

UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologies Végétales

ETUDE D'UNE PLANTE:

Chrysanthemum coronarium L.

Par

Fatouma BENOUAKLIL

Devant le jury composé de :

M. KHALI	Maitre de conférences A, USD de Blida	Président
F. SAIDI	Professeur, USD de Blida	Examinatrice
C. CHAOUIA	Maitre de conférences B, USD de Blida	Examinatrice
M.S. HAMAIDI	Maitre de conférences A, USD de Blida	Promoteur
F. HAMAIDI	Maitre assistant A, USD de Blida	Co-Promoteur

Blida, Janvier2012

RESUME

Ce travail, réalisé sur des capitules de *Chrysanthemum coronarium* L. a pour but de recenser les différents composés biochimiques ainsi que les effets thérapeutiques de l'huile essentielle et des différents extraits.

L'analyse de l'huile essentielle des capitules du Chrysanthème à couronne, dont le rendement est de 0,15%, a été réalisée par CG/MS. Nous avons identifié 57 constituants (89,46%) dont certains sont majoritaires, tels que l'ester d'acide aceto-acétique, 3(10)-Caren-4-ol (14,01%), le verbenyl acétate (8,2%), le 1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene) (7,31%) et la Santolina triène (6,32%).

L'analyse phytochimique de ces capitules a porté sur le dosage des flavonoïdes, des flavonols, des alcaloïdes ainsi que sur les composés phénoliques. Les analyses qualitatives ont révélé la présence de tanins catéchiques et l'absence des saponines.

L'huile essentielle ainsi que les extraits ont montré une faible activité antimicrobienne. Malgré cette faible activité, l'huile essentielle se distingue par une activité remarquable sur *Bacillus subtilis*.

L'extrait méthanolique a présenté une forte capacité à piéger les molécules du radical libre DPPH par rapport à l'huile essentielle avec des EC50 respectives : 0,850 mg/ml et 75,33 mg/ml.

L'huile essentielle possède un meilleur effet anti-inflammatoire par rapport à l'extrait aqueux. Par contre l'extrait méthanolique a montré une activité inflammatoire.

L'extrait aqueux des capitules de *Chrysanthemum coronarium* L. utilisé à une concentration de 8%, n'a montré aucun signe de toxicité aigue.

Mots clés : *Chrysanthemum coronarium* L., huile essentielle, analyse phytochimique, activité antimicrobienne, anti-oxydante, anti-inflammatoire, toxicité.

SUMMURY

This study is a part of the research which aims at a better understanding of the biochemical composition and therapeutic effects of *Chrysanthemum coronarium* L. flowerheads.

Essential oil of garland *Chrysanthemum* flowerheads was obtained by the hydrodistillation method using Clevenger apparatus. The yield of this oil was about 0,15%. GC/MS analyses of the essential oil showed 57 constituents representing 89,46% of the oil, the major components are: (10)-Caren-4-ol ester of acetoacetic acid, verbenylacetate, 1,6-dioxaspiro [4.4]non-3-ene, 2- (2,4-hexadiynylidene), Santolinatriene.

The phytochemical analysis of those flowerheads has allowed the determination of phenolics compounds, flavonoids, flavonols and alkaloids. Qualitative analysis revealed the presence of catechin tannins and the absence of saponins.

The low antimicrobial activity of the essential oils and the studied extracts varied from a microbial strain to another. With a remarkable effect of the essential oils against *Bacillus subtilis*.

The methanolic extract showed a stronger ability to scavenge DPPH free radical molecules than the essential oil with respective EC₅₀: 0.850 mg/ml and 75.33 mg / ml.

The essential oil has a better anti-inflammatory effect than the aqueous extract. As against the methanolic extract proved inflammatory effect.

The aqueous extract, of *Chrysanthemum coronarium* L. flowerheads at a concentration of 8% did not show any toxicity signs.

Key words : *Chrysanthemum coronarium* L., Essential oil, phytochemical analysis, antimicrobial activity, DPPH, anti-inflammatory, toxicity.

الملخص

هذه الدراسة تهدف إلى توضيح الخصائص البيوكيميائية والآثار العلاجية لأزهار الأقحوان التاجي المعروف بالرزايمة (*Chrysanthemum coronarium* L.).

تم استخراج الزيوت العطرية لزهرة الأقحوان بنسبة 0.15% ، و من ثم تحليلها بواسطة الكروماتوغرافية الغازية المقرونة بطيف الكتلة (MS/GC). تم تحديد 57 مكون أي ما يقدر ب : 89.46 % ، أما المركبات الغالبة فهي :

(10)-Caren-4-ol, ester d'acide aceto-acetique, verbenyl acétate, 1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene), Santolina triène.

وقد سمحت التحاليل الفيتوكيميائية لهذه الأزهار بتحديد المركبات الفينولية ، والفلافونويد ، الفلافونول وقلويدات. كما أن التحليل النوعي كشف عن وجود الدباغ وعدم وجود الصابونين.

ان فعالية الزيوت العطرية و المستخلصات النباتية كمضادات للميكروبات قد تراوحت من سلالة ميكروبية إلى أخرى. معفعالية ملحوظة للزيوت العطرية ضد العسوية الرقيقة (*Bacillus subtilis*).

وقد أظهر المستخلص الكحولي قدرة عالية على تثبيت الجذور الحرة لجزيئات DPPH مقارنة بالزيوت العطرية. حيث قدرت فعاليتهما (EC50) ب : 0,850 ملغ/مل و 75.33 ملغ/مل على التوالي.

و من الضروري الإشارة إلى أن فعالية الزيوت العطرية كمضادات للالتهاب قد فاقت فعالية المستخلص المائي. وتجدر الإشارة أيضا إلى أن استعمال المستخلص الكحولي تسبب في حدوث التهابات.

وختاما فان المستخلص المائي لأزهار الأقحوان التاجي بتركيز 8% لم يظهر أي علامات للتسمم الحاد.

الكلمات المفتاح : الأقحوان التاجي، الزيوت العطرية، التحاليل الفيتوكيميائية، مضادات للميكروبات DPPH، مضادات للالتهاب، التسمم الحاد.

DEDICACES

« Le bonheur le plus doux est celui qu'on partage »

[Jacques Delille]

Je dédie ce travail, fruit des sacrifices et des privations à :

A mes très chères parents qui ont toujours fait de l'instruction une priorité dans mon éducation: Affables, honorables, aimables : vous représentez pour moi lesymbole de la bonté par excellence, la source de tendresse etl'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager etde prier pour moi.Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon très cher mari Yacine, toujours patient envers une « épouse étudiante » :Tes sacrifices, ton soutien moral, ta gentillesse sanségal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mesétudes.

A mon cher frère et chère sœur : les motsne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amouret l'affection que je porte pour vous. Mes fidèles compagnons dansles moments les plus délicats de cette vie mystérieuse.Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux debonheur, de santé et de réussite.

A tous les membres de la famille Benouaklil, Narsavidzé, Bengharnout et Pitchkorov petits et grands: Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de monaffection.

A mes chers amies et Collègues : au nom des souvenirs et detous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédiece travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Fatouma

REMERCIEMENTS

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

Docteur HAMAI M.S pour avoir accepté de diriger ce travail. Ses précieux conseils, son soutien morale, sa qualité d'écoute ainsi que sa confiance qui m'ont été inestimables et m'ont permis de mener cette recherche, dans les meilleures conditions.

Madame HAMAI F., co-promoteur de cette étude, pour avoir initié ce sujet. Les discussions scientifiques que j'ai eu avec elle, ses conseils durant mon parcours universitaire m'ont toujours été très fructueuses. Je suis très reconnaissante pour sa confiance à mon égard

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

Docteur KHALI M., Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce Jury. Ses conseils qui vont me permettre de finaliser ce travail. Je lui remercie également pour la qualité de son enseignement et pour la précision scientifique qu'il me transmettait durant mes études universitaires.

Professeur SAIDI F., pour l'honneur qu'elle me fait en faisant partie de ce jury. Je suis très reconnaissant pour son soutien, pour sa présence et pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la réalisation de cette étude. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Docteur CHAOUIA C. pour avoir accepté de juger ce travail. Je lui remercie pour sa sympathie et sa bienveillance et pour ces remarques pertinentes et ces discussions fructueuses qui vont enrichir ce travail. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude

Je ne peux passer sous silence l'aide précieuse de Mr Boudis et Mr Boutoumi. Je suis très reconnaissante pour leur sympathie et leur sens d'humanisme.

Je remercie également Mr Brahim al Rahmani et Melle Ghanay pour leur disponibilité et leur précieuse aide apportée en Statistique et en Histologie Végétale.

Je tiens tout particulièrement à remercier Mr Zaouani, responsable du laboratoire de Pharmacotoxicologie et Mr Snoussi responsable du laboratoire de recherche de Biotechnologie Végétale, de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires. Merci également à tous leurs effectifs pour l'aide qu'ils m'ont fourni.

Je pense, au terme de ce travail aux membres du corps pédagogique et aux ingénieurs de laboratoire toujours actifs à l'Université Saad Dahlab de Blida. Qui m'ont aidé à surmonter toutes les difficultés durant mon parcours.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
ABSTRACT	
الملخص	
DEDICACES	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
Liste des figures et des tableaux	
INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1.1. Intérêt des plantes médicinales.....	13
1.2. Phytothérapie.....	14
1.3. Plantes médicinales.....	14
1.4. Substances actives des plantes médicinales	17
1.5. Chrysanthèmes.....	26
1.6. Généralités sur les activités biologiques des plantes médicinales.....	30
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	34
2.1. Matériel végétal.....	34
2.2. Méthodologie.....	36
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	50
3.1. Etude macroscopique et microscopique.....	50
3.2. Résultats de l'étude phytochimique.....	60
3.3. Résultats des tests biologiques.....	72
DISCUSSION GENERALE.....	85
CONCLUSION.....	89
APPENDICE	
REFERENCES	

LISTE DES FIGURES ET DESTABLEAUX

Figure 1.1	Principales classes de flavonoïdes	22
Figure 1.2	<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	28
Figure 2.1	Stations de récolte des fleurs	34
Figure 2.2	Fleurs de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	35
Figure 2.3	Souris albinos	35
Figure 2.4	Clevenger	37
Figure 2.5	Soxhlet	38
Figure 2.6	Evaporateur rotatif	38
Figure 2.7	Couplage : chromatographe-spectromètre de masse	40
Figure 2. 8	Administration des solutions à tester par gavage	47
Figure 2.9	Injection de la carragénine dans la patte d'une souris	48
Figure 2.10	Souris sacrifiée avec pattes postérieures coupées	48
Figure 3.1	<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	50
Figure 3.2	Fleurons de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	51
Figure 3. 3	Involucre de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	51
Figure 3. 4	Section longitudinale du capitule de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	52
Figure 3.5	Fleuron ligulé de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L. sous loupe binoculaire	53
Figure 3.6	Fleuron tubulaire de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	54
Figure 3.7	Akènes de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	55
Figure 3.8	Coupe transversale de la racine	56
Figure 3.9	Coupe transversale de la tige	57
Figure 3.10	Canal excréteur de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L	57
Figure 3.11	Coupe transversale de la feuille	58
Figure 3.12	Glande sécrétrice sessile sur la surface des fleurons de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	59
Figure 3.13	Papilles sur la surface des fleurons ligulés de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	59

Figure 3.14	Papilles sur la surface des fleurons tubulaires de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	60
Figure 3.15	Teneur en eau	61
Figure 3.16	Profil chromatographique de l'huile essentielle des fleurs de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	64
Figure 3.17	Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénolique	70
Figure 3.18	Photo montrant l'activité de l'huile essentielle sur <i>Bacillus subtilis</i>	75
Figure 3.19	Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique	77
Figure 3.20	Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'huile essentielle	78
Figure 3.21	Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'acide gallique	79
Figure 3.22	Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de la Quercetine	79
Figure 3.23	Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'acide ascorbique	79
Figure 3.24	Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de la Rutine	79
Figure 3.25	Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'α tocophérol	79
Figure 3.26	Pourcentage de réduction de l'œdème par le Clofenac, l'huile essentielle et l'extrait méthanolique en fonction de la concentration	82
Figure 3.27	Pourcentage de réduction de l'œdème par l'extrait aqueux en fonction de la concentration	83
Tableau 1.1	Principales classes de composés phénoliques	20
Tableau 1.2	Activités biologiques des composés polyphénoliques	21
Tableau 3.1	Teneur en eau des fleurs de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	60
Tableau 3.2	Taux d'humidité de la poudre des fleurs de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	61
Tableau 3.3	Teneur en cendres des fleurs de <i>Chrysanthemum coronarium</i>	62

Tableau 3. 4	Rendement en huile essentielle des fleurs de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	62
Tableau 3.5	Rendement en fraction polaire et apolaire des fleurs de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	63
Tableau 3. 6	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	65
Tableau 3.7	Absorbance et les concentrations des composés phénoliques	70
Tableau 3.8	Teneur en flavonoïdes	71
Tableau 3. 9	Teneur en flavonols	71
Tableau 3.10	Résultats des tests antimicrobiens	73
Tableau 3.11	Interprétation des résultats des tests antimicrobiens	74
Tableau 3.12	EC50 des standards, de l'extrait méthanolique et l'huile essentielle	80
Tableau 3.13	Activité anti-inflammatoire	81

INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, les hommes ont toujours utilisé les plantes pour se nourrir, se parer et se soigner [1], leur utilisation a longtemps été guidée par la tradition. La phytothérapie renait aujourd'hui avec une approche plus scientifique. Elle se base sur des études, des analyses et des expérimentations [2].

Un grand nombre de plantes aromatiques, médicinales, épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes dont l'application s'étend à divers domaines telles que la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture.

L'évaluation des propriétés thérapeutiques des plantes, constitue une tâche très intéressante et utile, particulièrement pour les plantes d'une utilisation rare, moins fréquente ou non connue dans la médecine et les traditions médicinales. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs [3]. D'autant plus, que l'être humain se montre de plus en plus réticent à l'emploi des molécules chimiques. Il y a donc un réel besoin de trouver des méthodes alternatives. De ce fait, nous nous sommes intéressés au Chrysanthème à couronne, qui est une plante peu utilisée dans le monde de la phytothérapie.

A l'exception de quelques études sur son activité antifongique [4], insecticide [5], nématocide [6] et de ses propriétés nutritives comme espèce fourragère [7], *Chrysanthemum coronarium* L. est mal connue comme plante médicinale. Dans le cadre de valorisation de cette plante aromatique qui pousse en Algérie, nous avons entrepris un screening phytochimique de ces capitules afin de connaître ses principaux constituants, nous avons également entrepris une

étude des propriétés pharmacologiques de son huile essentielle et de ses principaux extraits.

Dans cette optique, notre travail a pour objectifs :

- L'étude macroscopique et microscopique de *Chrysanthemum coronarium*
- L'extraction d'une huile essentielle des capitules du Chrysanthème à couronne et la détermination de sa composition chimique par CG-MS
- L'extraction des fractions polaire et apolaire des capitules du Chrysanthème à couronne par soxhlet.
- Le dosage de certains métabolites secondaires contenus dans les fleurs tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les flavonols, les alcaloïdes et les saponines.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux par diffusion sur gélose.
- L'étude de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH.
- L'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle, de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux.
- Le test de toxicité de l'extrait aqueux des capitules du Chrysanthème à couronne.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Intérêt des plantes médicinales

Les plantes ont toujours constitué un réservoir important par leur utilisation en tant que médicaments. Ces derniers, à base de plantes, sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Les industries pharmaceutiques se sont de plus en plus intéressées aux enquêtes ethnobotaniques des plantes. L'Afrique dispose d'une diversité importante de plantes médicinales qui constituent de précieuses ressources pour la majorité des populations rurales où plus de 80% de ces dernières s'en sert pour assurer les soins de santé [8 ; 9].

Chaque civilisation a tissé avec les plantes des rapports bien spécifiques. Les plantes ont occupé une place de choix et ont été, pour les hommes, un point de contact privilégié avec la nature et la santé. Entre les pratiques empiriques et les pratiques scientifiques, les découvertes thérapeutiques des plantes médicinales et les données de la phyto-pharmacopée moderne confirment, souvent, les effets que la sagesse populaire prescrivait déjà comme remèdes [10].

On estime à 20 000 le nombre d'espèces de plantes utilisées dans le monde pour des fins alimentaires, cosmétiques, chimiques, pharmaceutiques, thérapeutiques et agro-alimentaires [11].

