rouge brique ensuit violette indique la présence des glycosides.

j. Amidon :

A 2g de poudre végétale on rajoute quelques gouttes d'Iode (I_2). Une formation d'une coloration bleue violette est obtenue en présence de l'amidon (**Bruneton, 1999**).

k. Les composés réducteurs

Nous avons rajouté 1ml d'extrait éthanolique ,2ml de l'eau distillé et 20 gouttes 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**).

I. Stérol et terpène :

Macérer 1g de poudre dans 10ml d'éther pendant 24h puis filtrer et évaporer dans un bain marin.

Reprendre la concrète avec 0.5ml d'anhydride acétique, 0.5ml chloroforme et rajouter 3ml d'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 surnageant prend une coloration verte ou violette (**Trease et Evans, 1987**).

II.2.4. Dosage quantitatif par des réactions colorimétriques :

II.2.4.1. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par **Wong et al., 2006** avec quelques modifications.

➤ Le principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu est mélange d'acide phosphotungstique et phosphomolybdique (état de valence + 6 du métal) qui peut être réduit par les phénols en oxyde de tungstène de coloration bleue ($\lambda_{\max} = 725-760$ nm, différents états de valence des métaux).

Les structures électroniques des produits de réduction ne sont pas bien connues. La réaction d'oxydation est accélérée en milieu alcalin (dans notre cas, par un ajout de carbonate de sodium) (**Collin et Crouzet, 2011**).

➤ Mode opératoire :

A 300 μ l de la solution échantillon (extrait méthanolique), on ajoute 1,5 ml du réactif Folin- Ciocalteu (1/10) et 1,2 ml de la solution de 7,5 % Na_2CO_3 . Après incubation à 24°C pendant 30 min, l'absorbance est lue contre le blanc à 760 nm.

➤ Expression des résultats :

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage. Cette gamme d'étalonnage est préparée à différentes concentrations en acide gallique allant de 50 μ g/ml à 200 μ g/ml dans le mélange (méthanol/eau), (6/4) afin de lui faire subir la même procédure.

II.2.4.2. Dosage des flavonoïdes :

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par **Djeridane et al. (2006)** et **Boudiaf (2006)**, est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits avec quelques modifications.

➤ **Le principe :**

Le chlorure d'aluminium (AlCl_3) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 430 nm.

➤ **Mode opératoire :**

Un millilitre de la solution échantillon (extrait méthanolique), on ajoute à 1 ml d' AlCl_3 méthanolique à 2%. Le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance du est mesurée à 430 nm.

➤ **Expression des résultats :**

La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$). Une gamme d'étalonnage est préparée à différentes concentrations en quercétine allant de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ à 40 $\mu\text{g/ml}$ dans le méthanol afin de lui faire subir la même procédure.

II.2.4.3. Dosage des tanins hydrolysables :

Nous avons adopté la méthode de **Saad (2013)**, avec une légère modification pour le dosage des tannins hydrolysables.

➤ **Mode opératoire :**

A un millilitre de la solution échantillon (extrait méthanolique), on ajoute 5 ml d'une solution aqueuse d'iodate de potassium KIO_3 à 2,5%. Après 10 min d'incubation, l'absorbance du mélange est déterminée à 550 nm.

➤ **Expression des résultats :**

Une gamme d'étalonnage est préparée à différentes concentrations en acide tannique allant de 500 $\mu\text{g/ml}$ à 2000 $\mu\text{g/ml}$ dans l'eau distillée afin de lui faire subir la même procédure.

II.2.5. Activités biologiques :

II.2.5.1. Etude de la toxicité aigüe de l'extrait brut aqueux :

➤ **But :**

Le but de cette étude est de déterminer la toxicité de notre plante donc de déterminer la dose létale (DL 50) qui est la dose capable de provoquer la mort de 50% des animaux après une administration unique.

A fin de ne pas sacrifier beaucoup d'animaux dans nombreuses tentatives préliminaires, nous avons opté pour la notion de « teste limité »: si la dose de 2g/kg ne provoque pas de mortalité, signifié que le produit n'est pas toxique, donc la détermination de la dose létale est inutile **OCDE (2009)**.

➤ **Principe :**

Selon **OCDE (2009)**, un essai limite peut être effectué des rongeurs (souris et rats) en administrant par voie intra gastrique une dose unique de produit tester qui soit au moins égale 2g/kg du poids corporel sur un lot composé de 10 souris et les observé pendant 14 jours afin de signaler les signes de mortalité.

S'il n'y'a aucune mortalité dans les 14 jours, le produits est considéré comme non toxique ainsi que la détermination de la DL50 est inutile.

➤ **Mode opératoire :**

- ✓ **1^{ère} étape :** choix, pesée et préparation des animaux en lots

Pour réaliser le test limite nous avons choisis des souris comme animaux d'expériences, a nombre de 10, préalablement pesée et répartis dans 2 lots de 10 souris chacun : (Lot témoins et lot essais) les lots sont maintenus dans des cages en polypropylène.

✓ **2^{ème} étape :** préparation des solutions administrées : l'eau physiologique et l'extrait aqueux

- ✓ **3^{ème} étape :** mode d'administration des solutions.

- Mettre les souris jeun de nourriture la veille de test, l'eau n'est pas limitée.
- Le lendemain, pour réaliser l'administration il faut commencer par la contention qui doit être ferme, pour éviter toute morsure et maîtriser les réactions parfois très vives de la souris.
- Prendre la souris par la main la base de la queue et de l'autre saisir la nuque en formant un pli aussi large que possible en arrière des oreilles entre le pouce et l'index .

Cette manipulation est plus simple effectué si la souris est placée sur une surface non glissante « exemple un grille ».

- Par voie intra gastrique, l'aide d'une sonde de gavage que nous avons administré aux souris les produits à tester (eau physiologique « lot témoin », et extrait aqueux « lot essai »).

Lot témoin : chaque souris reçoit 0.5ml d'eau physiologique.

Lot essai : chaque souris reçoit 0.5ml de la dose préparée de l'infusé des feuilles de ciste ; à raison 2g/kg du poids corporel. Priver les souris de nourriture pendant 3 heures après l'administration du produit.

L'observation des souris se fait pendant 14 jours afin de signaler les symptômes de toxicité.

II.2.5.2. Evaluation de l'activité anti inflammatoire l'extrait aqueux de *Cistus monspeliensis* L. :

➤ **But et principe :**

Il consiste à vérifier l'action inhibitrice de l'extrait aqueux de plante sur un œdème provoqué par l'injection de carragénine à 1 % sous l'aponévrose plantaire de la patte d'une souris.

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égale produit de référence et du produit anti-inflammatoire à tester (Colot, 1972).

➤ **Mode opératoire :**

Les souris sont répartis en 3 lots de 6 souris chacun, à savoir trois lots traités et un lot témoin. Les souris 3 lots ont été mises à jeun pendant 18 heures avant l'expérimentation.

Le gavage a été réalisé à l'aide d'une sonde gastrique.

❖ **Gavage de lots traités :**

- **Lot 1** : les souris sont gavées avec 0.5ml par souris.
- **Lot référence** : souris gavées avec 0.5ml de Diclofénac par souris (75mg/kg) (produit chimique sous forme médicament).

❖ **Lot non traité :**

- **Témoin** : gavage de 0.5ml d'eau physiologique.

1 heure après le gavage du traitement, 0.01 ml de la solution de carragénine à 1% est injectée sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de chaque souris.

Après l'injection, mesurée chaque 1h, 3h et 6h l'épaisseur des pattes, l'épaisseur de la patte est effectuée à l'aide d'un pied à coulisse.

➤ **Calcul :**

Le calcul du pourcentage de l'épaisseur de la patte traitée est effectué par rapport à l'épaisseur de la patte témoin par la formule suivante :

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

$$\%AUG = \frac{Dt - D0}{D0} * 100$$

Où :

%AUG : pourcentage d'augmentation.