1.2. Phytothérapie

1.2.1. Popularité et histoire de la phytothérapie

Depuis la préhistoire, nos ancêtres ont accumulé des connaissances sur les plantes médicinales. Ces connaissances continuent de s'accroître aujourd'hui dans les régions du monde où les cultures indigènes ont échappé à l'influence destructrice de la société moderne [12]. La phytothérapie moderne est fondée sur de nombreuses expériences ainsi que sur des connaissances dont les origines remontent à plusieurs millénaires. Les civilisations anciennes telles que l'Égypte ancienne, les grecs et les romains se sont transmis ce savoir. Nous en avons hérité grâce aux écrits des érudits arabes et perses [13].

1.2.2. Phytothérapie

Étymologiquement, le terme phytothérapie vient de deux mots grecs : Phyton (plante) et Therapeuein (soigner) [14].

La phytothérapie est une médecine par les plantes [15]. C'est l'ensemble des soins thérapeutiques faisant directement appel aux drogues d'origine végétale. Les matériaux végétaux peuvent être employés sous leur forme la plus simple (infusions simples ou composées) ou sous la forme de préparations galéniques (teintures, extraits, onguents) [16].

La phytothérapie n'est possible que si sa pratique est fonction d'une parfaite connaissance des plantes ainsi que de leurs mécanismes d'action. Elle n'est ni toxique, ni iatrogène, si elle est pratiquée dans des conditions rigoureuses, excluant toute improvisation et demandant un enseignement précis [17].

1.3. Plantes médicinales

Une plante dite « médicinale » est une plante qui se caractérise par des propriétés thérapeutiques [18], renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies [19].

1.3.1. Récolte et conservation des plantes

L'action des plantes médicinales dépend de la période et du moment de leur récolte, de leur séchage ainsi que de leur conservation. L'époque de la collecte, dans la nature ou dans une culture, est déterminée par la teneur de la plante en matière actives au cours de son cycle végétatif [16]. Il est essentiel qu'elle conserve le maximum de ses principes actifs [20].

La cueillette doit se faire préférentiellement par temps sec après le lever du soleil et après la disparition de la rosée. Il faut que les fleurs soient cueillies avant leur complet épanouissement [20 ; 21].

Pour une conservation optimale de la plante, il faut qu'elle soit débarrassée de toutes les parties mortes [21]. Le séchage et la conservation doivent se faire dans un endroit approprié c'est-à-dire sombre, abrité et bien aéré. La température ne doit pas dépasser les 37 °C [22].

1.3.2. Préparation des plantes

Certaines plantes renfermant toute une gamme de métabolites actifs peuvent avoir des effets très différents en fonction de leur mode de préparation [19]. Ainsi, les plantes peuvent être préparées en infusion, en décoction, en macération, en poudre, en cataplasme et en teinture.

1.3.3.1. Infusion

Selon POLETTI [23] et RAYNAUD [24] l'extraction des principes actifs se fait dans de l'eau préalablement bouillie ou très chaude pendant dix à quinze minutes.

L'infusion s'utilise pour les substances fragiles pouvant être détruites par une température trop prolongée ou éliminées par la vapeur [25].

1.3.3.2. Décoction

Cette méthode s'applique essentiellement aux parties souterraines de la plante (racines), ainsi qu'à l'écorce car ces structures libèrent difficilement leurs principes actifs lors d'une infusion [22].

Cette préparation s'opère en versant dans l'eau froide une quantité déterminée de drogue et en laissant bouillir l'ensemble durant un certain temps [23].

1.3.3.3. Macération

Le principe de la macération est de laisser la plante au contact de l'eau froide pendant quelques heures, voire quelques jours, cette méthode permet l'obtention d'une solution plus concentrée [26].

Elle est employée surtout pour des substances trop facilement transformables par la chaleur [25], et également pour éviter d'extraire les tanins [24].

1.3.3.4. Poudre

On obtient cette préparation en pilant au mortier une certaine quantité de drogue desséchée. La poudre obtenue sera dissoute dans un liquide ou mélangée avec certains aliments tels que le miel et la confiture. Parfois ces poudres sont comprimées dans des moules spéciaux d'où leur nom pharmaceutique de « comprimés » [23].

1.3.3.5. Teinture

Les teintures présentent deux avantages majeurs: leur conservation qui peut s'étendre à une durée de trois années et l'absorption rapide par l'organisme de leurs principes actifs [22]. La teinture est obtenue en laissant les plantes macérer dans de l'alcool puis en pressant et en filtrant le mélange. On obtient ainsi un produit commode et très actif [27].

1.3.3.6. Cataplasme

Il se constitue d'une bouillie assez épaisse que l'on dispose entre deux linges et que l'on applique sur la peau à l'endroit voulu. Le cataplasme produit des actions déterminées : révulsive, circulatoire et adoucissante [25].

1.4. Substances actives des plantes médicinales

Les plantes dans leur globalité produisent une grande variété de métabolites secondaires ayant de nombreuses activités biologiques, telles que la protection contre les herbivores, les microbes, les plantes concurrentes, l'adaptation et la pollinisation [28]. Ces métabolites sont classés en plusieurs groupes dont les plus importants sont :

1.4.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux [29].

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le monde végétal. Elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles [30 ; 31].

Elles peuvent se rencontrer dans toutes les parties vivantes de la plante comme les sommités fleuries, les rhizomes, les racines, les graines, les fruits, les fleurs, les feuilles, les écorces et le bois. Dans une même plante, ces huiles peuvent se retrouver à la fois dans différentes organes mais la composition chimique varie d'un organe à un autre [32 ; 31].

Les huiles essentielles sont rejetées par les plantes sous forme de vapeur. Ces dernières possèdent de multiples fonctions dans la nature. En effet, il a été établi qu'elles interviennent dans les interactions « végétaux-animaux » et elles constituent un moyen de communication (langage chimique) [33]. En effet, certaines essences favorisent la pollinisation en attirant les insectes et certaines servent à la défense des plantes contre les prédateurs (herbivores, insectes et micro-organismes) [34]. D'autres essences protègent les cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons [30]. Selon EI ABED et KAMBOUCHE [31], Il existe également des essences qui libèrent une variété de goût et d'odeur dans l'atmosphère, elles sont employées comme saveurs et condiments en cuisine.

1.4.1.1. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est généralement très complexe par le nombre élevé de constituants présents et surtout par la diversité considérable de leurs structures [31].

Les principaux composants des huiles essentielles sont regroupés en grandes familles :

- Esters

Ils agissent directement sur le système nerveux central, possèdent une action équilibrante et apaisante. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires et de régénération des cellules.

- Phénols

Ils se caractérisent par leurs effets antiseptiques et bactéricides, protégeant ainsi l'organisme des contaminations. Ces composants sont très irritants pour la peau et les muqueuses.

- Aldéhydes

Ils ont une action relaxante et calmante, et sont aussi anti-inflammatoires. Ils donnent un parfum d'agrumes à certaines huiles.

- Cétones

Ils ont une action relaxante et sédative et possèdent des propriétés cicatrisantes. Ils permettent aussi l'élimination du mucus.

- Alcools

Ils font partie des molécules les plus bénéfiques contenues dans les huiles essentielles en raison de leurs propriétés antiseptiques, antivirales et analgésiques. Ils sont également immunostimulants.

- Terpènes

Très répandus dans l'ensemble des huiles essentielles, ils ont une action stimulante et tonique. Certains ont des propriétés antivirales, même à très basse concentration.

- Acides

Ils sont présents en petites quantités, mais dotés d'une action puissante. Ils sont anti-inflammatoires et sédatifs.

- Sesquiterpènes

Ils ont une action équilibrante pour le système immunitaire et possèdent des propriétés antivirales [35].

1.4.1.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir de la matière végétale se fait par différents procédés tels que la distillation, l'enfleurage et l'expression. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétal [31].

- Distillation

C'est la méthode la plus usuellement utilisée. Le principe consiste à vaporiser un liquide (eau, solvant organique) qui entrainera avec lui les substances volatiles. Les vapeurs ainsi formées sont condensées par un système de réfrigération par courant d'eau froide et seront ensuite récupérées [31].

- Enfleurage

Cette opération très ancienne concerne l'extraction des parfums des fleurs par contact avec une matière grasse. Elle se base sur la forte affinité que présentent généralement les molécules odorantes pour les huiles et les graisses [36].

- Expression

C'est un mode opératoire qui consiste à extraire les huiles essentielles de l'épiderme de certains fruits, en les soumettant à de fortes pressions, à chaud ou à froid, à la main ou mécaniquement [31].

1.4.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques forment une grande famille de composés chimiques très divers allant des simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes (Tableau 1.1) tels que les tanins, la lignine et les flavonoïdes [37]. Ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [38].

Tableau 1. 1: Principales classes de composés phénoliques [38]

Squelette carboné	Classe	Exemple
C_6	Phénols simples	Catéchol
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféique Scopolétine
C_6-C_4	Naphtoquinones	Juglone
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes	Resvératrol
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine Daidzéine
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	Pinorézinol
$(C_6-C_3)_n$	Lignines	
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés	

Les composés phénoliques sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature constituant ainsi des éléments dont la présence est considérable dans l'alimentation animale. A titre d'exemple, l'homme consomme

jusqu'à 10g de ces composés par jour [3]. Ces substances possèdent certaines activités rapportées dans le Tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Activités biologiques des composés polyphénoliques

Polyphenols	Activités	Auteurs
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes	[39]
	Antifongiques	[40]
	Antioxydantes	[41]
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses	[42]
Flavonoïdes	Antitumorales	[43]
	Anticarcinogènes	[44]
	Anti-inflammatoires	[45]
	Hypotenseurs et diurétiques	[46]
	Antioxydantes	[47]
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux	[46]
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène	[48]
	Antioxydantes	[49 ; 50]
	Antitumorales	[51]
	Antifongiques	[52]
	Anti-inflammatoires	[53]
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes	[54 ;55]

1.4.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent l'une des familles les plus omniprésentes. La présence de ces flavonoïdes contribue à la coloration jaune des fleurs [56].

L'ensemble des flavonoïdes est de structure générale C₁₅ (C₆-C₃-C₆) [37 ; 57 ; 38]. Cet ensemble comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules dont

certaines ont une très grande importance biologique et technologique [38] (Figure 1.1).

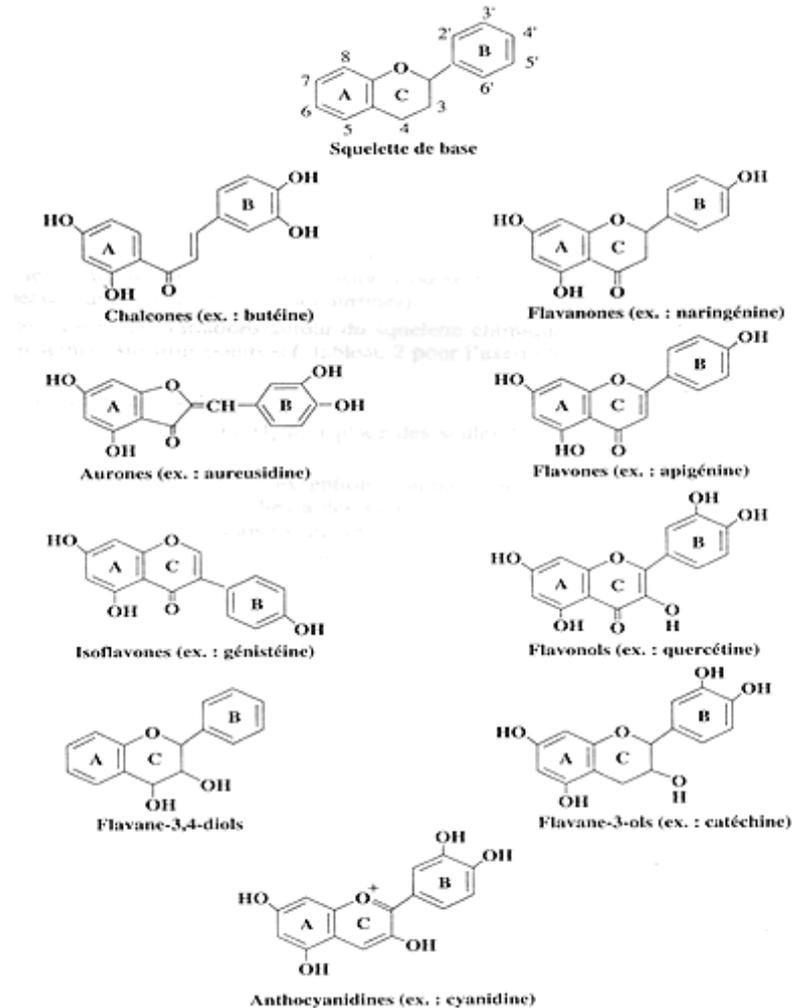


Figure 1.1 : Les principales classes de flavonoïdes [38]

Les flavonoïdes se répartissent en sous-groupes :

- Les mono et biflavonoïdes qui ont une action vitaminique B, ce sont des protecteurs vasculaires. Ils agissent sur la cellule hépatique : ce sont des activateurs hépato-cellulaires. Leurs principales propriétés sont diurétiques et inhibitrices de la per-oxydation des lipides en empêchant les graisses de l'organisme de s'abimer ; ils possèdent également une action inhibitrice du catabolisme des protéoglycanes (substances au niveau articulaire).
- Les isoflavonoïdes qui ont une action anti-tumorale.

A partir de ces sous-groupes on peut trouver des dérivés flavonoliques et des anthocyanes :

Dérivés flavonoliques

- Les rutosides : ce sont d'excellents protecteurs vasculaires, mais en quantité importante, ils constituent un inconvénient.
- Les lespécaposides : ils ont une action diurétique et azotémique ; ils agissent sur l'acide urique, les crises de goutte, les rhumatismes inflammatoires, l'excès d'azote. Ils sont contenus dans les parties aériennes des plantes et les bourgeons floraux.
- Les silymarines : ce sont d'excellents protecteurs hépatiques (contre les intoxications) ; ils limitent l'empoisonnement des cellules hépatiques par la chimiothérapie.
- Les flavanones : ce sont des protecteurs vasculaires.
- Les scoparosides : ils ont une action diurétique.

Anthocyanes

Les anthocyanes sont responsables de la couleur bleue de certaines fleurs. Elles ont une action anti-inflammatoire, et selon les familles de plantes, elles possèdent des propriétés anti-diarrhéiques, anti-bacillaire, antidiabétique, cholagogue, spasmolytique, tonique, dépurative, astringente. A forte dose les anthocyanes peuvent être toxiques [58].

1.4.4. Tanins

Les tanins sont des substances constituées par un mélange de glucoside et d'acide gallique [59]. Ils sont classés en deux catégories :

- Les tanins hydrolysables (ou « pyrogalliques »), répartis en gallotanins, et ellagitanins
- Les tanins condensés (ou « catéchiques ») [56].

Ces substances hydrosolubles de composition chimique variable présentent un caractère commun ; celui de coaguler les albumines, les métaux

lourds et les alcaloïdes. Leur intérêt médicinal réside essentiellement dans leur caractère astringent : leur propriété de coaguler les albumines des muqueuses et des tissus, crée ainsi une couche isolante et protectrice, ayant pour effet de réduire l'irritabilité et la douleur, et d'arrêter les petits saignements.

Les décoctions et les autres préparations à base de drogues riches en tanins sont employées le plus souvent en usage externe contre les inflammations de la cavité buccale, les catarrhes, la bronchite, les hémorragies locales, sur les brûlures et les engelures, les plaies, les inflammations dermiques, les hémorroïdes et la transpiration excessive.

En usage interne, elles sont utilisées en cas de catarrhe intestinal, de diarrhée, d'affections de la vésicule, ainsi, comme antidote (contre-poison) lors d'empoisonnement par des alcaloïdes végétaux [16].

1.4.5. Alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, doué de propriétés pharmacologiques marquées [60].

Ils sont présents en quantité importante au moment de la floraison ou juste au début de celle-ci. Les alcaloïdes se rencontrent dans toutes les parties de la plante, mais peuvent prédominer dans les feuilles, les graines, l'écorce ou dans les rhizomes [59].

D'une façon générale, l'alcaloïde pur peut être extrait de la plante par des solvants chimiques, tandis que les alcaloïdes-sels sont facilement extraits grâce à leur solubilité dans l'eau.

Les alcaloïdes se conservent généralement bien dans les plantes séchées et sont responsables de la toxicité de certaines drogues. Peu d'alcaloïdes agissent sur le cœur, mais quelques-uns sont employés pour augmenter ou abaisser la pression sanguine, car leur action physiologique sur le système nerveux central

s'exerce sur la circulation et sur la respiration, comme dépresseur ou comme excitant.

L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action anti-spasmodique et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique.

Il existe certains alcaloïdes d'origine tropicale (quinine), qui agissent comme antiparasitaires ou comme chimiothérapeutiques.

D'une façon générale les alcaloïdes sont amers et utilisés comme apéritifs[19]. On les emploie également comme antalgiques, antitussifs et laxatifs [13].

1.4.6. Glucosides

Les glucosides sont des produits résultants du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont constitués de deux fractions, l'une, le plus souvent inactive contient un sucre tel que le glucose, cependant elle exerce un effet favorable sur la solubilité du glucoside et son absorption, voire son transport vers tel ou tel organe. L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde fraction qui est la plus active, dénommée aglycone (ou aglucone) [16].

Selon leur composition chimique et leurs actions physiologiques, les glucosides se répartissent en plusieurs groupes :

- Les glucosides sulfurés qui ont une action irritante sur la peau [61].
- Les glucosides dérivés de l'acide cyanhydrique, formés par un composé cyanhydrique lié à un sucre. L'action enzymatique les décompose (souvent dans la salive humaine) en acide cyanhydrique libre, qui est un poison.
- Les glucosides anthraquinoniques constituent le plus souvent des pigments cristallins, facilement labiles. Ils ont une action laxative 6-8 heures après leur absorption.
- Les glucosides phénoliques appartiennent à un groupe de substances qui dégagent un arôme très caractéristique. On les classe à ce titre parmi les substances aromatiques.

- Les cardioglucosides sont des substances très importantes par leur action sur la régulation de l'activité cardiaque à des doses infinitésimales. Selon leur structure chimique, on distingue les cardénolides et les bufadiénols.
- Les saponines sont très communes dans les plantes médicinales. Elles se caractérisent par leurs propriétés moussantes constituant ainsi d'excellents émulsifiants. Certaines saponines possèdent la caractéristique d'hémolyser les globules rouges, expliquant ainsi l'effet toxique de certaines d'entre elles, qui les rend inconsommables. Par contre, d'autres irritent les muqueuses, provoquent un relâchement intestinal, augmentent les sécrétions muqueuses bronchiales. Elles sont également employées comme diurétiques et désinfectantes des voies urinaires [16].

1.5. Chrysanthèmes

Chrysanthemum : Gr : *Chrysos* ; or, *Anthemios* ; fleur [62].

C'est des herbes à feuilles divisées en lanières étroites, un peu charnues, capitules à fleurs centrales jaunes et à grandes ligules jaunes, blanches, oranges ou pourprés. Elles sont fréquentes dans les régions sub-désertiques mais pénétrant peu dans le Sahara proprement dit [63].

Les chrysanthèmes, dont il existe une multitude de variétés, sont certes très appréciés en tant que fleurs de jardins mais également par leurs propriétés thérapeutiques. Le chrysanthème est diurétique, antiseptique et fébrifuge et doit également faire baisser la pression artérielle. De plus, une infusion de feuilles du chrysanthème à une action bénéfique sur les yeux fatigués [64].

Parmi les Chrysanthèmes les plus utilisés en phytothérapie, nous avons :

- *Chrysanthemum morifolium*

Plus connu sous le nom de chrysanthème des fleuristes, Il est apprécié en Occident pour ses qualités ornementales. En Chine, c'est une plante médicinale commune, couramment consommée sous forme de tisane rafraîchissante. Il est utilisé pour améliorer la vision et décongestionner les yeux irrités, pour soulager les maux de tête et lutter contre le rhume, la grippe ainsi que l'hypertension artérielle [65].

- *Chrysanthemum cinerariaefolium*

Il est connu sous le nom de pyrèthre de Dalmatie. Les capitules sont riches en pyréthrine connue pour leur toxicité envers les bovins et les ovins. Ces derniers agissent comme des poisons neuromusculaires.

Le pyrèthre de Dalmatie a longtemps été utilisé comme insecticide puissant, commercialisé à grand échelle. Cependant, il est précieux pour l'homme par son aptitude à éliminer les vers parasites, ainsi que les parasites cutanés [66].

- *Chrysanthemum indicum*

Chrysanthemum indicum est une plante herbacée appartenant à la famille des Composées. Il est largement cultivé en Chine et en Corée. Les fleurs et les bourgeons de *C. indicum* ont été traditionnellement utilisés pour traiter divers troubles liés au système immunitaire, aux symptômes d'hypertension et dans plusieurs maladies infectieuses comme la pneumonie, la colite, stomatite, anthrax et la fièvre [67].

1.5.1. *Chrysanthemum coronarium* L.

1.5.1.1 Description de la plante

C'est une plante annuelle [68], dont la taille varie entre 20-80 cm pouvant parfois atteindre 100 cm. C'est un herbacé, nu ou plus ou moins velu dégageant une forte odeur. Les tiges érigées sont très ramifiées et très feuillées. Les

feuilles de *C. coronarium* L. sont alternées, sessiles et allongées, généralement bipennées à lobes pointus. Les capitules sont de 3-6 cm, isolés, et présentent des pédoncules épaissis en massue à l'extrémité [69]. Les fleurs sont tubulaires et ligulées, de couleur jaune. Les bractées sont ovoïdes. Il existe une autre variété qui se caractérise par des fleurs ligulées jaunes pâles et jaunes plus foncés dans le fond (var. discolor 1895a) [70 ; 71 ; 72].



Figure 1.2: *chrysanthemum coronarium* L. [73]

1.5.1.2. Habitat et répartition géographique

C'est une plante qui pousse dans des terres cultivées ou en jachères, occupant souvent de grandes surfaces, elle est également cultivée dans les jardins [70].

On la rencontre dans le Bassin méditerranéen [70], elle est également cultivée en Chine et au Japon [74].

1.5.1.3. Classification taxonomique

Selon JUDD et *al.*, [75], SPICHIGER [76], KOWAL [77] et MULEY et *al.*, [78], la classification taxonomique de *Chrysanthemum coronarium* L. est la suivante :

Règne : *Plantae*
 Sous-règne : *Tracheobionta*
 Division : Magnoliophyta
 Classe : Magnoliopsida
 Sous-classe : Asteridae
 Ordre : Asterales
 Famille : Asteraceae
 Tribu : Anthemideae
 Sous-famille : Asteroideae
 Genre : *Chrysanthemum*
 Espèce : *Chrysanthemum coronarium* L.

1.5.1.4. Synonymes botaniques

Chrysanthemum spatiosum L.H. Bailey
Matricaria coronaria (L.) DESR
Pinardia coronaria Lessing [79]
Xanthophthalmum coronarium (L.) [74]

1.5.1.5. Noms communs

Français : Chrysanthème à couronne, Chrysanthème des jardins, chopsuy.
 Anglais: Grown daisy, cooking chrysanthemum, garland chrysanthemum, garland, garland daisy, edible chrysanthemum, chop suey greens.
 Arabe : Mourara, Rezaïma.
 Russe : Chrizantheme uentschannaja [74 ; 80 ; 81 ; 82].

1.5.1.5 Utilisation médicinale traditionnelle

Selon ROBERTS [73], l'infusion des feuilles et des fleurs possède un pouvoir légèrement diurétique, elle est utilisée dans les cas de cystite et de rétention d'eau. Une macération à base de fleurs et de quelques feuilles à une action sur la peau grasse ainsi que sur les taches de la peau. En raison de ses propriétés toniques, le chrysanthème à couronne est très utilisé en Chine. De par sa richesse en sels minéraux, acides aminés et vitamines A, D et E, il purifie le

sang, les reins et pallie les effets du froid, comme cela a été confirmé par les travaux d'ALLIMUTHU et VENNILA [83] en le décrivant comme antipyrétique.

Ainsi d'après CHOOI ONG [79], la décoction de cette plante est utilisée pour ses propriétés expectorantes des voix respiratoires et pour ses propriétés stomachiques en stimulant la digestion.

1.6. Généralités sur les activités biologiques des plantes médicinales

1.6.1 Activité antimicrobienne

Il est certain que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes. Chaque année, un à trois antibiotiques sont mis sur le marché [84] car chaque antibiotique a une durée de vie effective limitée au bout de laquelle les microorganismes développent des résistances [85 ; 86]. Selon COWAN [87], les agents antimicrobiens d'origine végétale ont leur place dans l'arsenal de médicaments prescrits par les cliniciens.

Certains extraits et huiles essentielles de plantes ont montré leur efficacité pour le contrôle de la croissance d'une grande variété de micro-organismes, y compris celle des champignons filamenteux, des levures et des bactéries. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est rattachée à certains constituants reconnus comme antiseptiques tels que le thymol, phénol, carvacrol [17].

L'ensemble des travaux sur les plantes médicinales préconise leur usage chez l'homme et les animaux, ainsi que dans les industries alimentaires [88].

1.6.1.2. Aromatogramme

Il s'agit d'un antibiogramme réalisé avec des huiles essentielles [89], c'est un examen de laboratoire simple qui permet d'étudier in vitro d'une façon précise le pouvoir bactéricide des essences de plantes aromatiques sur des germes microbiens [17].

1.6.2. Activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. De nombreux travaux ont été réalisés dans le domaine de l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir des plantes médicinales et des produits agroalimentaires [90 ; 91 ; 92 ; 93].

1.6.2.1. Radicaux libres

Un radical libre est le produit des réactions d'oxydation du métabolisme cellulaire. Hyperactif chimiquement [94], cette espèce chimique (atome ou molécule) contient un électron non apparié [95]. Elle est comparée à un déchet toxique qu'il faut recycler en permanence pour éviter les effets néfastes [96].

1.6.2.2. Source des radicaux libres

La première source des radicaux libres provient de l'activité cellulaire pour l'apport de l'énergie : chaque fois que nos cellules utilisent de l'oxygène, des radicaux libres se forment. Ils sont aussi produits au cours des inflammations, du stress chronique et ils augmentent lorsque le glucose sanguin est trop élevé.

La deuxième source des radicaux libres est externe. Des radicaux libres apparaissent lorsqu'on s'expose au soleil, lorsqu'on fume ou par la consommation des légumes traités avec des pesticides [96].

1.6.2.3. Conséquences de la présence des radicaux libres

Les radicaux libres sont extrêmement réactifs et capables d'altérer de nombreuses molécules telles que les acides nucléiques, les protéines et les lipides [97]. Ils favorisent l'apparition de certaines maladies dont la fréquence augmente avec l'âge : le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, la cataracte, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer [98].

1.6.2.4. Antioxydants

Un antioxydant est une substance qui s'oppose à l'effet dévastateur des radicaux libres [99], il se définit comme une substance qui, présente à faible concentration par rapport à la cible oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de cette cible [95].

Les antioxydants se retrouvent entre autre dans les aliments qui contiennent de la vitamine E, du zinc, sélénium, cuivre et manganèse. Les caroténoïdes et les flavonoïdes que nous retrouvons dans les légumes constituent de très bons antioxydants [100]. Selon CAUSSE [96], on les rencontre également dans les terpènes des épices et des aromates.

1.6.3. Activité anti-inflammatoire

1.6.3.2. Inflammation

A la grande variété des agressions (traumatisme mécanique, nécrose cellulaire et infection) qu'ils peuvent subir, les tissus répondent presque toujours par l'inflammation. Le but de cette réaction est de détruire (ou de contenir) l'agent responsable du dommage, d'initier les processus de réparation et de rendre au tissu lésé sa fonction initiale [101].

Les signes classiques d'une inflammation sont : une rougeur, une chaleur, une douleur, un gonflement et une altération de la fonction [102].

1.6.3.3. Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui antagonisent les processus inflammatoires [103]. Ils appartiennent à des classes chimiques différentes les unes des autres [104].

Certains flavonoïdes inhibent la synthèse des prostaglandines, cette action leur confère une activité anti-inflammatoire. Les tanins catéchiques possèdent la propriété de diminuer la perméabilité capillaire, ce qui leur confère une activité anti-inflammatoire [105].

1.6.4. Test de toxicité

Des substances végétales et leurs extraits sont soumis à des tests de toxicité aigue et chronique afin qu'ils soient consommés en toute sécurité par l'homme. Ces tests permettent également de déterminer la limite supérieure d'administration. Avant d'incorporer une plante dans une cure médicale, il est important de démontrer qu'elle n'est pas toxique et dénuée de tout effet secondaire indésirable [106]. Le médicament est habituellement administré en premier lieu à des animaux de laboratoire pour contrôler les effets toxiques qui pourraient se manifester [107].

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal

Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium*L. ont été récoltées dans le périmètre agricole de la ville de Soumaa (Figure 2.1) au cours de la période allant de Mars à Mai 2009 ; cette période coïncide avec la pleine floraison.



Figure 2.1 : Vues d'un champ de *Chrysanthemum coronarium* L. en pleine floraison
(Original, 2009)

La plante a été identifiée selon les clés de détermination de QUEZEL et SANTA [81] et de BLAMEY et GREY-WILSON [71]. Cette identification a été confirmée au niveau du département d'Agronomie de l'université de Blida ainsi qu'au niveau du Département de Botanique de l'Institut National des Sciences Agronomiques- El Harrach (Alger).

Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* ont été séchées à l'air libre pendant une semaine à l'abri de la lumière et de l'humidité, puis conservées dans des sacs en papier jusqu'à leur utilisation. (Figure 2.2).



(a) Fleurs fraîches

(b) Fleurs sèches

Figure 2.2: Fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L. (Original, 2009)

2.1.2 Matériel animal

Pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire et de la toxicité aiguë, nous avons utilisé des souris Albinos NMRI fournies gracieusement par l'animalerie du centre de recherche et de développement de SAIDAL. Le poids de ces souris varie entre 20 et 30 g. Les souris utilisées pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire sont de sexe mâle, concernant le test de toxicité, les souris sont de sexe différent (Annexe B).

2.1.3. Matériel bactériologique

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur onze microorganismes différents choisis pour la plupart pour leur fréquence élevée d'être responsables de la contamination des denrées alimentaires ainsi que pour leur pathogénicité :

- Les bactéries Gram positif : *Micrococcus luteus* ATCC 533, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* C.203.S, *Bacillus subtilis* ATCC 9372.

- Les bactéries Gram négatif : *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Les champignons : *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*.

Ces souches ont été obtenues auprès du laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche et de Développement de SAIDAL (Alger).

2.2. Méthodologie

2.2.1. Etude macroscopique et microscopique de *Chrysanthemum coronarium* L.

Pour les études morphologiques et anatomiques; nous avons mené des examens macroscopiques de la plante et des examens microscopiques de la tige, de la racine et de la feuille.

2.2.1.1. Examen macroscopique

Dans l'examen macroscopique on s'est intéressé à toutes les parties de la plante, et plus précisément à la fleur. Pour cela, nous avons réalisé une dissection de la fleur du Chrysanthème à couronne, afin de repérer les différentes "pièces florales".

2.2.1.2. Examen microscopique

Pour l'étude de la structure des différentes parties de la plante dans le but de localiser les sites sécréteurs des huiles essentielles, nous avons réalisé des coupes histologiques.

La confection des coupes histologiques au niveau de la racine, la tige et la feuille, s'est faite en se basant sur le protocole de la double coloration. Ce protocole comporte les étapes suivantes :

- Des coupes transversales très minces ont été confectionnées avec une lame de rasoir.

- Ces coupes ont été plongées dans l'hypochlorite de sodium à 12° durant 15 minutes pour vider les cellules de leurs contenus.
- Après un rinçage à l'eau courante (20 min), les coupes sont traitées à l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 min afin de faciliter la diffusion des colorants.
- Elles ont été ensuite lavées à l'eau 10 à 20 min et placées dans le vert de méthyle pendant 5 à 10 min.
- Après rinçage à l'eau courante 10 à 20 min, les coupes ont été plongées dans le rouge Congo pendant 10 min.
- Après lavage à l'eau courante, elles ont été montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique aux grossissements Gx40 et Gx100.

2.2.2. Extraction

2.2.2.1. Extraction des huiles essentielles

Les huiles ont été obtenues par hydrodistillation [108] des fleurs sèches à l'aide d'un distillateur de type Clevenger pendant 4 h (Figure 2.4). Elles ont été conservées au froid dans une bouteille sombre avant leur utilisation pour les différents tests.

Le rendement en huile essentielle évalué à partir de trois échantillons de 120 g, a été déterminé par rapport à la matière sèche.



Figure 2.4 : Clevenger [109]

2.2.2.2. Extraction des fractions non volatiles polaires et apolaires

Après broyage des fleurs séchées, nous avons procédé à l'extraction au soxhlet (Figure 2.5). Le solvant utilisé est l'éther de pétrole pour la fraction apolaire et le méthanol pour la fraction polaire.

Dans le soxhlet, nous avons introduit une cartouche contenant 40 grammes d'échantillon. Ensuite nous avons introduit 400 ml d'éther de pétrole dans un ballon chauffé.

L'extraction s'est poursuivie jusqu'à épuisement de la matière végétale (une douzaine de siphonage).

Une fois l'opération terminée, la cartouche est enlevée de l'appareil à l'aide d'une pince. Après séchage de la poudre végétale, nous avons répété la même opération mais en utilisant le méthanol.

Les extraits ainsi obtenus sont filtrés et concentrés à l'évaporateur rotatif (Figure 2.6).