Dt : Diamètre de la patte au temps t.

D0 : Diamètre initiale de patte.

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

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

Où :

%INH : pourcentage d'inhibition de la patte.

%AUG_{témoin} : pourcentage d'augmentation de la patte de lot témoin.

%AUG_{traité} : pourcentage d'augmentation de la patte de lot traité.

II.2.5.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

➤ Principe :

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis au contact de l'extrait aqueux et méthanolique de notre plante, et ceci par la méthode de diffusion sur plaque de gélose. Des disques absorbants stériles de 9mm imprégnés d'extrait méthanolique ou aqueux, sont déposés sur une gélose inoculée de souche. La diffusion des extraits dans la gélose permet d'inhiber la croissance des germes tout au tour du disque « zone d'inhibition » représentée par une zone claire, obtenue après incubation. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de chacune des souches. Cette méthode est validée par le laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL ; et son principe est tiré du titrage des antibiotiques « pharmacopées Européennes ».

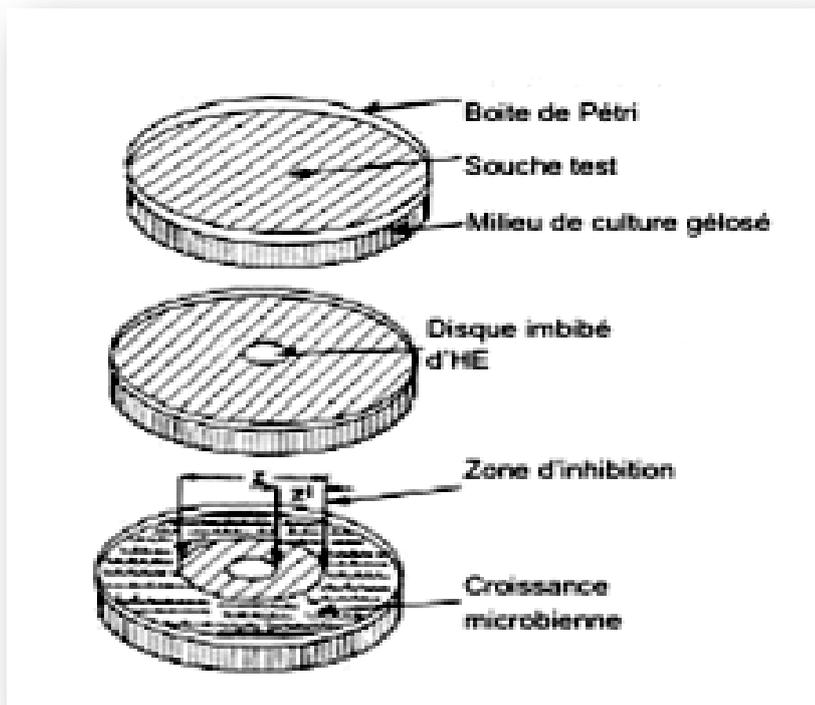


Figure 11: Principe de la méthode de diffusion par disque (Pibiri, 2006).

Solutions et milieux de culture : Eau physiologique stérile, milieu gélose nutritive, milieu gélose Sabouraud, milieu gélose Muller-Hinton.

➤ **Mode opératoire :**

Nous faisons fondre des deux milieux de culture Muller-Hinton (pour les bactéries) et sabourd (pour les levures) dans un bain-marie a 95°, puis nous versons aseptiquement dans les boites de pétri de 9cm de diamètre, une couche a raison de 15mm par boîte.

A partir d'une jeune souche de 18 heure pour les bactéries et 48 heure pour les levures, nous réalisons des suspensions troubles, en prélevant 3 à 5 colonies isolées et identiques, que nous mettons dans 5ml d'eau physiologique stérile, puis nous agitons au vortex.

Nous faisons une lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre, par l'estimation de la densité optique qui doit être comprise entre 0,22 à 0,32 pour les bactéries ; et 2 à 3 pour les levures, et cela à une longueur d'onde de 620nm.

Si valeur de la densité optique trouvée est compris dans les intervalles notés ci-dessus, la concentration de la suspension est de 10^7 à 10^8 germes/ml.

Si la valeur de la densité optique n'appartient pas aux intervalles, nous ajustons la concentration, soit en ajoutant des colonies si elle est inférieure la valeur minimale, soit de l'eau physiologique si elle est supérieure à la valeur maximale.

L'inoculum doit être utilisé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

Les milieux Muller-Hinton et Sabouraud sont fondus.

Nous laissons refroidir jusqu'à une température de 45°.

Nous remplissons des flacons de 50ml avec les milieux, qu'on ensemence avec 200ul de chaque suspension et on agite manuellement.

Nous transvasons rapidement 4ml de chaque milieu inoculé sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche (couche support) de gélose solidifiée.

➤ **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.

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

Tableau IV: 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 Entièrement sensible	$D > 28$

Chapitre III : Résultat et Discussion

III. Résultats et discussion :

III.1. Etude histo-anatomique:

✚ La tige :

L'observation de **la coupe transversale de la tige** de *Cistus monspeliensis* L. sous le microscope photonique est donnée la figure suivant :

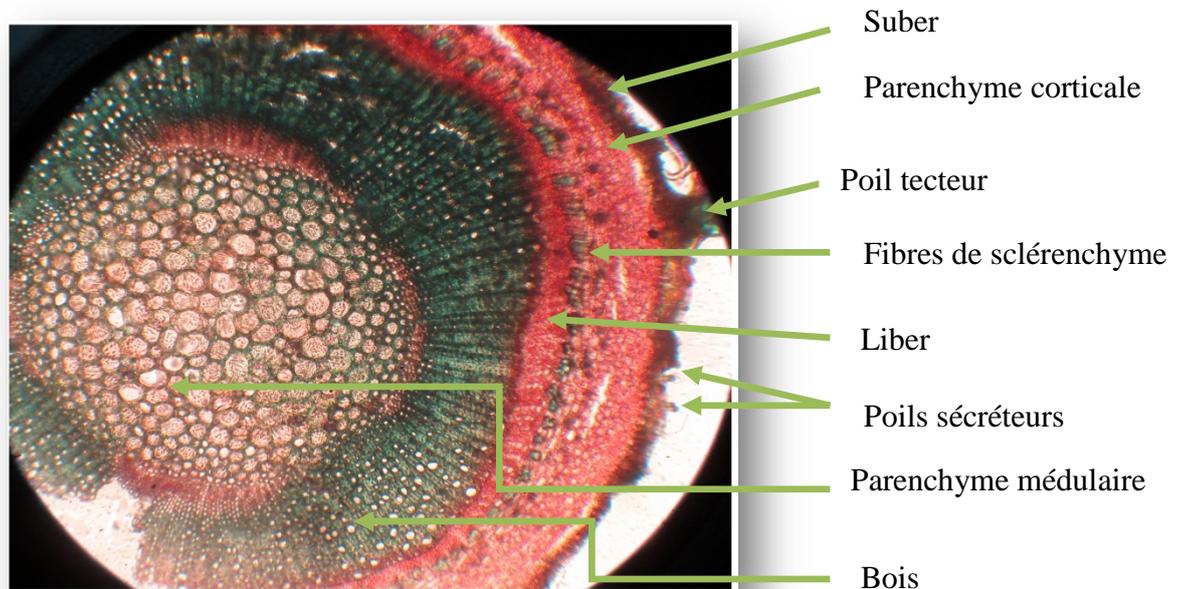


Figure 12: Coupe transversale de tige de *Cistus monspeliensis* L. vue au microscope photonique **400×** (Originale, 2016).