Figure 2.5 : Soxhlet
(Original, 2009)



Figure 2. 6: Evaporateur rotatif
(Original, 2009)

2.2.3. Etude phytochimique

Le screening phytochimique des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L. a été réalisé dans le laboratoire de recherche de Biologie Végétale du département

de Biologie, au niveau du laboratoire de recherche de Biotechnologie Végétale du département d'Agronomie (Université Saad Dahleb), ainsi que dans le laboratoire analytique du centre de recherche et de développement(CRD) Boumerdès.

Pour la caractérisation du contenu des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L. nous avons réalisé plusieurs analyses, la majorité des analyses ont été répétées trois fois.

2.2.3.1.Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée en plaçant trois échantillons de fleurs fraîches de poids déterminé dans une étuve portée à 70°C.

Les échantillons ont été pesés, à des intervalles de temps réguliers, jusqu'à l'obtention de poids constants [110].

2.2.3.2.Détermination du taux d'humidité

Une prise d'essai P_i de 2 g de fleurs sèches en poudre a été exactement pesée dans une capsule que l'on a placée dans une étuve à 105°C jusqu'à obtention de poids constant. Soit P_s le poids de la prise d'essai ainsi séchée à l'étuve [111].

Le taux d'humidité est :

$$TH = (P_i - P_s)/P_i \times 100$$

2.2.3.3.Cendres totales

Le principe consiste à évaluer la quantité de substances résiduelles non volatilisées lorsque la drogue est complètement calcinée.

Afin de minéraliser la poudre des fleurs sèches de *Chrysanthemum coronarium*, nous avons utilisé la méthode de PINTA [112]

- la poudre végétale finement broyée est homogénéisée puis séchée pendant 16 heures à une température comprise entre 70-80°C.
- 2 g d'échantillon ont été pesés en capsule de platine.

- la capsule est déposée au four, puis exposée à une température graduelle jusqu'à atteindre 450°C en un temps de deux heures, cette température est maintenue ensuite pendant deux autres heures.

Le pourcentage des cendres totales est calculé par la formule suivante :

$$\text{Cendres totales\%} = (\text{Masse des cendres}) / (\text{Masse du produit essai}) \times 100$$

Masse des cendres = Masse Totale après calcination – Tare

Masse produit essai = Masse Totale avant calcination – Tare [113]

2.2.3.4. Analyse des huiles essentielles par CG/SM

L'analyse des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Le couplage a été effectué entre un chromatographe de type « HP-6890 sériel » et un spectromètre de masse « 5973 N MS, ionisation par impact électronique » (Figure 2.7).



Figure 2.7 : Couplage : chromatographe-spectromètre de masse

Cette analyse a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Injection manuelle (mode Split)
- Température : 240°C
- Colonne HP-5 (5% phenyl methyl siloxane) de 30mm de longueur et 0.32 mm de diamètre, l'épaisseur de film 0.25 µm avec une pression : 1bars.

Programmation de la température du four :

- $T_i = 40^\circ\text{C}$.
- Une pente de $4^\circ\text{C}/\text{min}$ jusqu'à $T_f = 220^\circ\text{C}$.

2.2.3.5. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ont été déterminés en utilisant le réactif de Folin Ciocaltheu selon la méthode de KAHKONEN et *al.*, [114] et MOHD-ESA et *al.*, [115].

Nous avons mélangé 0,2 ml de l'extrait méthanolique (1mg/ml) avec 1ml du réactif de Folin Ciocaltheu dilué au 1/10, puis additionné à 0,8 ml de solution de Bicarbonate de Sodium à 7,5%. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesuré à 765 nm, en utilisant un Spectrophotomètre UV-Visible (WPA Lightwave II).

Les résultats des valeurs des composés phénoliques sont exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide Gallique dans un gramme de matière sèche.

2.2.3.6. Flavonoïdes

Le taux des flavonoïdes a été déterminé selon la méthode de KUMARAN et KARUNAKARAN [116] et ABDEL-HAMEED [117].

Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe « Aluminium-Flavonoïde » ayant une absorption maximale à 415 nm. Une quantité de 100 μl d'extrait méthanolique (10mg/ml) a été mélangée avec 100 μl de trichlorure d'aluminium dilué à 20% dans du méthanol additionné d'une goutte de l'acide acétique. Le volume obtenu est ajusté avec du méthanol jusqu'à 5 ml. L'absorbance est mesuré après 40 min.

Le blanc est préparé avec 100 μl de l'extrait méthanolique et l'acide acétique (une goutte) ajusté avec du méthanol jusqu'à 5 ml.

L'absorption de la solution standard de Rutine diluée dans le méthanol (0,5 mg/ml) a été mesurée dans les mêmes conditions.

Le contenu de l'extrait méthanolique en flavonoïdes a été calculé en équivalent de Rutine par la formule suivante :

$$X=(A.m_0)/(A_0.m)$$

X : teneur en flavonoïdes (mg/mg de l'extrait méthanolique en équivalent Rutine)

A : absorption de la solution de l'extrait méthanolique

A₀ : absorption de la solution standard de Rutine

m : poids de l'extrait méthanolique (mg)

m₀ : poids de la Rutine (mg)

2.2.3.7. Flavonols

La détermination de la teneur de flavonols dans l'extrait méthanolique a été réalisée selon la méthode de KUMARAN et KARUNAKARAN[116] et ABDEL-HAMEED [117].

La teneur en flavonols a été déterminée en utilisant la Rutine comme un composé de référence. Cette méthode est aussi basée sur la formation d'un complexed'Aluminium- Flavonol avec un maximum d'absorption à 440 nm. Nous avons mélangé 1 ml de l'extrait méthanolique (5 mg/ml) avec 1 ml de trichloride d'aluminium (20 mg/ml) et 3 ml d'acétate de sodium (50 mg/ml).

L'absorption à 440 nm a été mesurée après 2h 30mn. L'absorption du standard (Rutine diluée à 0,5 mg/ml dans du méthanol) a été mesuré dans les mêmes conditions.

La teneur en flavonols a été calculée en équivalent de Rutine dans l'extrait méthanolique par la même formule que celle des flavonoïdes.

$$X=(A.m_0)/(A_0.m)$$

X : teneur en flavonols (mg/mg de l'extrait méthanolique en équivalent Rutine)

A : absorption de la solution de l'extrait méthanolique

A₀ : absorption de la solution standard de Rutine

m : poids de l'extrait méthanolique (mg)

m₀ : poids de la Rutine (mg)

2.2.3.8. Tanins

Nous avons placé 1,5 g de matériel végétal sec dans 10 ml de méthanol 80%. Après 15 minutes d'agitation, l'extrait obtenu est filtré puis mis dans un tube, l'ajout de FeCl_3 01% permet de détecter la présence ou l'absence de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiqques [118 ; 119].

2.2.3.9. Alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été obtenus par une triple extraction liquide-liquide selon la méthode de HARBONE [120] et BENHAMMOU et *al.*, [121].

La poudre des fleurs de *Chrysanthemum coronarium*L. a subi une extraction par Soxhlet avec 150 ml d'éthanol absolu durant 5h. L'alcool est ensuite évaporé par le biais d'un évaporateur rotatif à 40°C. Les résidus sont dilués avec 20 ml de Chloroforme et acidifié par l'acide chloridrique à 5% jusqu'à atteindre un pH= 3. Après 30 min à une température ambiante, 20 ml de Chloroforme sont ajoutés et l'ensemble est alcalinisé par le carbonate de sodium à 5% jusqu'à pH =9. La solution est laissée pendant 15 min à température ambiante, la phase chloroformique est récupérée puis évaporée. Les résidus sont par la suite pesés afin de déterminer la teneur des alcaloïdes totaux.

2.2.3.10. Saponines

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse qui correspond au degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminés. Deux gramme de matériel végétal sec broyés sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. On porte à ébullition pendant 30 min, après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml avec de l'eau distillée. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3 cm de diamètre interne) avec 1,2,3,...10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle

est proche de 1 cm dans le X^e tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le X}^e \text{ tube} \times 5 / 0,0x$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 [119].

2.2.4. Tests biologiques

Les tests biologiques ont été réalisés dans le laboratoire de recherche de Biologie Végétale du département de Biologie (Université Saad Dahleb) ainsi que dans le laboratoire de Pharmacotoxicologie du centre de recherche et de développement SAIDAL (Al Harrach).

2.2.4.1. Activité antimicrobienne

Cette partie traite l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux des fleurs séchées en la comparant avec celle de la Pénicilline G, la Lymécycline et la Chlorhydrate de naftifine. Afin de déceler leur pouvoir antimicrobien, on a adopté la méthode de diffusion sur gélose selon RIOS *et al.*, [122], FRENEY *et al.*, [123] et NAJJAA *et al.*, [124].

L'huile essentielle a été testée à l'état pur tandis que l'extrait méthanolique a été dilué dans l'éthanol aux mêmes concentrations actives des antibiotiques et de l'antifongique (120mg/ml). Parallèlement, l'extrait aqueux a été préparé par décoction de 20g de broyat de fleurs sèches dans 200 ml d'eau distillée pendant 15 minutes.

Les microorganismes de référence ont étéensemencés sur un milieu Gélose nutritive pour les bactéries et pour les champignons sur un milieu Sabouraud. Ensuite, deux à trois colonies isolées ont été prélevées et introduites dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La concentration des suspensions utilisées a été unifiée en ajustant la densité optique à 0,5 à 570 nm.

A l'aide d'un écouvillon on a prélevé une quantité de la suspension de bactéries ou de champignons puis on aensemencé le milieu de culture adéquat pour chaque type de microorganisme (Muller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons). Des disques absorbants stériles de 6 mm imprégnés de 10 µl de chaque solution à tester ont été déposés sur les géloses inoculées de souches à raison de trois disques par boîte pour chaque solution.

Après incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les champignons, l'activité antimicrobienne a été évaluée par la mesure de la zone d'inhibition qui correspond au diamètre de la zone où la croissance microbienne est visiblement absente en prenant en considération le diamètre de 6 mm du disque utilisé.

Des contrôles négatifs ont été préparés en utilisant des disques imprégnés des solvants utilisés pour la dilution de l'extrait méthanolique et aqueux (éthanol et eau distillée stérile).

2.2.4.2. Activité antiradicalaire

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer les activités antioxydantes des extraits de plantes [125 ; 126]. Pour évaluer l'activité antiradicalaire, on a adopté la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) [127 ; 128 ; 129 ; 130].

Le principe se résume à la réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil par les substances antiradicalaires.

L'expérimentation a été effectuée en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS à longueur d'onde de 517 nm. La solution de DPPH est obtenue en dissolvant 2 mg de la poudre dans 50 ml de Méthanol. Nous avons ajouté à 2ml de la solution précédente de DPPH, 100 µl de la solution contenant les antioxydants de référence à différentes concentrations (Acide Gallique, Rutine, Quercétine, α tocophérol et acide ascorbique). L'huile essentielle et l'extrait méthanolique ont été préparés selon la même méthode. La mesure de la variation de l'absorbance a été faite après 30 min à l'obscurité.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante est calculé selon la formule suivante [131 ; 132 ; 133]:

$$\text{SC} = \left\{ \frac{\text{Absorbance du témoin} - \text{Absorbance de l'antioxydant}}{\text{Absorbance du témoin}} \right\} \times 100$$

Le graphique du Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration a permis de déterminer la SC 50 (concentration correspondant à 50% d'inhibition).

2.2.4.3. Activité anti-inflammatoire

Le principe consiste à vérifier l'action inhibitrice des extraits et de l'huile essentielle sur un œdème provoqué par l'injection de carragénine sur l'aponévrose plantaire de la patte d'une souris.

Afin de contrôler l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle, de l'extrait méthanolique et aqueux, et la comparer avec celle du Clofenac, nous nous sommes référés à la méthode de COLOT [134], cette dernière est adoptée par le laboratoire de pharmacotoxicologie du centre du développement et de recherche SAIDAL (Al Harrach).

Après avoir constitué 14 lots de 5 souris chacun :

- Un lot témoin T₁
- Un lot témoin T₂
- Trois lots essais HE (huile essentielle) : HE₁, HE₂, HE₃.
- Trois lots essais EM (extrait méthanolique) : EM₁, EM₂, EM₃.
- Trois lots essais EA (extrait aqueux) : EA₁, EA₂, EA₃.
- Trois lots essais C (Clofenac) : C₁, C₂, C₃.

Au temps T₀

Nous avons administré aux souris des 14 lots les suspensions suivantes :

- lot témoin T₁ : chaque souris a reçu 0,5 ml d'eau distillée.
- lot témoin T₂ : chaque souris a reçu 0,5 ml de solution de tween 80 à 1%

- lots essais HE : les souris des lots HE₁, HE₂, HE₃ ont reçus respectivement 0,5 ml de l'huile essentielle diluée dans des solutions de tween 80 (1%) aux concentrations suivantes : 50, 100 et 500 mg/kg.
- lots essais EM : les souris des lots EM₁, EM₂, EM₃ ont reçus respectivement 0,5 ml de l'extrait méthanolique dilué dans de l'eau distillée aux concentrations suivantes : 50, 100 et 500 mg/kg.
- lots essais EA : les souris des lots EA₁, EA₂, EA₃ ont reçus respectivement 0,5 ml de l'extrait aqueux sous forme d'infusion à 1,5%, 3% et 8%.
- lots essais C : les souris des lots C₁, C₂, C₃ ont reçus respectivement 0,5 ml de Clofenac dilué dans de l'eau distillée aux concentrations suivantes : 50, 100 et 500 mg/kg (Figure 2.8).



Figure 2. 8 : Administration des solutions à tester par gavage (Originale, 2010)

Au temps T₀ + 30min

Nous avons injecté 0,025 ml de solution de carragénine à 1% (diluée dans de l'eau physiologique à 0,9%) sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de toutes les souris mises en expérimentation (Figure 2.9).



Figure 2.9 : Injection de la carragénine dans la patte gauche d'une souris
(Original, 2010)

Au temps $T_0 + 4h$

Après avoir sacrifier les souris, les pattes postérieures ont été coupées à hauteur de l'articulation (Figure 2.10) puis pesées sur une balance analytique.

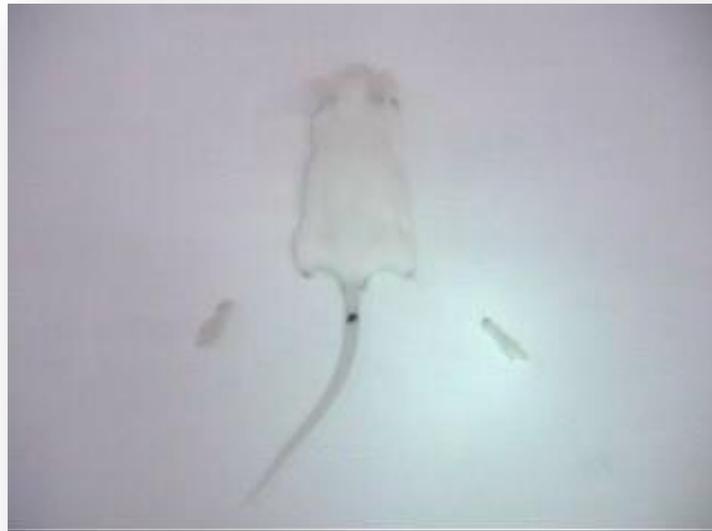


Figure 2.10 : Souris sacrifiée avec pattes postérieures coupées (Original, 2010)

Expression des résultats

- On a calculé la moyenne des poids de pattes gauches et celle des pattes droites de chaque lot.
- Ensuite, on a calculé le pourcentage d'augmentation du poids de la patte gauche (% d'œdème) par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{[(\text{moyenne des poids des pattes gauches} - \text{moyenne des poids des pattes droites}) / \text{moyenne des poids des pattes droites}] \times 100}{}$$

- Apres, on a calculé le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins en appliquant cette formule :

$$\text{Réduction de l'œdème (\%)} = \frac{[(\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}) / \% \text{ de l'œdème témoin}] \times 100}{}$$

2.2.4.4. Test de toxicité

Dans le but de vérifier la toxicité de l'extrait aqueux qui est généralement prescrit par les phytothérapeutes à 1,5 %, une décoction cinq fois plus élevée (8 %) a été préparée et testée sur des souris selon le protocole adopté par le laboratoire de Pharmacotoxicologie du Centre de Recherche et de Développement SAIDAL conformément à MILLER et TAINTEUR [135].

Les souris ont été réparties en deux lots de cinq individus de sexe différent. Après les avoir mis à jeun la veille du test, on leur a administré 0,5ml de la solution à tester par voie orale. Ensuite, ces animaux ont été privés de nourriture pendant 3 à 4h après l'administration de la décoction.

Les souris ont été mises en observation durant 15 jours en établissant une fiche d'observations. Une attention particulière a été apportée aux tremblements, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma.

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Etude macroscopique et microscopique

3.1.1 Examen macroscopique

Les résultats macroscopiques montrent que la plante peut atteindre une hauteur de 1m, les tiges sont dressées et très ramifiées, présentant des feuilles sessiles profondément découpées et bien vertes. Les capitules sont bicolores et les fruits sont des akènes de 2-3 mm. Sa racine est du type pivotant, pourvue de racines secondaires fines (Figure 3.1).

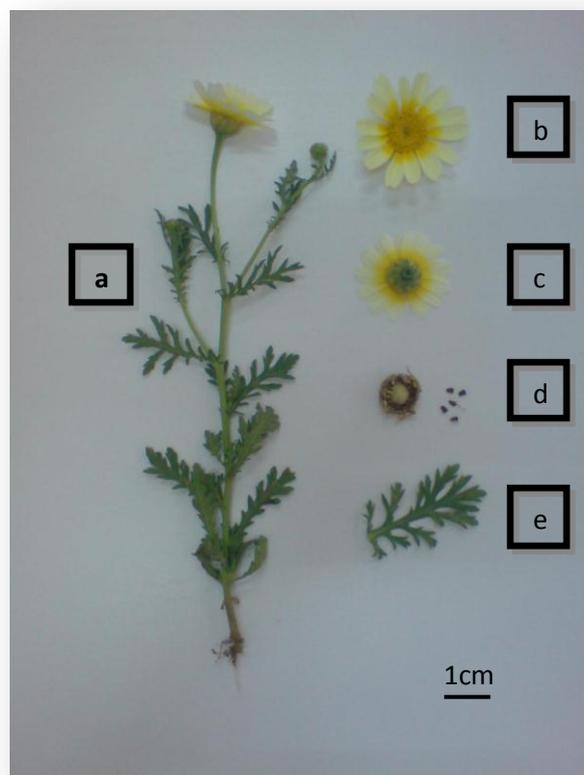


Figure 3.1: *Chrysanthemum coronarium* L. : (a) plante entière, (b) face ventrale du capitule, (c) face dorsale du capitule, (d) akènes, (e) feuille (Photo originale)

3.1.1.1. Etude du capitule

Les fleurs du Chrysanthème à couronne sont serrées en capitule sur un réceptacle commun, de telle sorte que l'inflorescence ait la dimension et l'apparence, d'une fleur unique (Figure 3.2).

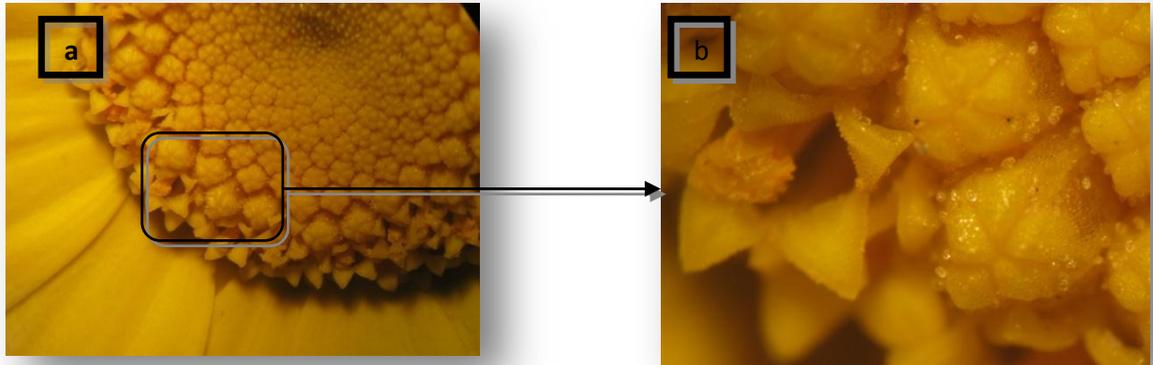


Figure 3. 2 : (a) :Fleurons de *Chrysanthemum coronarium* L. (Gx0,8); (b) :
Fleurons de *C. coronarium* L (Gx2,5) (Photos originales)

Le pédoncule floral s'élargit en un vaste plateau ou réceptacle (environ 20 mm), entouré d'un involucre ou couronne de bractées disposées sur trois rangées (Figure 3.3), et à la face supérieure duquel les fleurons sont comme piqués, petits et nombreux. Ces derniers sont des fleurs à corole soudée (gamopétale).

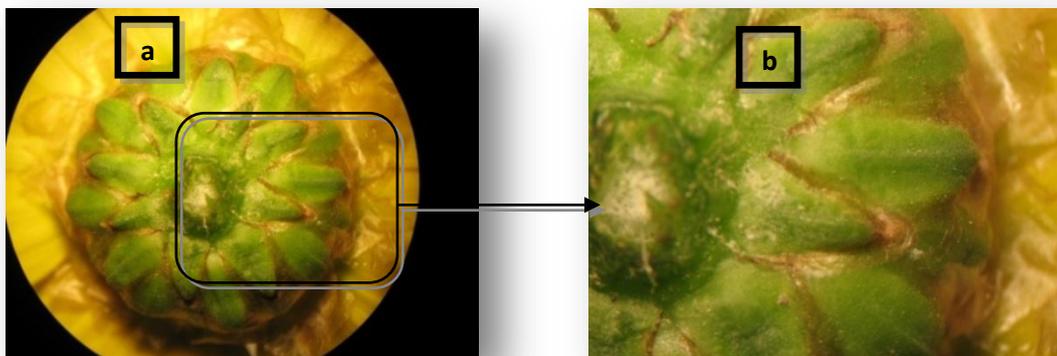


Figure 3.3 :(a) : Involucre de *Chrysanthemum coronarium* L. (Gx0,8) ; (b) :
bractées de *C. coronarium* L. (Gx2,5) (Photos originales, 2010)

Dans notre étude, nous avons constaté que la plante présente deux types de fleurons (Figure 3.4) :

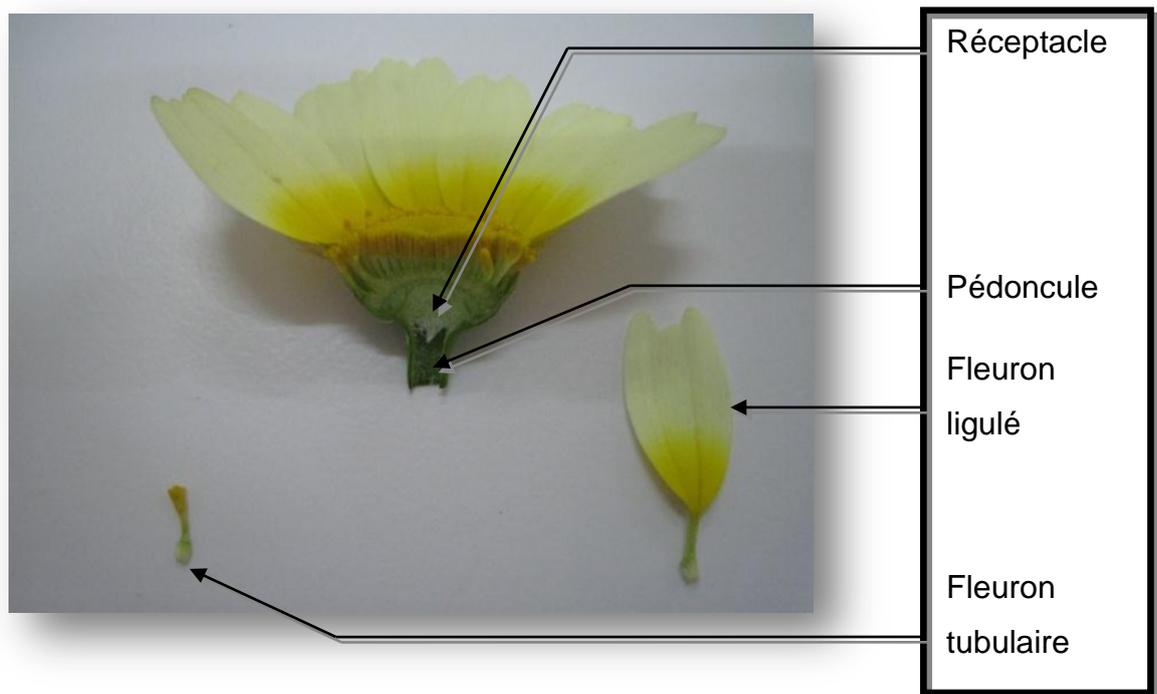


Figure 3.4. Section longitudinale du capitule de *Chrysanthemum coronarium* L.
(Photo originale, 2010)

- les fleurons ligulés : ils ne présentent pas de sépales, ils sont situés à la périphérie, et leurs couleurs varient du jaune foncé au jaune pâle dans la partie supérieure. Ils portent une languette allongée constituant la ligule, cette dernière est formée par trois lobes simulant le pétale d'une fleur simple (fleurs ligulées). Ils sont unisexués femelles (pistilés) (Figure 3.5).

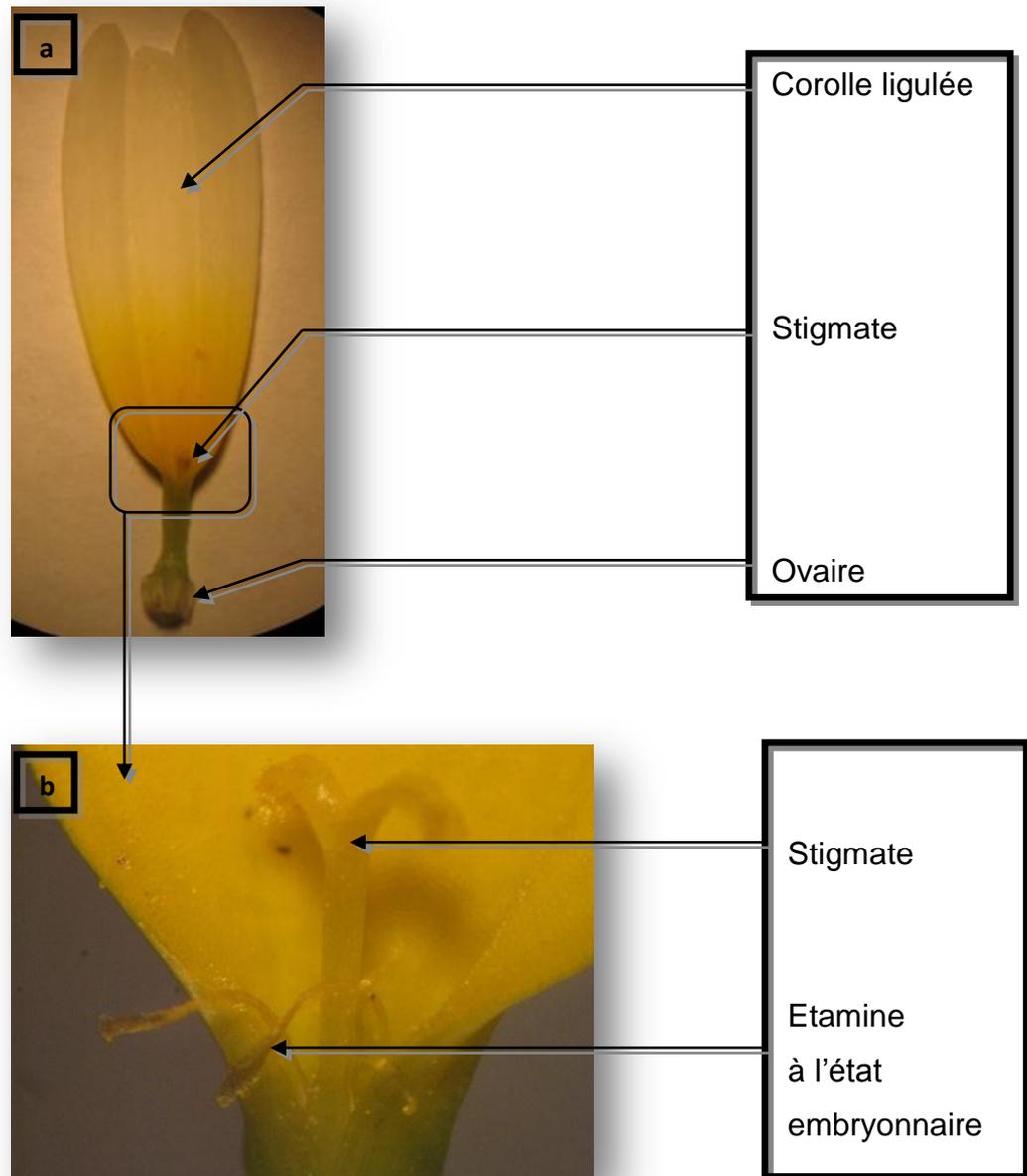


Figure 3.5 : (a) : Fleuron ligulé de *Chrysanthemum coronarium* L. (Gx0,8) ; (b) : Fleuron ligulé de *C. coronarium* L. (Gx2,5) (Photos originales)

- les fleurons tubulaires : ils sont dépourvus de sépales, situés au centre du plateau, de couleur jaune, formant un tube terminé par cinq lobes dont les extrémités sont en pointes, ils sont hermaphrodites (staminés et pistilés) (Figure 3.6).

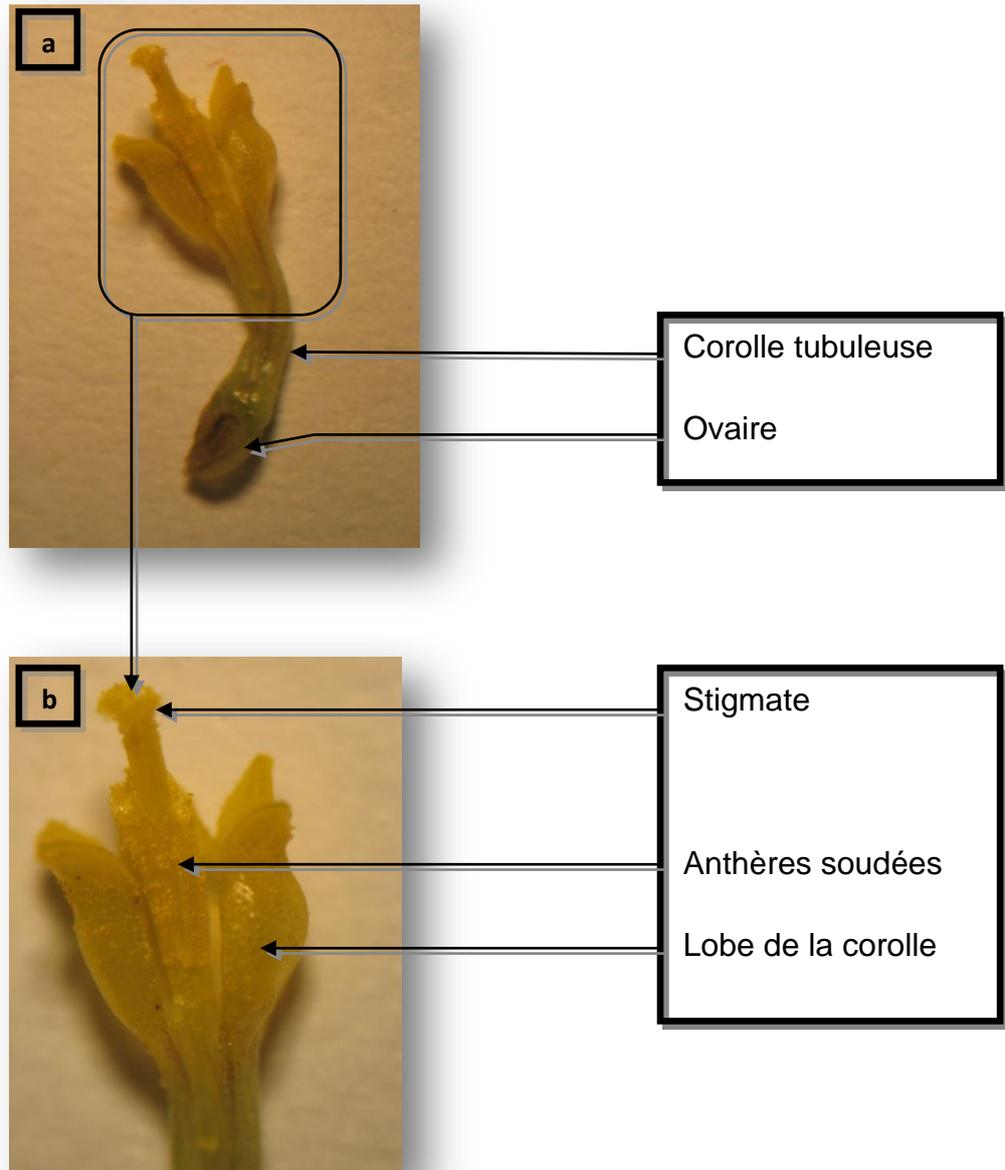


Figure 3. 6: (a) : Fleuron tubulaire de *Chrysanthemum coronarium* L. (Gx0,8) ;(b) : Fleuron tubulaire de *C. coronarium* L. (Gx2,5) (Photos originales)

Les fleurons du Chrysanthème à couronne possèdent un seul stigmate avec un ovaire infère qui, à maturation donne un fruit sec indéhiscent (Figure 3.7). Les étamines non fonctionnelles à cause de leur état embryonnaire sont rencontrées dans les fleurs pistillées ou stériles. Dans les fleurs tubulaires, les étamines sont au nombre de cinq, insérées sur le tube de la corolle et alternes à ses divisions. Les filets sont ordinairement libres mais les anthères sont connés par leur bord en un tube entourant le style.