La tige de *Cistus monspeliensis* L. présente une section circulaire et une symétrie axiale, de l'extérieur vers l'intérieur on distingue la présence des deux zones :

➤ **Zone I :** Une zone externe est formée par :

- La cuticule (C) ou la couche externe recouvrant la paroi de la tige, elle est généralement résistance, imperméable et formé du cire (une matière secrété par la plante leur rôle est principalement la protection de la plante).
- L'épiderme (E), situé directement sous la cuticule on trouve. Il constitue un tissu de revêtement, formé d'une assise superficielle composée généralement par une seule couche de cellules.
- Deux types d'expansions des cellules épidermiques qui sont : Les poils tecteurs (Pt), jouant un rôle dans la protection de la plante, notamment contre la dessiccation. Et les poils sécréteurs (Ps) qui sont des expansions des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la

sécrétion des différentes substances telle que les huiles essentielles. Ce type de structure en expansion a été également montré chez d'autres espèces du même genre et qui sont riches en huiles essentielles tel que ; *Cistus creticus* L. qui comprend un épiderme uni strate et présentent deux types des poils tecteurs et sécréteurs (Sahraoui et al., 2013) (Figure 12).

➤ **Zone II** : elle représente le cortex qui est composé de deux tissus ; le parenchyme (de remplissage) et le sclérenchyme (de soutien).

- Le parenchyme corticale est formé par des cellules parenchymateuses de plusieurs taille et formes différentes associées en plusieurs couches.
- Vers l'intérieur, nous avons observé la présence des fibres de sclérenchyme, Ce dernier est un tissu de soutien qui joue un rôle important dans la croissance de l'organe (Prat, 2007).

➤ **Zone III** : apparaît sous forme d'un cercle de faisceaux conducteurs est circulaire.

Il est composé du phloème primaire et secondaire, du xylème primaire et secondaire et de la moelle. Ceci est fréquent chez les dicotylédones, les faisceaux conducteurs disposés en cercle autour d'une moelle épaisse (Bowers et Mauseth, 2012).

Ces tissus conducteurs permettent la circulation des sèves dans l'ensemble de la plante (Prat, 2007). Le cercle des faisceaux conducteurs est circulaire.

➤ **La zone IV** :

Elle occupe une position centrale, et se compose d'un parenchyme médullaire (Pm): Au centre de la jeune tige s'accumulent des cellules primaires issues des divisions initiales au sein de la jeune tige, dont le rôle est probablement nourricier et parfois fibre qui joue un rôle de soutien.

✚ **La feuille** :

L'observation de **la coupe transversale de la feuille** de *Cistus monspeliensis* L. sous le microscope photonique est donnée la figure suivant :

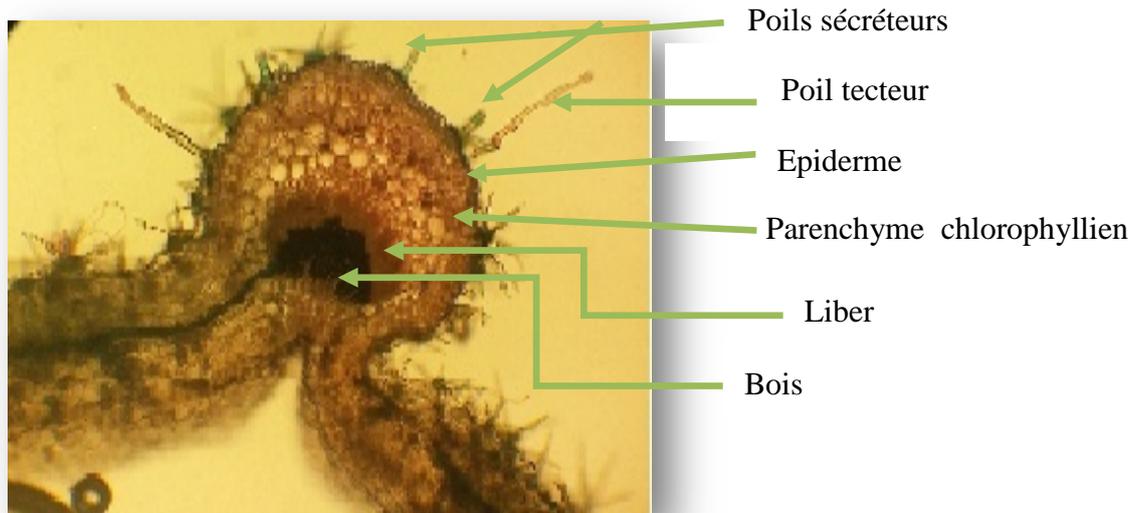


Figure 13: Coupe transversale au niveau de la feuille de *Cistus monspeliensis* L. vue au microscope photonique 40× (Originale, 2016).

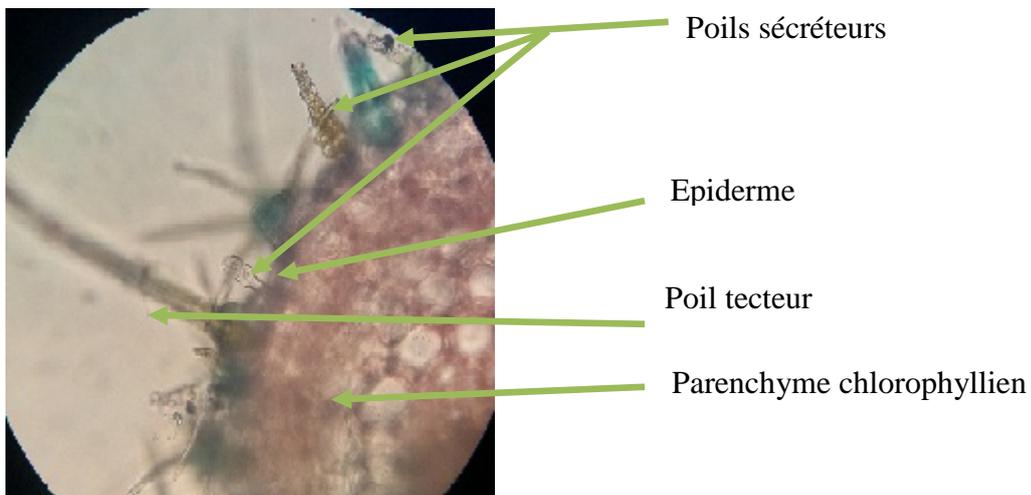


Figure 14: Coupe transversale au niveau de la feuille de *Cistus monspeliensis* L. vue au microscope photonique 100× (Originale, 2016).

Les feuilles de *Cistus monspeliensis* L. sont composées des deux faces l'une est supérieure et l'autre est inférieure, de l'extérieur vers l'intérieur on distingue la présence des tissus suivants :

- Des poils Tecteurs (Pt) : Une expansion des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la protection de la plante.

- Des Poils Sécréteurs (Ps) : Une expansion des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la sécrétion des différentes substances.

Dans une autre étude a été menée sur les caractères anatomiques d'un autre espèce du genre *Cistus* en Algérie (la wilaya du Batna) les chercheurs ont déclaré que Les feuilles et les tiges de l'espèce *Cistus creticus* L. portent sur leur surface deux types de poils ou de trichomes qui sont glandulaires et non glandulaires (**Sahraoui et al., 2013**).

Pour les poils ou les trichomes glandulaires sont allongés et constitués d'un groupe de cellules, et les poils ou les trichomes non glandulaires sont de deux types, celles qui sont multicellulaires et d'autres qui sont unicellulaires ou simples.

Dans une autre étude, **Gulz et al. (1996)** ont également signalé la présence des poils glandulaires qui sont les sites de biosynthèse de métabolites secondaires, la sécrétion et de stockage sur cette plante.

Cependant, **en 2002, Demetzosd et al.**, ont suggéré que la présence de plusieurs trichomes glanduleux sur la surface des feuilles de *C. creticus* pourrait expliquer la production de l'huile essentielle.