Figure 3.7 :Akènes de *Chrysanthemum coronarium* L. (Gx0,8) (Photo originale)

3.1.2. Examen microscopique

3.1.2.1. Racine

L'examen microscopique des coupes transversales de la racine montre l'importance de l'espace occupé par le cylindre central par rapport à l'écorce (Figure 3.8). Ces deux zones sont séparées par un endoderme à cadre.

De l'extérieur vers l'intérieur, nous avons noté la présence des structures suivantes :

Le suber suivi par le phelloderme, le parenchyme médullaire contenant deux amas de tissu de soutien constituant le sclérenchyme à cellules polyédriques, le liber et enfin le bois.

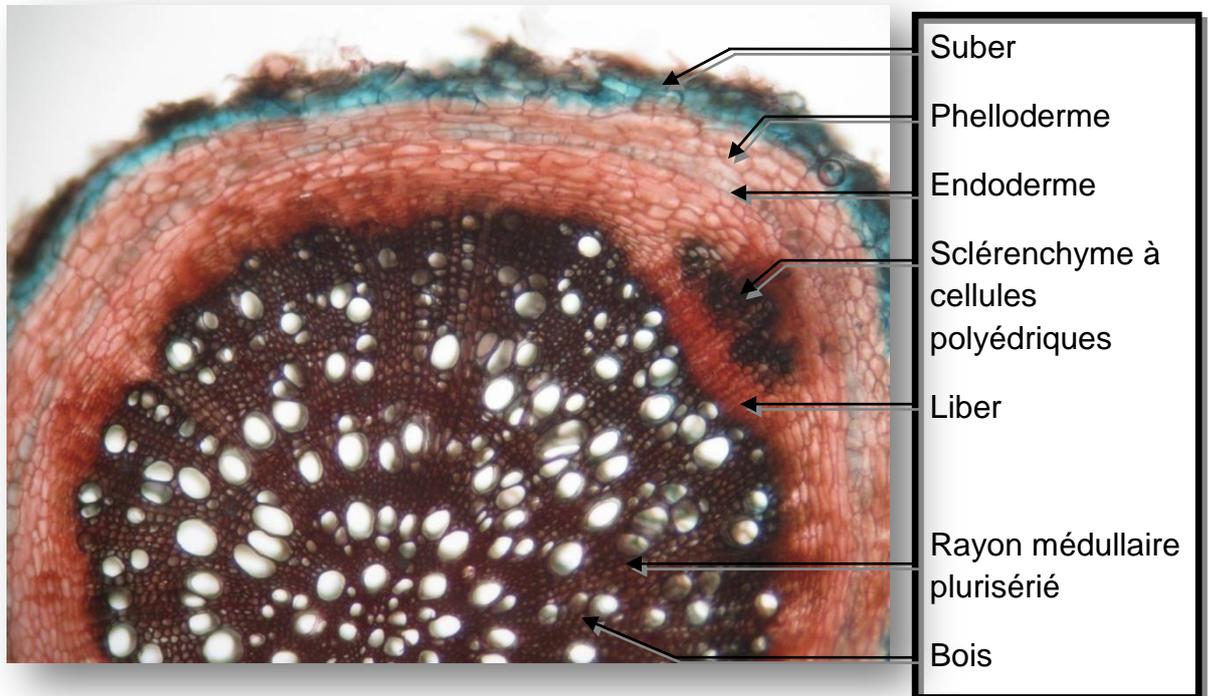


Figure 3.8 : Coupe transversale de la racine (Gx100)(Photo originale)

3.1.2.2. Tige

En partant de la périphérie vers le centre, les coupes histologiques ont montré que la structure de la tige comporte les éléments suivants :

- Une seule strate de cellules épidermiques cutinisées.
- Des ilots de tissu de soutien vivant, où sont épaissis les angles de confluence de cellules, c'est le collenchyme angulaire.
- Un parenchyme cortical suivi d'un parenchyme médullaire, entre lesquels se trouvent le phloème et le xylème, constituant des faisceaux cribro-vasculaires disposés sur un seul rayon (Figure 3.9).

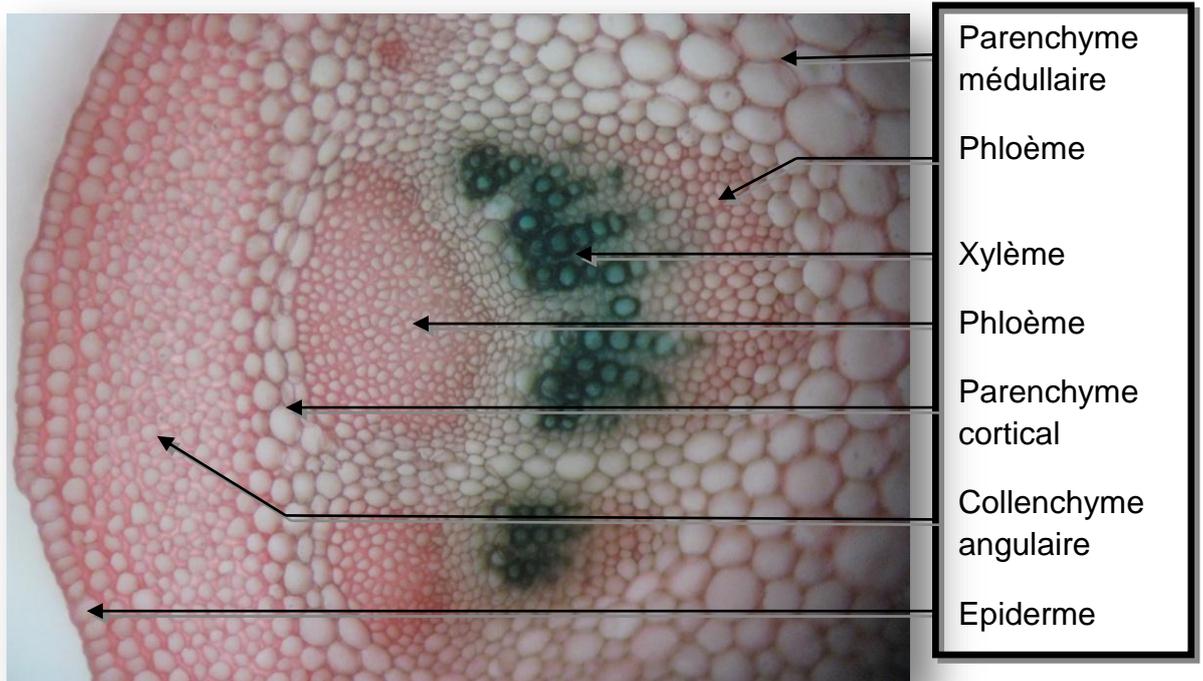


Figure 3.9 : Coupe transversale de la tige (Gx100)(Photo originale)

Au niveau du parenchyme médullaire de la tige, on note la présence de canaux excréteurs (Figure 3.10) qui sont probablement les lieux de sécrétions des huiles essentielles au niveau de la tige.

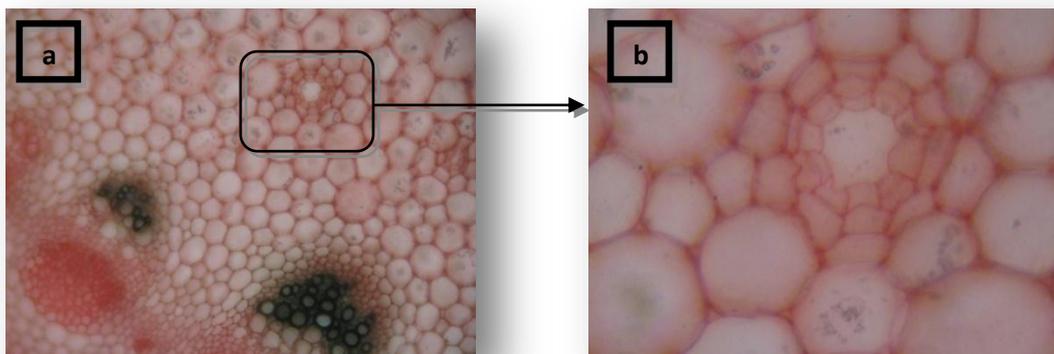


Figure 3.10 :(a) : Canal excréteur (Gx40); (b) :Canal excréteur (Gx100)
(Photos originales)

3.1.2.3. Feuille

Les faces supérieure et inférieure de la feuille dorsiventrale sont recouvertes chacune par un épiderme cutinisé, pourvu de stomates. Ces épidermes enserrent un tissu intermédiaire qu'est le mésophylle (Figure 3.11). Ce dernier est un parenchyme à méats situé au centre de la feuille entourant ainsi la nervure principale et quelques nervures secondaires. Cependant à la périphérie ce mésophylle constitue un parenchyme de type palissadique à la face supérieure et de type lacuneux à la face inférieure.

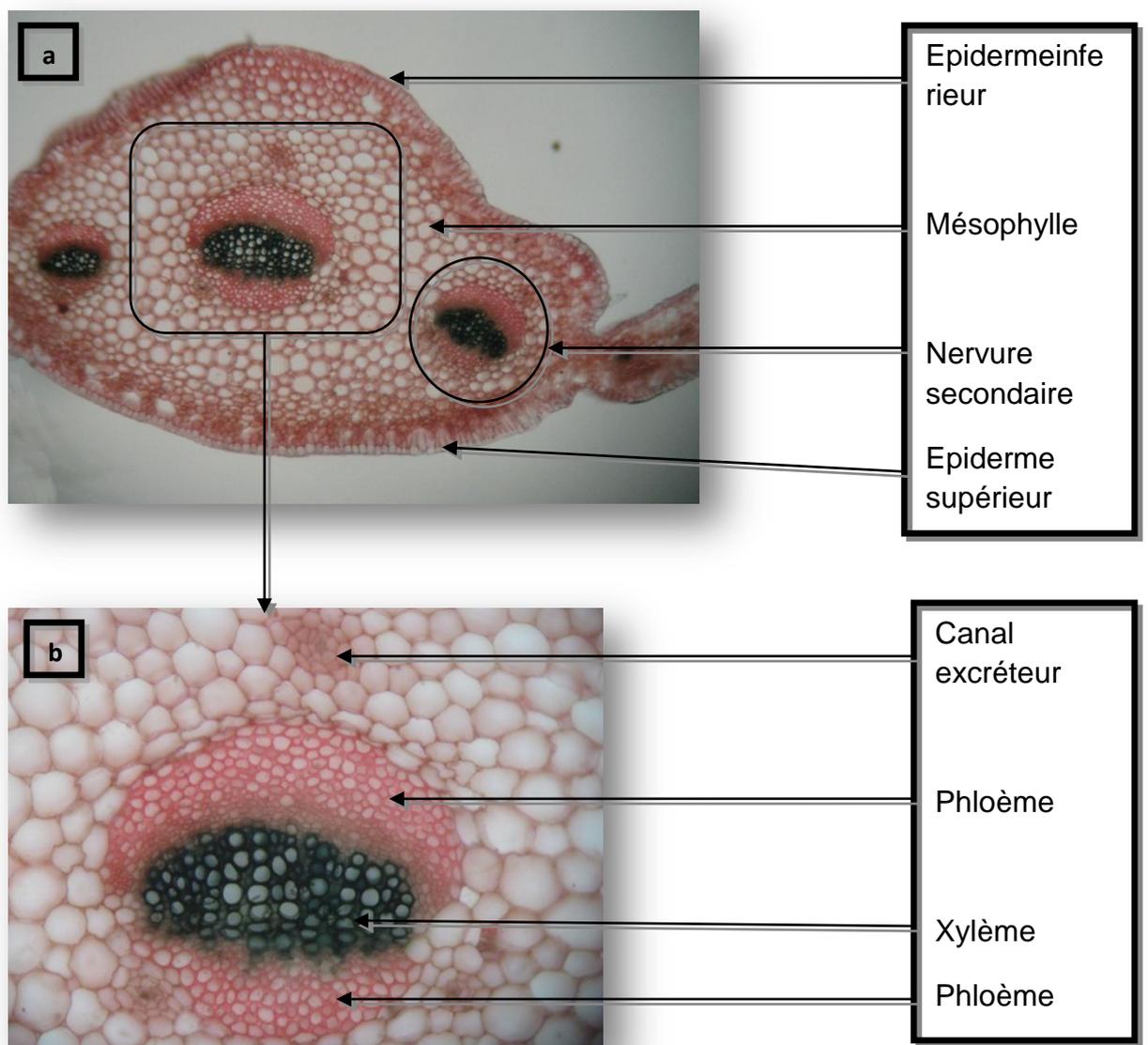


Figure 3.11 : (a) : Coupe transversale de la feuille (Gx40) ; (b) : Coupe transversale de la feuille (Gx100) (Photo originale)

Au niveau des mésophylles des coupes transversales de la feuille de *Chrysanthemum coronarium* L., nous avons noté la présence des canaux excréteurs semblables à ceux rencontrés dans la tige.

3.1.2.4. Glandes sécrétrices

L'étude microscopique a également révélé l'existence de deux structures de sécrétion des huiles essentielles sur la surface des fleurons de *Chrysanthemum coronarium* L.: les glandes sécrétrices sessiles (Figure 3.12) et les papilles (Figure 3.13, Figure 3.14).

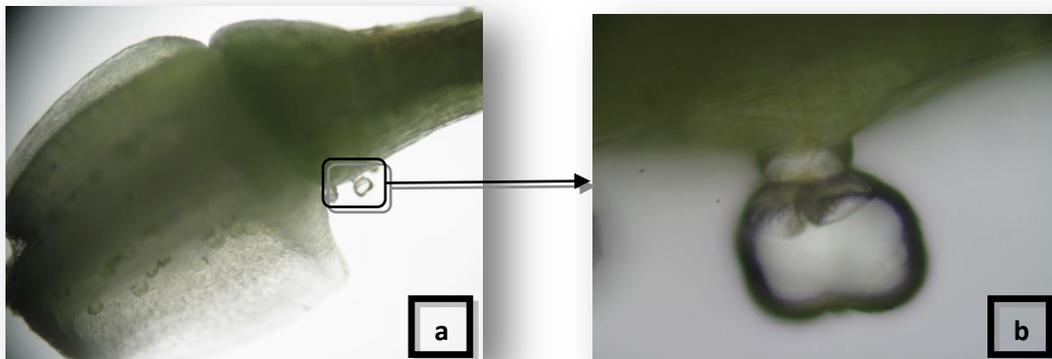


Figure 3.12 : (a) : Glande sécrétrice sessile sur la surface des fleurons de *Chrysanthemum coronarium* L. (Gx40); (b) : Glande sécrétrice sessile sur la surface des fleurons de *C. coronarium* L. (Gx400) (Photos originales)

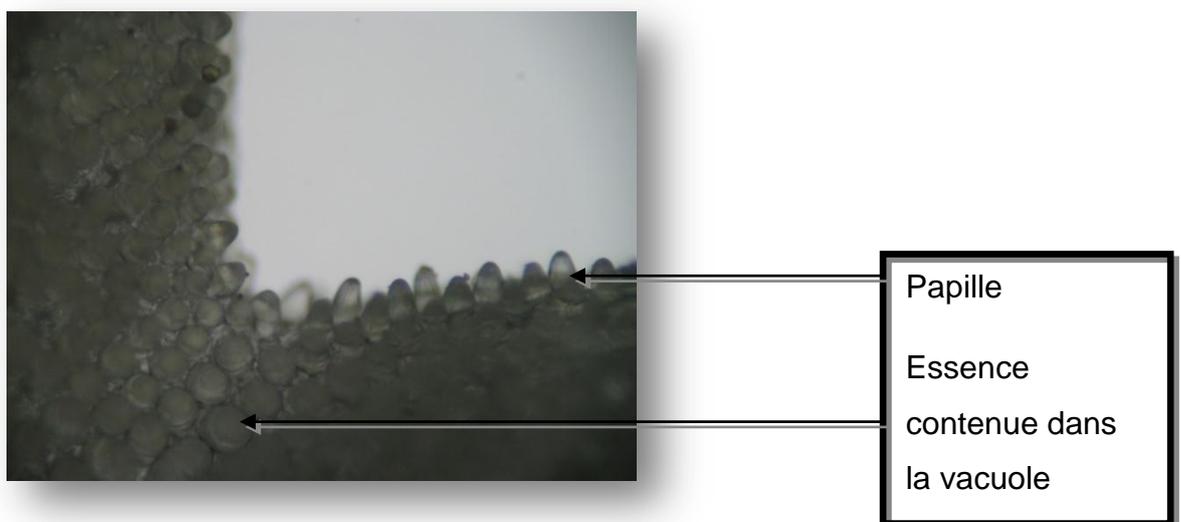


Figure 3.13 : Papilles sur la surface des fleurons ligulés de *Chrysanthemum coronarium* L. (Gx100) (Photos originales)