III.2. Rendement d'extrait méthanolique:

Le rendement obtenu à partir de l'extrait méthanolique est de 21,4%. Il est obtenu après une macération pendant 7 jours de la poudre de *Cistus monspeliensis* L.

L'extrait brut des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. obtenu par macération dans le méthanol-eau est un liquide à odeur caractéristique et de couleur verte.

Selon **Attaguile et al., (2004)** : une extraction répétée trois fois avec eau bouillante d'une poudre des parties aériennes séchées dans un endroit frais et à l'abri de la lumière de *Cistus incanus* L. et *Cistus monspeliensis* L. a été fait. Le rendement final était 14.5% pour *Cistus incanus* L. et 13.43% pour *Cistus monspeliensis* L. Ces résultats ne concordent pas avec nos résultats.

Cette différence entre les résultats a des origines multiples tel que les caractéristiques régionales et variétales (**Melani et al, 2006 ; Adams ,2002**), période de récolte, méthode d'extraction, notions de chemotype (**Mazur et al, 2003**).

III.3. Résultats du screening phytochimique :

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

Tableau V: Résultats du screening phytochimique.

Les molécules testées	Observation	Résultats
Anthocyanes	Absence de coloration bleue	-
Leuco anthocyanes	Coloration rouge	+
Tanins	Coloration bleu noire moyenne	+
Tanins catéchétiques	Absence de coloration rouge	-
Tanins galliques	Coloration bleue foncée	+
Quinones libres	Absence de coloration rouge	-
Quinones combinés	Couleur rouge	+
Saponosides	Formation de mousses	+
Coumarines	Formation d'un trouble	+
Flavonoïdes	Coloration en jaune	+
Glucosides	Coloration rouge brique ensuite violette	+
Alcaloïdes	Pas de formation d'un précipité rouge	-
Les composés réducteurs	Précipitation basique	+
Amidon	Absence de coloration Bleu violacé	-
Stérols et triterpène	Présence de coloration vert ou violet	-

(+) : Absence / (-) : Absence.

Le test phytochimique réalisé sur la poudre et l'infusé de *Cistus monspeliensis* L. révèle la présence de plusieurs familles de métabolites.

Ces résultats montrent que la plante est très riche en polyphénols tel que : les leuco anthocyanes ; les tanins totaux ; les tanins galliques ; les saponosides ; les flavonoïdes ; les glycosides et les composés réducteurs.

On note aussi la présence de quinones combinées; d'autre part, on note une absence remarquable des Quinones libres, des Coumarines ; des tanins catéchiques ; des anthocyanes ; des alcaloïdes; d'amidon ; des stéroïls et triterpènes.

Sahraoui et al., (2013), ont rapporté la présence des tanins, tannins galliques, des flavonoïdes, des quinones combinés et des saponosides dans les feuilles de *Cistus creticus* L.

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

Selon (**Demetzos et al., 1989; Vogt and Gulz, 1991; Danne et al., 1993; Demetzos et al., 1999**), les feuilles de *Cistus* présentent des tanins, des terpènes, des polyphénols et principalement les flavonoïdes comme les aglycones, glycosides, pro-anthocyanidines et hydroflavonols.

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

III.4. Dosage quantitatif par des réactions colorimétriques :

III.4.1. Dosage quantitatif des polyphénols totaux :

La spectrophotométrie a permis de quantifier le taux des polyphénols dans l'extrait méthanolique des feuilles de la plante. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations.

La teneur en phénols totaux est rapportée en mg équivalent acide gallique/g (EAG/g) d'extrait de notre plante.

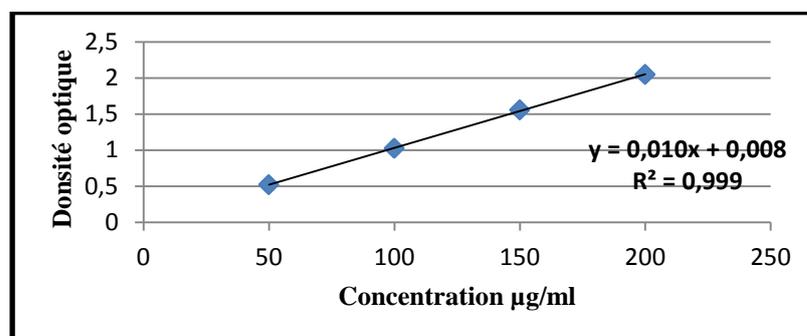


Figure 15 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Les résultats indiquent que l'extrait du *Cistus monspeliensis* L., présente une teneur en polyphénols qui est de 3.616 mg EAG/g d'extrait.

La valeur obtenue serait inférieure à celle obtenue par **Amnsore et al., en 2010**, qui ont travaillé sur *Cistus landaniferus* L. Leurs extraits méthanolique et éthanolique contiennent respectivement 18.43 ± 2.74 mg EAG/g d'extrait et 11.87 ± 0.53 mg EAG/g d'extrait.

La différence des résultats obtenus serait liée à la distribution des métabolites secondaires qui peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié également aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**).

En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Falleh et al., 2008 ; Podsedek, 2007**).

III.4.2. Dosage quantitatif des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes contenant dans l'extrait méthanoliques des feuilles de la plante a été estimée par la méthode d' $AlCl_3$. La courbe d'étalonnage est effectuée par quercétine à différentes concentrations.

La teneur en flavonoïdes est rapportée en mg équivalent quercétine/g (EQ/g) d'extrait de notre plante.

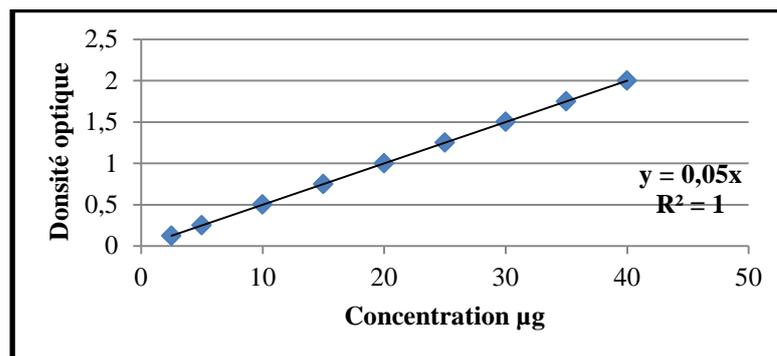


Figure 16: Courbe d'étalonnage de quercétine.

Les résultats obtenus montrent que *Cistus monspeliensis* L, présente une teneur en flavonoïdes de l'ordre de 0.2084mg EQ/g d'extrait.

Nos résultats ne sont pas similaires à celles trouvées par d'Amnsore *et al.*, (2010) qui sont travaillé sur *Cistus landaniferus* L. dont les valeurs sont 64.33 ± 0.44 mg E rutin/g d'extrait pour l'extrait méthanolique et 61.40 ± 0.17 mg E rutin/g d'extrait pour l'extrait éthanolique.

Cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes.

III.4.3. Dosage quantitatif des tanins hydrolysables :

La teneur en tanins hydrolysables contenant dans l'extrait méthanoliques des feuilles de la plante a été estimée par la réaction à l'iodate de potassium. . La courbe d'étalonnage est effectuée par acide tannique à différentes concentrations.

La teneur en tanins hydrolysable est rapportée en mg équivalent acide tannique/g (EAT/g) d'extrait de notre plante.

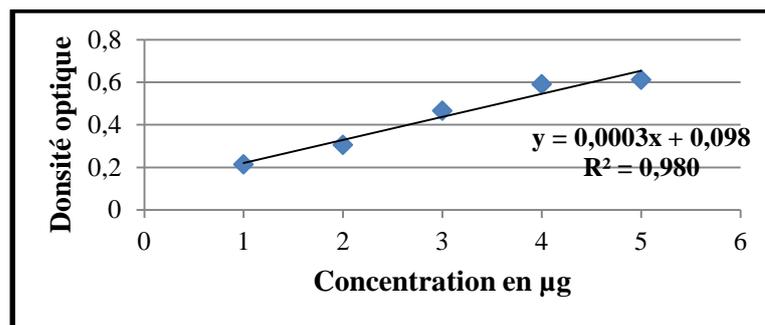


Figure 17: Courbe d'étalonnage d'acide tannique.