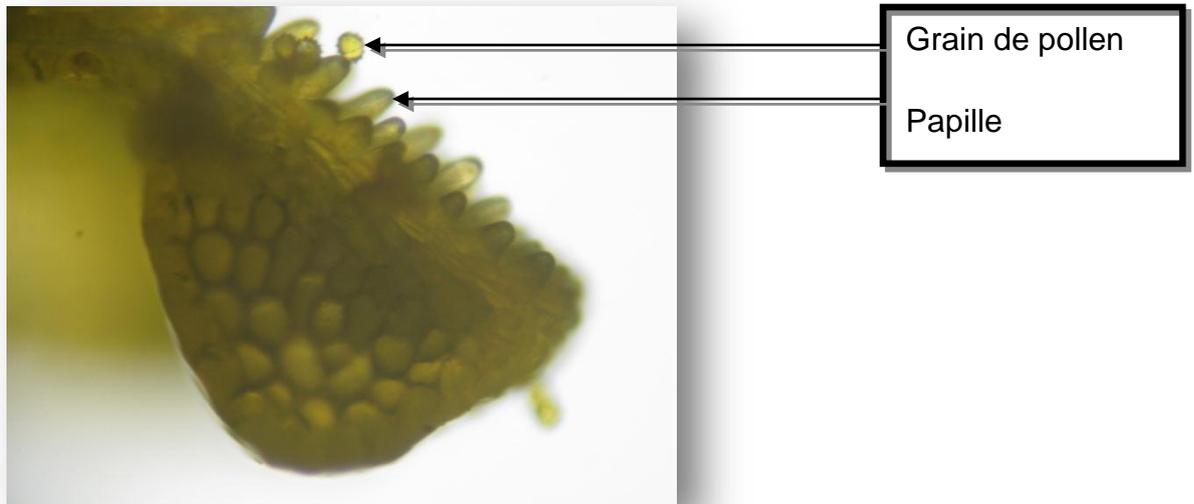


Figure 3.14 :Papilles sur la surface des fleurons tubulaires de *Chrysanthemum coronarium* L. (Gx100) (Photos originales)

3.2. Résultats de l'étude phytochimique

3.2.1. Teneur en eau

L'analyse de nos échantillons (détail en Appendice D), a montré une teneur en eau importante de l'ordre de $81,3667\% \pm 0,0055$ (Tableau 3.1) signifiant ainsi que le 4/5 du poids de la fleur fraîche est constitué par l'eau (Figure 3.15).

Tableau 3.1 : Teneur en eau des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L.

Poids frais (moyenne en g)	30
Poids sec (moyenne en g)	$5,59 \pm 0,1637$
teneur en eau (%)	$81,3667 \pm 0,0055$

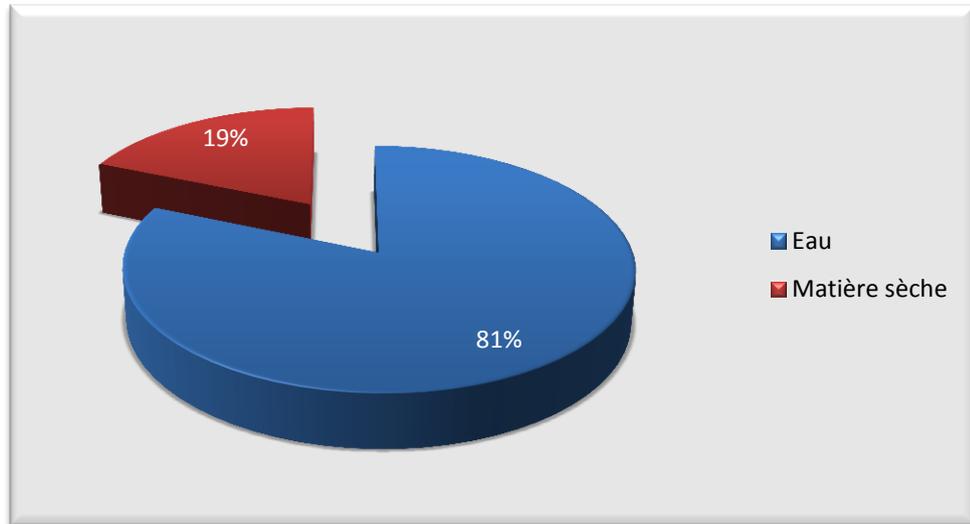


Figure 3.15 : Teneur en eau des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L.

3.2.2. Taux d'humidité

Le résultat du taux d'humidité des fleurs séchées est résumé dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Taux d'humidité de la poudre des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L.

Poids de la matière végétale avant séchage PI (g)	2±0,0022g
Poids de la matière végétale après séchage PS (g)	1,7803±0,001
Taux d'humidité (%)	10,9852±0,003%

Le taux d'humidité des fleurs sèches du Chrysanthème à couronne est de 10,9852±0,003%, ce taux indique que ces fleurs ont été correctement séchées. En effet selon CANDAELE [136], un produit est dit sec quand il est stabilisé dans l'air et qu'il ne risque plus aucune dégradation. Généralement, cela correspond à un taux d'humidité avoisinant les 12 %.

Selon WICHTL et ANTON [137], Un pourcentage d'eau trop élevé permet à un certain nombre de réactions enzymatiques de se réaliser, entraînant des effets néfastes sur l'aspect des drogues, leurs caractères organoleptiques ainsi que leurs propriétés thérapeutiques. En outre, une humidité résiduelle favorise le développement de microorganismes (bactéries, levures, moisissures).

3.2.3. Taux de cendres

La totalité des matières organiques de la plante est éliminée par carbonisation et la pesée du résidu, constitué uniquement de matières minérales, permet l'évaluation du degré de propreté de la plante. Ce taux permet également d'identifier et de quantifier les agents de fertilisation utilisés durant la culture. Certaines plantes, riches en minéraux présentent un taux de cendres naturellement élevé [137].

Après destruction de la matière organique par calcination de 2 g de la poudre des capitules du Chrysanthème à couronne, nous avons obtenu $0,1576 \text{ g} \pm 0,0018$ de cendres (Tableau 3.3). Ce qui représente $7,8811\% \pm 0,0009$ du poids de la matière végétale sèche (détail en Appendice D).

Tableau 3.3 : Teneur en cendres des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L.

Pesée de la poudre (en g)	Pesée des cendres (en g)	teneur en cendre (%)
$2,0001 \pm 0,0002$	$0,1576 \pm 0,0018$	$7,8811\% \pm 0,001$

3.2.4. Rendement en huile essentielle

L'extraction par hydrodistillation de 120g (Tableau 3.4) de capitules secs de *Chrysanthemum coronarium* L., nous a permis d'obtenir $0,1853 \text{ g} \pm 0,0106$ d'huile essentielle peu visqueuse de couleur bleue avec une odeur forte et désagréable. Le rendement de cette extraction est de l'ordre de $0,1544\% \pm 0,0001$ (détail en Appendice D).

Tableau 3.4 Rendement en huile essentielle des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L.

Poids des fleurs sèches (g)	120
poids de l'huile essentielle (g)	$0,1853 \pm 0,01$
Rendement %	$0,1544 \pm 0,0001$

3.2.5. Rendement en fraction polaire et apolaire

Les composés polaires et apolaires récupérés après extraction au soxhlet ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Le rendement a été déterminé par rapport à 100g de matière végétale sèche. Les résultats sont rapportés dans le tableau 3.5.

Tableau 3. 5 : Rendement en fraction polaire et apolaire des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L.

	Poids de la matière végétale (g)	Poids de l'extrait (g)	Rendement %
fraction polaire	40	13,95	34,88%
fraction apolaire	40	5,39	13,48%

Les fractions obtenues sont différentes par la couleur. La fraction polaire qui est de couleur marron foncé représente 34,88% de la matière sèche alors que la fraction apolaire qui présente un rendement de 13,48% est de couleur jaune foncé.

3.2.6. Analyse des huiles essentielles par CG/SM

L'huile essentielle extraite du Chrysanthème à couronne a été analysée par la technique de la chromatographie gazeuse selon la méthode précédemment expliquée. Au total, nous avons identifié 57 composés (Figure 3.16) correspondant à 89,46% de l'ensemble des constituants contenus dans cette huile.

Ces composés se répartissent en hydrocarbures terpéniques dont 20 composés sont des monoterpènes (50,22%) et 23 composés sont des sesquiterpènes (17,14%).

Selon PARIS [138], les composés terpéniques confèrent à la plante des propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques et vermifuges.

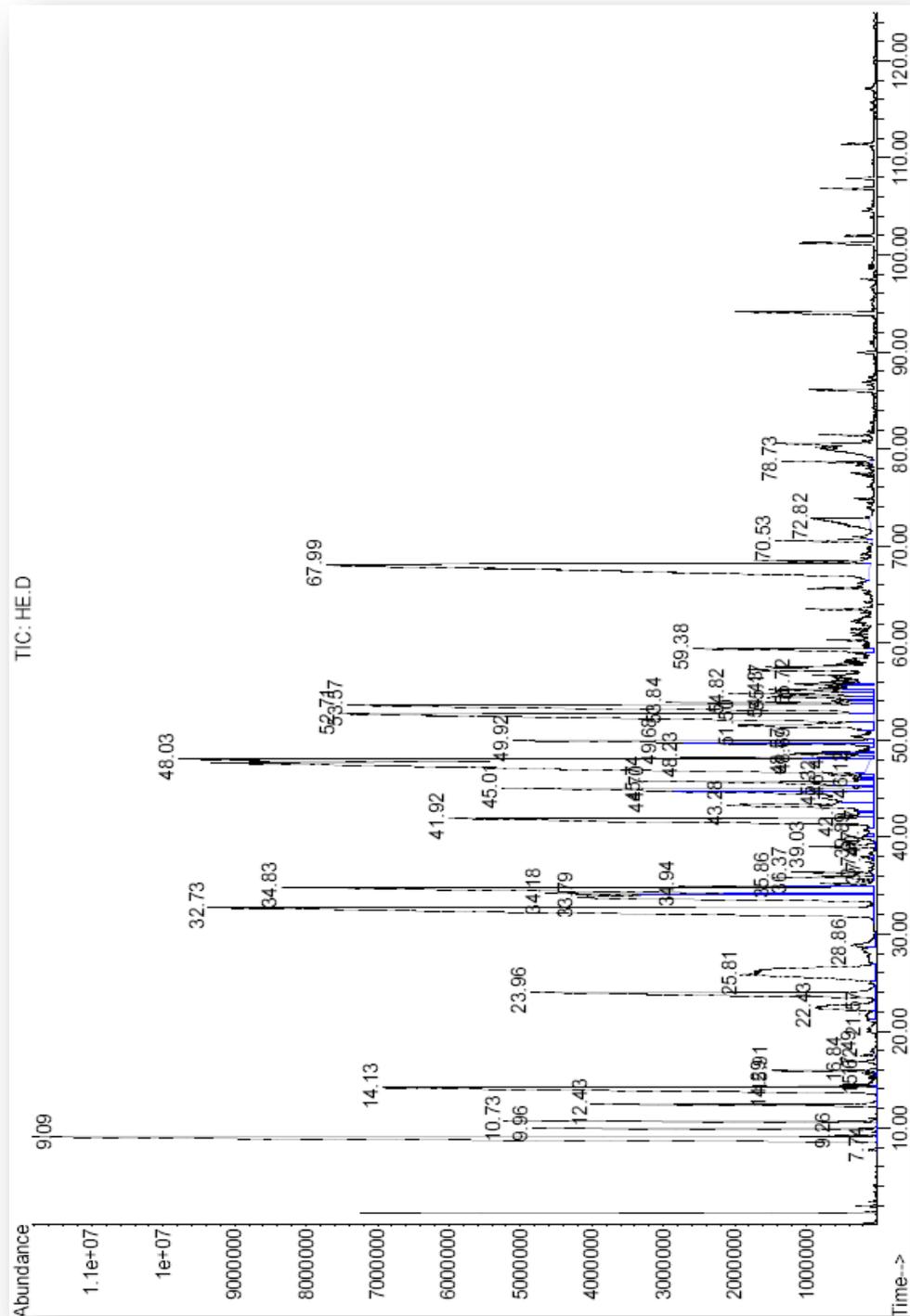
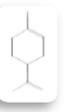
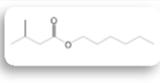
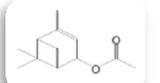
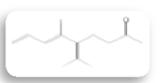
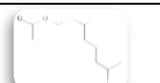
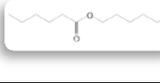
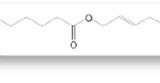


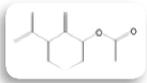
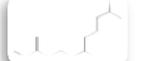
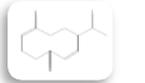
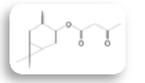
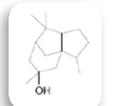
Figure 3.16 : Profil chromatographique de l'huile essentielle des fleurs de *Chrysanthemum coronarium* L.

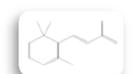
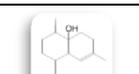
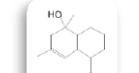
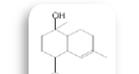
Les composés identifiés sont listés suivant l'ordre d'élution de leur indice de rétention (tableau 3.6).

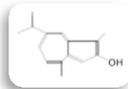
Tableau 3. 6 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Chrysanthemum coronarium* L.

Composé	Formule chimique	Structure chimique	Temps de rétention (min)	Pourcentage (%)
Nonène	C ₉ H ₁₈		7.739	0,033
Santolina triène	C₁₀H₁₆		9.093	6,322
Tricyclène	C ₁₀ H ₁₆		9.264	0,039
α-Pinène	C ₁₀ H ₁₆		9.956	0,816
Camphène	C ₁₀ H ₁₆		10.728	0,979
L-β-pinène	C ₁₀ H ₁₆		12.424	0,917
β-Pinène	C₁₀H₁₆		14.129	3,555
Ocimène	C ₁₀ H ₁₆		14.299	0,142
Cymene	C ₁₀ H ₁₄		15.623	0,036
Limonène	C ₁₀ H ₁₆		15.904	0,249
trans-β-Ocimène	C ₁₀ H ₁₆		16.847	0,102
cis-β-Ocimène	C ₁₀ H ₁₆		17.489	0,042
Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O		21.571	0,112
Verbenone	C ₁₀ H ₁₄ O		22.424	0,685

Composé	Formule chimique	Structure chimique	Temps de rétention (min)	Pourcentage (%)
(+)-Camphre	C₁₀H₁₆O		23.968	2,415
α-Cyclocitral	C₁₀H₁₆O		25.814	2,918
Isovalérate d'hexyl	C ₁₁ H ₂₂ O ₂		28.863	0,238
verbenyl acétate	C₁₂H₁₈O₂		32.735	8,196
trans-Chrysanthényle Acétate	C₁₂H₁₈O₂		33.788	2,998
6,8-Nonadien-2-one, 6-methyl-5-(1-methylethylidene)-	C₁₃H₂₀O		34.179	1,391
(-)-cis-Myrtanol	C₁₀H₁₈O		34.831	5,525
Acétate de néryle	C ₁₂ H ₂₀ O ₂		34.941	0,261
Hexyl caproate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂		35.864	0,271
(-)-Myrtenyl acetate	C₁₂H₁₈O₂		36.366	0,165
cis-β-Hexenyl Caproate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂		37.409	0,031
trans-2-Hexenyl Caproate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂		37.971	0,059
Copaene	C ₁₅ H ₂₄		39.024	0,28
(1-Methylpenta-1,3-dienyl)benzene	C ₁₂ H ₁₄		39.886	0,108