Les résultats indiquent que le *Cistus monspeliensis* L. présente une teneur en tanins hydrolysables de l'ordre de 0.6728 mg EAT/gd'extrait.

Le résultat ne peut être évalué du fait de l'absence des travaux de dosage des tanins hydrolysables sur les plantes de famille de cistacées donc nos résultats sont originaux.

III.5. Résultats des activités biologiques :

III.5.1. Résultat de la toxicité aigüe de l'extrait brut aqueux :

Une seule dose d'infusé (dose limite) de 2g/kg du poids corporel est testée sur un lot de 10 souris pour une seule administration par voie intra gastrique (voie orale).

Les résultats du test limite effectués pour déterminer la toxicité des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau VI: Les résultats du test limite de toxicité aigüe de l'extrait aqueux.

	Produit administré	Nombre d'animaux par lot	Nombre de mortalité	Mortalité (%)
Lot essai	Infusé de <i>Cistus monspeliensis</i>	10 souris	0	0
Lot témoin	Eau physiologique	10 souris	0	0

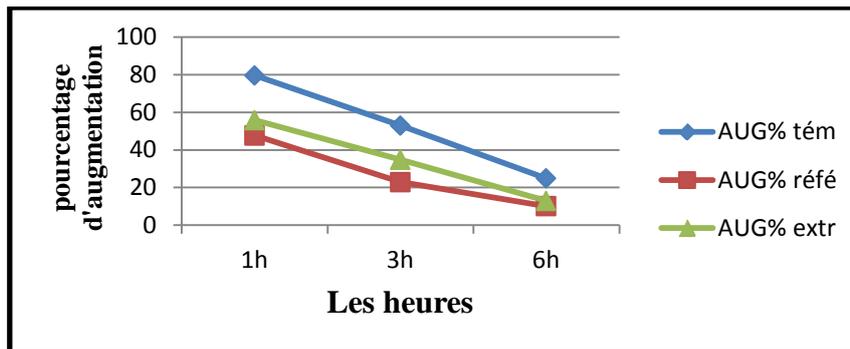
Au cours de notre étude sur la toxicité et selon nos conditions expérimentales, la dose utilisée de 2g/kg de l'infusé des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. n'a révélé aucune mortalité, ce qui nous permet de déduire que la DL50 est supérieure à 2g/kg de poids corporel et que l'infusé des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. sera considéré comme non toxique.

Le résultat obtenu est en accord avec celui d'**Aziz et al. (2011)** qui montre que la partie aérienne (tige et feuille) de *Cistus landaniferus* L. n'est pas toxique avec une dose de 5g/kg. Cette plante est testée sur les rats et les souris albinos.

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

III.5.2. L'activité anti-inflammatoire :

Les résultats de l'administration de l'eau physiologique, de l'extrait aqueux et du produit de référence le Diclofenac aux souris albinos chez lesquelles nous avons provoqués l'inflammation par l'injection de la carragénine à 1% dans la surface plantaire de la patte arrière gauche, sont représentés dans les deux courbes suivantes :



AUG% tém : pourcentage d'augmentation de l'œdème de témoin ; AUG% réf : pourcentage d'augmentation de l'œdème de référence ; AUG% extr : pourcentage d'augmentation de l'extrait aqueux.

Figure 18: Pourcentage d'augmentation de l'œdème de la patte arrière gauche en fonction de temps.

❖ Lot témoin :

L'administration de la carragénine entraîne une augmentation significative du pourcentage de l'augmentation du diamètre des pattes des souris témoins à partir de la première heure de l'expérimentation.

De plus, une augmentation significative du diamètre de la patte des souris est observée à la première heure comparée à toutes les heures de l'expérimentation (52.88% ; 24.85%) à la troisième et sixième heure, respectivement.

A partir de 1^{ère} heure, le pourcentage de l'augmentation du diamètre des pattes des souris témoins commence à se réduire progressivement.

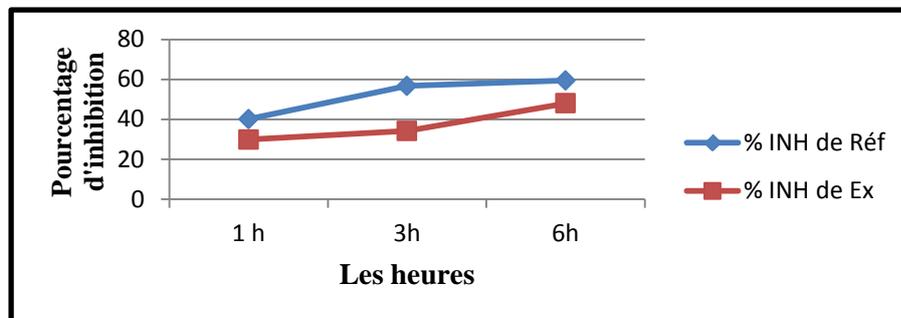
Après six heures d'expérimentation le pourcentage de l'augmentation du diamètre des pattes des souris témoins est significativement diminué comparé à celui de la première, la troisième et la sixième heure (**Figure 18**).

❖ Lots traités :

Pour le lot de référence, les résultats obtenus montrent que l'administration de l'anti-inflammatoire du Diclofénac à (75 mg/kg) provoque une diminution du diamètre de la patte des souris pendant les six heures de l'expérimentation. En effet, cette réduction significative est observée à partir de la première heure et continue jusqu'à la fin de l'expérimentation. A la fin de l'expérimentation, le pourcentage de l'augmentation du diamètre des pattes des souris de lot référence est significativement réduit à la sixième heure comparé à la première heure de l'expérimentation (**Figure 18**).

Le traitement par l'extrait aqueux de feuilles *Cistus monspeliensis* L. (2g/kg) induit une diminution significative de diamètre de la patte des souris à partir de la première, et

jusqu'à la sixième heure de l'expérimentation. De plus, à la sixième heure, le pourcentage de l'augmentation du diamètre des pattes des souris traitées par l'extrait aqueux *Cistus monspeliensis* L. (2g/kg) montrent des valeurs significativement réduites comparées aux valeurs de la troisième et sixième heure, respectivement (**Figure 18**).



%INH de Réf : pourcentage d'inhibition de l'œdème de référence ; %INH de Ex : pourcentage d'inhibition de l'œdème de l'extrait aqueux.

Figure 19: Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte arrière gauche en fonction de temps.

Pour lot de référence, l'administration du Diclofénac à une dose de 75 mg/kg présente une inhibition significative de l'œdème de la patte de souris à la première heure à la sixième heure. En effet, cette activité atteint 59.40% à la sixième heure de l'expérimentation. Ces valeurs ne montrent aucune différence significative entre les différentes heures de la période expérimentale (**Figure 19**).

L'administration orale de l'extrait aqueux *Cistus monspeliensis* L. à la dose de 2g/kg présente une activité inhibitrice de l'œdème de la patte des souris, cette activité augmente progressivement jusqu'à la sixième heure de l'expérimentation, à ce stade sa valeur est plus élevée que celle notée à la première heure. De plus, aucune différence significative n'est notée entre les valeurs du pourcentage d'inhibition de l'augmentation du diamètre des pattes pendant la troisième et la sixième heure, Respectivement (**Figure 19**).

Au cours du suivi des souris témoins et des souris traitées pendant les six heures après l'injection de la carragénine nous avons noté une augmentation du diamètre de la patte des souris de tous les lots. Cependant, l'augmentation du diamètre de la patte chez le lot témoin a été plus importante que les lots traités. Ce qui prouve bien que la carragénine a induit une réaction inflammatoire engendrant un œdème.

L'œdème est provoqué par la carraghénine dans la patte de la souris comporte trois phases :

- Une première phase qui fait intervenir l'histamine et la 5-hydrox tryptamine qui favorisent la vasodilatation, la transsudation plasmatique et l'œdème
- Une seconde phase qui fait appel aux kinines comme médiateur augmentent la perméabilité vasculaire
- Une troisième phase dont le médiateur est supposée être la prostaglandine (**Lindsey et al.; 1999**) associée à la migration leucocytaire inflammatoires aigus ou chroniques. Les médicaments anti-inflammatoires interviennent en général en s'opposant à l'effet de ces médiateurs chimiques : Histamine, sérotonine, kinines et prostaglandines. Les propriétés anti-inflammatoires du suc peuvent être justifiées par la présence de certains de ces constituants solubles dans l'eau. Tel que : les coumarines, les triterpènes pentacycliques, flavonoïdes et les tanins (**Gharabi et al., 2008**)

Pour l'évaluation du test anti-inflammatoire nous avons utilisé le test d'inhibition de l'œdème de la patte droite postérieure de souris à la carragénine. Par ce principe l'extrait aqueux de *Cistus monspeliensis* L. s'est révélé moyenne actif (48.03%) plus précisément à la sixième heure avec la dose de 2g/Kg. Ces résultats concordent avec plusieurs recherches qui montrent que l'activité anti-inflammatoire de l'extrait peut s'expliquer en partie par la présence dans les feuilles des composés polyphénoliques comme les tanins et les flavonoïdes (**Bruneton, 1993**).

De nombreuses études ont prouvé que les flavonoïdes déploient leurs activités pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro inflammatoires très actives. Cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase A2 (**Manthey et al., 2000**).

Les saponines ou saponosides sont des composés produits naturellement par certaines plantes, caractérisées par leurs propriétés tensioactives leurs conférant un pouvoir moussant. Différentes saponines isolées comportent des propriétés immunomodulatrice, cytotoxique, antitumorale, anti-inflammatoire (**Cuy ., 2010**).

III.5.3.L'activité antimicrobienne :

Les résultats relatifs aux diamètres des zones d'inhibitions de l'effet des deux extraits (aqueux et méthanoliques) des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. sur les souches microbiennes sont présentes dans le tableau :

Tableau VII: Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches microbiennes testées vis-à-vis des deux extraits (aqueux et méthanolique) des feuilles de *Cistus monspeliensis* L.

Souches microbiennes	Zones d'inhibitions pour l'extrait aqueux	Sensibilité	Zones d'inhibitions pour l'extrait méthanolique	Sensibilité
<i>Escherichia coli</i>	-	Résistante	-	Résistante
<i>Pseudomona saeruginosa</i>	-	Résistante	-	Résistante
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.5mm	Sensible	19mm	Très sensible
<i>Bacillus subtilus</i>	-	Résistante	18.5mm	Très sensible
Levure				
<i>Candida albicans</i>	13mm	Sensible	16mm	Très sensible
<i>Saccaromycos ecerevisaie</i>	121mm	Sensible	17mm	Très sensible

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. a montré que :

- *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* résistent aux deux extraits par contre *Bacillus subtilus* présente seulement une résistance vis-à-vis de l'extrait aqueux.
- *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, ont montré une certaine sensibilité vis-à-vis de nos extraits à savoir l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux.

En 2005, une étude a été faite sur cinq espèces de *Cistus* se trouvant en Turquie, 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 antimicrobienne 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 microorganismes testées sauf *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* qui ont montré une certaine résistance (**Güvenc et al., 2005**). Ces résultats concordent avec nos résultats sauf pour la souche *candida albicans* qui a été inhibée par nos extraits.

Certaines substances biochimiques telles que les terpènes, les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes et les alcaloïdes, contenus dans le *Cistus Creticus* L., lui confèrent une activité antimycobactérienne puissante. Ainsi le *Cistus Creticus* L. permet de contrôler le développement de certains micro-organismes tels que les bactéries coliformes helicobacter et ainsi maintenir l'équilibre bactériologiques de la flore intestinale sans risque de toxicité ni irritation gastrique. Le *Cistus Creticus* L. est également très efficace dans les infections fongiques telles que les mycoses intestinales (*Candida albicans*) et vaginales (**Anonyme, 2016**).

Selon Sqalli et al. (2007), le *Cistus albidus* L., *C. monspeliensis* L. et *C. salviifolius* L. sont des espèces inhibitrices de croissance des mycobactéries.

Bouamama et al. (2006), 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. Ces résultats concordent avec nos résultats.

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 Tomás-Menor et al., (2013) : l'activité antimicrobienne des extraits dérivés des certaines espèces de *Cistus* est liée à leurs contenus polyphénolique.

Les stilbènes sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés antifongiques et même les gallotanins ont une activité antibactérienne intense. Parmi les acides phénoliques, l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide protocatéchique ne présentent qu'une légère activité anti-bactérienne envers *Pseudomonas aeruginosa* (**Collin et Crouzet, 2011**).

Conclusion

Conclusion

Conclusion

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

- Les coupes histologiques qui ont été réalisées sur les feuilles et la tige de notre plante montré que le *Cistus monspeliensis* L. porte des poils sécréteurs des différentes substances et métabolites secondaires au niveau de leur tige et leurs feuilles.
- Les résultats de test phytochimique réalisé ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires, parmi lesquels les leuco-anthocyanes, les tannins, les tannins galliques, quinones combiné, saponosides, coummarines, flavonoïdes et les composés réducteurs.
- L'analyse quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins hydrolysables par les courbes étalonnages des étalons d'acide gallique, quercétines et l'acide tannique respectivement. Celle-ci nous a permis de confirmer la présence de polyphénols dans notre plante.
- L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire nous a amené à déduire que l'extrait aqueux des feuilles de *Cistus monspeliensis* L. possède activité avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème de 48.03%.
- L'étude de l'activité antimicrobienne de deux extraits aqueux et méthanolique de notre plante sur certains micro-organismes vis-à-vis quatre bactéries et deux levures a montré que les extraits ont une action sur ces germes microbiens.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques ;

Conclusion

- Caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques par des méthodes spécifiques;
- Evaluer d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques.
- Faire une étude sur l'activité anti-oxydante des feuilles de *Cistus monspeliensis* L.

Références bibliographique

Références bibliographiques

Anonyme (2016). <http://www.nutranews.org/sujet.pl?id=204>

Amnsore , M., Sendra, E., Pérezez, A., Ivarey, J-D., Skali-senhaji, H., Abrini, J et Fernandez-lopez, J. (2010). Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extract from leaves of Rochrose. *Plant foods hum nutr.* 65, 170-178.

Attaguile G., Perticone G.,Mania G., Savaca F. et pennisi G.et Salomone S.,(2004) : Cistus ancanus and Cistus monspeliensis inhibit the contractile reponse in isolated rat smooth muscle. *Journaly of Ethnopharmacology.* 92, 245-250

Baba Aïssa, F. (2011). Encyclopédie des plantes utiles: plantes médicinales, plantes aromatiques, plantes alimentaires. Edition El Marifa. Alger, 112p.

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.

Bammi, J., Douira, A. (2002). Les plantes médicinales dans la forêt de l'Achach (plateau central, Maroc), *Acta Botanica Malacitana*, 137p.

Barnes Peter J (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clinical Science*, 94, 557-572.

Bärtels, A. (1998). Guide des plantes du Bassin méditerranéen. Edition française : les Éditions Eugen Ulmer, paris, 106p.

Bayer, E., Buttler, K.P., Fenkenziller, X. et Grau, J. (2001). Guide de la flore méditerranéenne : Caractéristiques, habitat, distribution et particularités de plus de 536 espèces. Edition Delachaux et Niestlé, Milan, 108p.

Beniston, NT et WS. (1984). Fleur d'Algérie, Entreprise nationale du livre Alger, 155p.

Benjemia, M., Kchouk, M-E., Senatore, F., Autore, G., Marzocco, S. et Bruno, M. (2013). Antiproliferative activity of hexane extract from tunisian *cistus libanotis*, *cistus monspeliensis* and *cistus villosus*. *Chemistry central journal*. 1, 7-74.

Benmansour, A., (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, 33p.

Benoît, B. (2008). Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. Tela Botanica.

Billing, J. et Sherman, P. W. (1998). Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol*, 73: 3-49.

Botineau, M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Lavoisier, 835p.

Boudiaf, K. (2006). Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister, Setif.

Bouamama H., Noel T., Villard J., Ben harref A. et Jana M. (2006). Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *cistus* L. Species. *Journal ethnopharmacology*, 140, 104-107.

Bousta, D., Faraha, A., Elyoubi-EL., Hamsasa, EL., Mansourib., L., Soidroua, SH., Benjilalia, 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*, 45, 412-17.

Bowers, K. et Mauseth, J. (2012). Structure des plantes. Paris.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris. Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier. Paris, 1120p.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.l.], 647-673p.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. Ed Tec & Doc - Lavoisier, Paris. 199p.

Charpentier B., Hamon F., Lorléac H., Harley A., Huard A., Ridoux L. et Chanselle S. (2004). Guide de préparateur en pharmacie, 2^{ème} Ed ; Masson, Paris, 1472p.

Colot, M. (1972). Notions techniques de pharmacologie générale. Ed Masson, 147p.

Couplan, F. (2012). Les plantes et leurs noms : Histoires insolites, Edition Quae, 45p.

Collin S. et Crouzet J., (2011). Polyphénols et procédés. Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire, *Tec et Doc*, ISBN, 978-2-7430-1338-7.

Cowan, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol.*12, 564-582.

Crig, C., Gregory, G., et Hausman, W. (1950). Versatile laboratory concentration device, *Anal Chem.*vol 22, 1462p.

Cuy, B. (2010). Isolement et caractérisation des saponines des trois plantes de la famille des *Arliaceae* et *Dracanceae* et évaluation de leurs activités cytotoxique sur les cellules tumorale. Thèse de doctorat, université de Lorraine, France, 89p.

Danne, A., Petereit, F., Nahrstedt, A. (1993). Proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry*, 34, 1129–1133.

Damerdji A., et Mebarek A., (2014). Diversité taxonomique et structure des gastéropodes dans les stations à *Cistus monspeliensis* L. (Cistacées) dans la zone de Nédroma (W.O. Algérien). *Afrique science : Revue internationale des sciences et technologie*, vol 10, N 4.

Delille L , (2007).les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger, 122.

Demetzos C., Mitaku S., Hotellier F., et Harvala, C. (1989). Hétérosides poly phénoliques des feuilles de *Cistus creticus* L. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 47, 314–318.

Demetzos, C., Stahl, B., Anastasaki, T., Gazouli, M., Tzouvelekis, L.S., Rallis, M., (1999). Chemical analysis and antimicrobial activity of the resins ladano, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Medica*, 65, 76–78.

Dieng C. (1993). Contribution à l'étude de *Khaya senegalensis* (DESR.) A.JUSS (*Meliaceae*). Thèse pharmacie, Dakar, 10, 109 P.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J. F. and Stocker P (2006). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 801-809.

El Quafi, F. (1997). Contribution à l'étude des plantes médicinales du Maroc Thèse pour l'obtention du Doctorat vétérinaire d'I.A.V Hassan II, Rabat, 56p.

Fintelmann, V. et Weiss, R. (2004). Manuel pratique de phytothérapie .Edition Vigot, Paris, 395p.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *C. R. Biol*, 5, 372-379.

Ferrandis, P., Herrantz, J.M., Martinez-Sanchez, J.J., 1999. Effect of fire on hardcoated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecol*, 144, 103–114.

Ghrabi, Z., Sand, R.I. (2008). A Guide to Medicinal Plants in North of Africa, 49-49p.

Girre, L. (2006). Les plantes et les médicaments : l'origine végétale de nos médicaments. Edition Nathalie Rachline, paris, 131p.

Goto K., Iwase F., Kichise K., Kitono K., Totuka A., Obata T. (1990). Isolation and properties of a chromosome dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 2, 505-509.

Guignard, J.L. et Dupont, F. (2007). Abrégé botanique : systématique moléculaire. Ed. Masson SAS.187-189p.

Guignard J.L., Cosson L. et Henry M. (1985). Abrégé de phytochimie. Ed. Masson Paris, pp.155-174.

Guignard J.L. (2000). Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177-185

Güvenç Ş, Öztürk Ş, Aydın S. (2005). Contributions to the lichen flora of Kastamonu and Sinop Provinces in Turkey. *Nova Hedwigia* 83: 67–98.

Gulz, PG., Herrmann, T. et Hangst, K (1996). Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora*.191, 85–104.

Harborne., JB. (1998). Phytochemical methods : A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition, 203-214p.

Henaoui, I. (2013). Les Cistacées dans la région de Tlemcen (Nord-Ouest algérien) : aspects inflammabilité, combustibilité et cartographie. Thèse de doctorat. 49p.

Kaufmann SHE. (1995). Response to intracellular pathogens. Ed. Springer ;R.G. Landes, New York; Austin, p. 345.

Lechat P.; Calvo F.; De Crémoux P.; Giroud J-P.; Lagier G.; Lechat Ph.; Rouveix B., Weber S. (1990). Les médicaments de l'inflammation, *in* Abrégé de pharmacologie. Masson, Paris, 288-319p.

Lindsey, K. et Munday., R. (1991). Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol*, 5, 1385-1391.

Lippert, W. et Podlesh D. (2010). Gros plan sur les plantes de méditerranée. Edition Nathan, 180p.

Lugasi A., Hovari, J., Sagi, K., Birol, V., (2013). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta, Biol-Szeged*, 47, 119-125.

Macheix, J.J., Fleuriet, A. and Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 4-5p.

Manaadhar, N.P., (1995): Substitute spice in Nepal. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 3, 7-77.

Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N (2011). Biological properties of *citrus* flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr. Med. Chem.*, 8: 135-153.

Marchadier E. (2009). Etude fonctionnelle d'une centre d'interaction protéique chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. Thèse doctorat, université de Paris XI.

Meena, M. R. and Sethi, V. (1994). Antimicrobial activity of essential oils from species. *J. Food Sci*, 31, 68-70.

Messaros N., Nordman P., Plésiat P., Roussel M., Van Eldere J., (2006). *Pseudomonas aeruginosa* : Résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire, université de pharmacologie cellulaire et moléculaire, *Douvain médical*, 8, 305-316.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52, 673-839.

Minor, T.E. et Marth E.H. (1976). Staphylococci and their significance in food. Elsevier Scientific Publishing, Company Amsterdam, 297p.

Muanda, F. (2010). Identification de polyphenols, évaluation de leur activités antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse doctorat, université Paul Verlaine-Metz, France, 77p.

Ndiaye, Y., Dièye A.M., Touré M.T., Faye B. (2006). Evolution de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*annonarticulata* (*annonaceae*) sur l'œdème de la patte de rat induit par la carragénine, *Pharm.Méd.Trad.Afr*,14, 179-186.

Newman, D.J., Cragg, G.M., et Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66, 1022-1037.

OCDE (2009). Performance assessment : Comparaison of 403 C×t Protocoles via simulation and for selected Real Datasets. Publication hygiène et sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations n°39, OECD, Paris.

Paris, R.R. et Moyses, H., (1981). Matière médicale, 3 tomes, Masson, 420, 518 et 509 p. Paris.

Penche, P. I. (2010). Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, p51-52.

Perry, J.J., Staley, J.T., et Lory S. (2004). Microbiologie. Edition Dunod. Paris, 891p.

Pibiri M. C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, p.161.

Podsedek A (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. A review. *LWT. food science and technology.* 40, 1-11.

Quezel, P. et Santa, S. (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris. C.N.R.S., 2 Vol. 1170 p.

Rameau, J.C., Dominique, M. et Dumé, G. (2008). Flore forestière française, guide écologique illustré, 3 Région méditerranéenne, forêt privée française. Paris, 2426 p.

Roger, P. (2007). Expérimentation en biologie et physiologie végétales. Edition Research Press, 189p.

Sarni-Manchado, P and Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, 2006, p2-10.

Singh, SB. et Barrett JF. (2006). Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1006-1015.

Small, E., Catling et Paul M. (2000). Les cultures médicinales canadiennes. Edition NRC Research Press, Canada, 281p

Trease E, Evans WC, (1987). Pharmacognosie. Edition Billiaire Tindall. London, p61-62.

Tomas MenoL., Morales-Soto A., Barrajon-Catalan E., Roldanc Micol A (2013). Correlation between the antibacterien activity derived from various spanish *Cistus* species. *Food and chemical Toxicology.* **55**, 313-322.

Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jak bkiewicz-Banecka, J. and Âgrzyn, G. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, **62**, 132-135.

Urquiaga, I. and Leighton, F. (2000). Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res*, **33**: 55-64.

Vercantere J. (2011). Plan, formules et illustration des cours de pharmacognosie, Edition universités de Montpellier, 89-107p.

Vogt, T. et Gulz, P.G. (1991). Isocratic column liquid chromatographic separation of a complex mixture of epicuticular flavonoid aglycones and intracellular flavonol glycosides from *Cistus laurifolius* L. *Journal of Chromatography*, 537, 453–459.

Wong, J.G., Anderson, R.A., Graham, G.M., Chu M.C., Sauter M.V., Guarnaccia M.M. et Labo R.A., (2006). The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Edition Fertil Steril*, 12p.

Annexes

Annexe I

Tableaux VIII : Appareillages, Verreries et Réactifs.

Appareils	Verrerie et accessoire	Réactifs/ Produit
<ul style="list-style-type: none"> -Agitateur. -Balance analytique. -Balance pour les animaux. - Bain marie. -Bec-Benzen. -Etuve. -Haute pour solvants. -Rota vapeur. -Plaque chauffante. -Spectrophotomètre UV. -Réfrigérateur. -Pied à coulis. 	<ul style="list-style-type: none"> -Ampoule à décanté. -Ballons (50ml) et (100ml). -Béchers (petits et grands). -Bistouri. -Boîtes de pétrie. -Ciseaux. -Coton. -Disques absorbants. -Entonnoir en verre. -Eprouvette de 100ml. -Erlen Mayer. -Fioles en verre. -Flacons en verre. -Gants à usage unique. -La gaze pour filtrer. -Papiers aluminium. -Pince stérile. -Pipettes graduées. -Seringue de 2.5ml et de 1ml. -Seringue d'insuline. -Sonde gastrique pour gavage. -tatu. -Support pour ampoule. -Tubes à essais. 	<ul style="list-style-type: none"> -Méthanol -HCL (0,1N ; 1N ; 2N) -NaOH (0,1N) -Fecl3 -Propanol/Acide -Chlorhydrique -Réactif STIASNY -Acétate de sodium -Ammoniaque -Acide sulfurique -Ethere chloroforme -Réactif de Dragendroff -Réactif de Valser et Mayer -KOH -Copeau de magnésium -Alcool iso - amylique -Acide d'anhydride acétique -Carraghénine -Eau distillée -Eau de javel -Eau physiologique

Annexe I



Figure N° 20: Etuve



Figure N° 21: Plaque chauffante



Figure N° 22: Rota vapeur



Figure N° 23: Pied à coulis



Figure N° 24: Spectrophotométrie

Annexe II

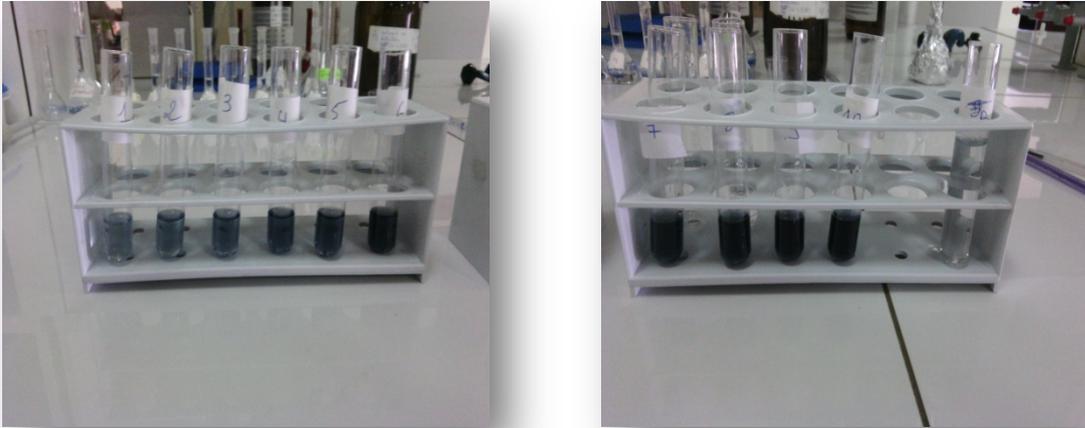


Figure N°25: Gamme acide gallique

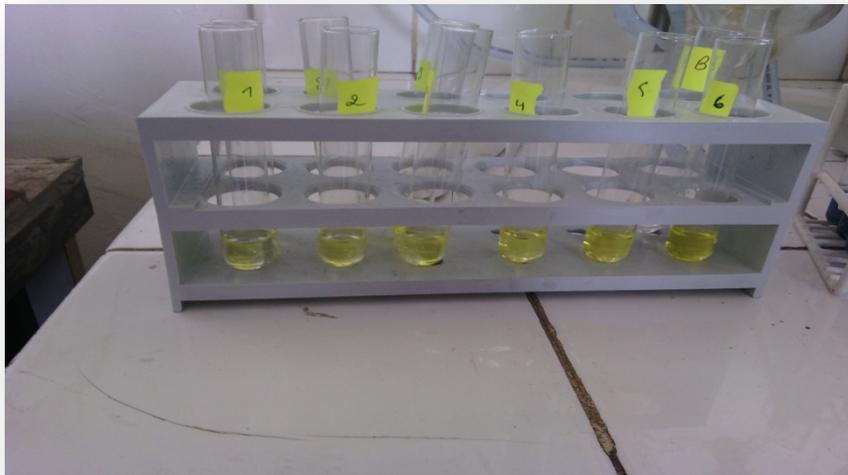


Figure N°26: Gamme quersétine

Annexe III

Tableaux IX : les résultats de l'activité antimicrobienne

	
<p><i>Bacillus subtilis</i></p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
	
<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p><i>E. coli</i></p>
	
<p><i>Bacillus subtilis</i></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>
	
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p><i>E. coli</i></p>
	
<p><i>Saccaromyse cerevisaie</i></p>	<p><i>Candida albicans</i></p>
	<p>EM : extrait methanolique E aq : extrait aqueux</p>
<p><i>Saccaromyse cerevisaie / Candida albicans</i></p>	

Annexe IV



Figure N° 27: injection de carragénine aqueux



Figure N°28 : gavage de l'extrait



Figure N° 29: mesure de l'épaisseur de l'œdème par pied à coulis