Composé	Formule chimique	Structure chimique	Temps de rétention (min)	Pourcentage (%)
Longifolène	$C_{15}H_{24}$		40.167	0,05
Cyclohexanol, 2-méthylène-3-(1-méthylethényl)-, acetate, cis-	$C_{12}H_{18}O_2$		41.912	3,834
Thujopsène	$C_{15}H_{24}$		42.173	0,179
(Z,E)-α-Farnésène	$C_{15}H_{24}$		43.277	1,278
β-Farnésène	$C_{15}H_{24}$		44.701	1,336
(Z)-β-Farnésène	$C_{15}H_{24}$		45.012	1,961
α -Himachalène	$C_{15}H_{24}$		45.323	0,173
Germacrène D	$C_{15}H_{24}$		45.744	1,11
Limonène-6-ol, pivalate	$C_{15}H_{24}O_2$		46.125	0,083
γ -Elemène	$C_{15}H_{24}$		46.416	0,172
ester d'acide acétoacétique, 3(10)-Caren-4-ol	$C_{14}H_{20}O_3$		48.031	14,01
α -Farnésène	$C_{15}H_{24}$		48.221	0,547
Cedrol	$C_{15}H_{26}O$		48.573	0,245

Composé	Formule chimique	Structure chimique	Temps de rétention (min)	Pourcentage (%)
β -Sesquiphellandrene	$C_{15}H_{24}$		48.693	0,168
α -Bergamotene	$C_{15}H_{24}$		49.676	0,674
1,5,5-Trimethyl-6-(3-methyl-buta-1,3-dienyl)-cyclohexene	$C_{14}H_{22}$		49.917	1,551
Oxide de Caryophyllène	$C_{15}H_{24}O$		51.501	1,034
6-Isopropenyl-3-methoxymethoxy-3-methyl-cyclohexene	$C_{12}H_{20}O_2$		52.705	5,986
Epoxide de Farnésène E	$C_{15}H_{24}O$		53.578	4,642
cis Lanceol	$C_{15}H_{24}O$		53.838	0,504
Cubenol	$C_{15}H_{26}O$		54.430	0,355
trans- α -Bergamotol, Z	$C_{15}H_{24}O$		54.821	0,674
τ -Muurolol	$C_{15}H_{26}O$		55.172	0,398
α -Cadinol	$C_{15}H_{26}O$		55.714	0,197
Chamazulène	$C_{14}H_{16}$		59.385	0,744
1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-	$C_{13}H_{12}O_2$		67.991	7,308

Composé	Formule chimique	Structure chimique	Temps de rétention (min)	Pourcentage (%)
Azulène-2-ol, 1,4-diméthyl-7-(1-méthylethyl)-	C ₁₅ H ₁₈ O		70.529	0,337
acide Palmitique	C ₁₆ H ₃₂ O ₂		72.816	0,729
acide Linoléique	C ₁₈ H ₃₂ O ₂		78.723	0,293

Il ressort de ce tableau que les monoterpènes oxygénés (37,02%) sont prédominants par rapport aux monoterpènes hydrocarbonés (13,2%). Les constituants monoterpéniques majeurs identifiés dans l'huile essentielle du Chrysanthème à couronne sont : l'ester d'acide acétoacétique, 3(10)-Caren-4-ol (14,01%), le Verbenyl acétate (8,196%), le Santolina triène (6,322%), le (-)-cis-Myrtanol (5,525%), le β -Pinène (3,555%), le trans-Chrysanthényle Acétate (2,998%), le α -Cyclocitral (2,918%) et le (+)-Camphre (2,415%).

Concernant les sesquiterpènes, l'Epoxide de Farnésène E est le constituant le plus abondant (4,642%). Le Chamazulène réputé pour son effet anti-inflammatoire et antipyrétique [139] est présent avec une proportion de 0,744%. Selon ALVAREZ-CASTELLANOS et *al.*, [4] ce dernier confère à l'huile essentielle de *Chrysanthemum coronarium* L. une couleur bleu.

3.2.7. Composés phénoliques

Après avoir préparé l'acide gallique à différente concentration (0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 100 mg/ml), Nous avons obtenu une corrélation hautement significative entre la concentration de l'acide gallique et l'absorbance moyenne ($r=0,993$), ainsi la courbe d'étalonnage montre la linéarité de l'absorbance en fonction des différentes concentrations (Figure 3.17). Les mesures de la densité optique ont été effectuées à la longueur d'onde de 765 nm (détail en Appendice D).

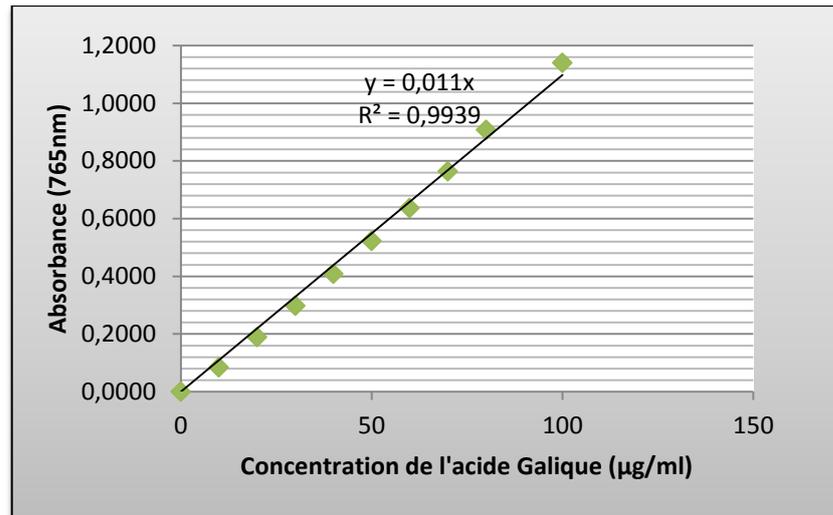


Figure 3.17 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques

Les résultats de cette étude ont révélé que la présence des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des capitules du Chrysanthème à couronne est considérable (Tableau 3.7); elle est de $20,410 \pm 0,713$ mg d'équivalent d'acide Gallique/g de matière végétale sèche (détail en Appendice D). Cela est probablement lié aux conditions climatiques de l'habitat (température élevée, forte exposition solaire, sécheresse et salinité), qui stimulent la biosynthèse de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques. En effet, le contenu phénolique d'une plante dépend d'un nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (l'environnement) [140 ;141].

Tableau 3.7 : Absorbance et les concentrations des composés phénoliques

Absorbance de l'extrait méthanolique (1mg/ml)	$0,6437 \pm 0,022$
Concentration des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique (mg de GAE/g)	$58,515 \pm 2,046$
Concentration des composés phénoliques dans les capitules secs (mg de GAE/g)	$20,410 \pm 0,713$

3.2.8. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont le groupe le plus commun et le plus répandu dans les composés phénoliques des plantes [142]. Cela est confirmé par les résultats obtenus (Tableau 3.8) qui montrent que la teneur en flavonoïdes est $13,88 \pm 2,49$ mg/g de capitules secs en équivalent Rutine (détail en Appendice D). Ce qui représente 68,01% des composés phénoliques.

Tableau 3.8 : Teneur en flavonoïdes

teneur en flavonoïdes (mg/g de l'extrait méthanolique en équivalent Rutine)	$39,79 \pm 7,13$
teneur en flavonoïdes (mg/g de fleurs sèches en équivalent Rutine)	$13,88 \pm 2,49$

Cette teneur élevée en flavonoïdes favorise probablement la pollinisation car selon GUILLOT [143], dans la gamme des fleurs jaunes, certains flavonoïdes absorbent fortement l'ultra-violet et doivent être perçus par les insectes.

3.2.9. Flavonols

Les résultats du tableau 3.9 indiquent que la teneur en flavonols dans les fleurs sèches du Chrysanthème à couronne est de $12,11 \pm 0,0004$ mg/g de fleurs sèches en équivalent Rutine (détail en Appendice D).

Cette présence importante des flavonols justifie probablement la coloration de ces fleurs car selon MACHEIX et *al.*, [57], quelques flavonols jaunes (gossypétine, quercétagétine) participent à la coloration des Chrysanthèmes jaunes.

Tableau 3. 9 : Teneur en flavonols

teneur en flavonols (mg/g de l'extrait méthanolique en équivalent Rutine)	$34,72 \pm 0,001$
teneur en flavonols (mg/g de fleurs sèches en équivalent Rutine)	$12,11 \pm 0,0004$

3.2.10. Tanins

La réaction du FeCl_3 avec notre échantillon a produit une couleur brune verdâtre, signifiant ainsi que les fleurs du Chrysanthème à couronne contiennent des tanins catéchiques. Selon PARIS et MOYSE [138], les tanins possèdent des propriétés astringentes et antidiarrhéiques. Ils sont aussi anti-inflammatoires dans le cas des brûlures.

3.2.11. Alcaloïdes

Les résidus récupérés après évaporation du chloroforme par le biais d'un évaporateur rotatif ont été pesés pour évaluer le poids sec résultant. Les alcaloïdes représentent 103 mg dans 10g de capitules secs ce qui équivaut à un rendement en alcaloïdes de 10,3 mg/g de capitules secs.

Les alcaloïdes possèdent des propriétés antiparasitaires, antispasmodiques et antidiarrhéiques. Ils ne confèrent à la plante des propriétés antimicrobiennes qu'à des doses très élevées [138].

3.2.12. Saponines

La hauteur de la mousse obtenue est inférieure à 2mm dans l'ensemble des tubes, signifiant ainsi que l'indice de mousse est inférieur à 100. Ces résultats montrent la faible présence des saponines dans les fleurs du Chrysanthème à couronne.

3.3. Résultats des tests biologiques

3.3.1. Activité antimicrobienne

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant les solutions à tester. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition. Selon CAROVIC-STANKO et *al.*, [144], l'inhibition est considérée respectivement comme légère, modérée ou importante, en ayant un diamètre $D < 10\text{mm}$, $10\text{mm} \geq D \leq 15\text{mm}$, $D > 15\text{mm}$.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, des extraits, des antibiotiques et de l'antifongique sont rapportés dans les tableaux 3.10 et 3.11. Ces résultats représentent la zone d'inhibition en tenant compte du diamètre du disque (6 mm).

Tableau 3.10 : Résultats des tests antimicrobiens

les souches	HE	EM	EA	EOH	ATB1	ATB2	F
<i>Micrococcus luteus</i>	8,33 ±0,58	6,17 ±0,29	–	6,67 ±0,29	42,33 ±0,58	29,33 ±1,15	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,67 ±1,15	–	–	–	59,33 ±1,15	36 ±1,41	–
<i>Bacillus cereus</i>	8,67 ±0,58	–	–	6,33 ±0,29	18 ±0,00	22 ±0,00	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	–	–	–	–	–	–
<i>Bacillus subtilis</i>	20,33 ±0,58	–	–	–	47,67 ±0,58	31,67 ±2,89	–
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	–	–	–	–	33 ±1,00	25,33 ±0,58	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,67 ±0,58	6,5 ±0,00	8 ±0,00	7,33 ±0,58	26 ±1,73	30,33 ±1,53	–
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	31 ±1,41	30 ±0,00	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	7 ±1,73	–	–	31 ±0,58	24,33 ±1,15	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	–	–	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–	–	–	–

HE : Huile essentielle

EOH : Ethanol

EM : Extrait méthanolique

ATB1 : Pénicilline G

EA : Extrait aqueux

ATB2 : Lymécycline

F : Chlorhydrate de naftifine

Ces résultats montrent que le pouvoir antimicrobien est en relation avec la nature du produit (huile essentielle, extrait), la nature du solvant et la souche testée. En effet, l'huile essentielle possède un pouvoir antimicrobien important, ce

qui est du selon DAVIDSON [145] à son caractère lipophile conduisant à son accumulation dans les membranes, entraînant ainsi un appauvrissement d'énergie. Concernant la nature du solvant, nous avons constaté que l'extrait méthanolique est plus actif que l'extrait aqueux. Ce ci pourrait être expliqué par le fait que le méthanol qui est le solvant le plus polaire est capable d'extraire le maximum des principes actifs appartenant à diverses classes de métabolites.

Tableau 3.11 Interprétation des résultats des tests antimicrobiens

les souches	HE	EM	EA	EOH	ATB1	ATB2	F
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+	-	+	+++	+++	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	+++	+++	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	+	+++	+++	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	-	-	-	+++	+++	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	-	-	-	+++	+++	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	+	+	+	+++	+++	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+++	+++	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	+++	+++	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-

HE : Huile essentielle

+++ : Inhibition importante

EM : Extrait méthanolique

++ : Inhibition modéré

EA : Extrait aqueux

+ : Inhibition légère

EOH : Ethanol

- : Pas d'inhibition

ATB1 : Pénicilline G

ATB2 : Lymécicline

F : Chlorhydrate de naftifine

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle varie en fonction des souches testées, *Bacillus subtilis* ATCC 9372 est le microorganisme Gram positif le plus sensible vis-à-vis de l'huile essentielle avec une zone d'inhibition estimée à $20,33 \pm 0,58$ (Figure 3.18), il est suivi par la bactérie Gram négatif *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 dont la zone d'inhibition est moins importante.



Figure 3.18 : Photo montrant l'activité de l'huile essentielle sur *Bacillus subtilis* ATCC 937

Les résultats obtenus par l'extrait méthanolique ont montré une faible activité antibactérienne contre *Micrococcus luteus* ATCC 533 (Gram positif) ainsi que pour certaines bactéries à Gram négatif (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Ce pouvoir antimicrobien peut probablement s'accroître en augmentant la concentration de l'extrait méthanolique, car ce dernier contient différents métabolites secondaires réputés pour ce type de propriétés. En effet selon KERHARO et ADAM [146] et N'GUESSAN [147], les polyphénols, notamment les tanins catéchiques sont efficaces contre les bactéries. De même que les alcaloïdes qui sont communément connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [148].

L'extrait aqueux a montré l'activité la plus faible par rapport à l'huile essentielle et l'extrait méthanolique. ; Nous n'avons obtenu aucun effet sur la plupart des souches bactériennes testées.

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et de comparer leur pouvoir inhibiteur par rapport à celui de l'huile essentielle et des extraits étudiés. Nous avons testé l'activité de deux antibiotiques par la même méthode de diffusion sur gélose. La mesure des zones d'inhibition nous montrent que toutes les souches bactériennes exceptée *Enterococcus faecalis* C.203.S sont très sensibles vis-à-vis des antibiotiques, ce qui n'est pas le cas généralement pour l'huile essentielle et les extraits.

La souche *Klebsiella pneumoniae* a montré une sensibilité à l'huile essentielle et aux différents extraits alors qu'*Enterococcus faecalis* s'est montrée résistante dans tous les tests.

L'antifongique, l'huile essentielle et les extraits n'ont pas eu d'effet sur les deux champignons testés.

3.3.2. Activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Afin d'évaluer cette activité de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique des capitules de *Chrysanthemum coronarium* L. et de la comparer aux standards (acide gallique, Quercétine, acide ascorbique, Rutine et α tocophérol), nous avons opté pour la méthode au DPPH. Ce radical libre est de couleur violet sombre, cependant lorsqu'il est piégé par des substances antiradicalaires, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle. Ce virage de couleur et son intensité dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antiradicalaire.

Les résultats exprimés en pourcentage d'activité anti-radicalaire (Appendice D) révèlent que tous les substrats testés sont des antiradicalaires.

La courbe obtenue dans la Figure 3.19 montre que le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique augmente en fonction de la concentration. Ce pouvoir atteint $83 \pm 0,42\%$ pour une concentration de 1mg/ml.

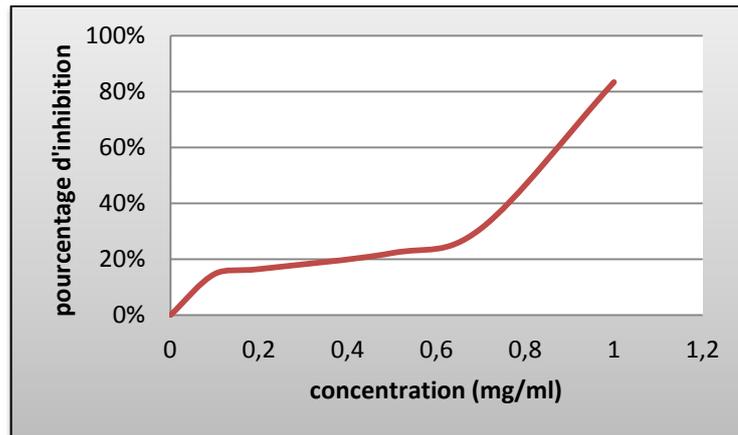


Figure 3.19 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique

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

Plusieurs études ont révélées que la présence des composés phénoliques dans les plantes est associée à leurs activités antioxydantes, cela est probablement due à leurs propriétés réductrices qui les rendent des agents réducteurs ou des donneurs d'hydrogène [149 ; 150].

Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, car la synergie entre les différents produits chimiques doit être prise en considération dans l'activité biologique [133]. En effet, selon ARUOMA et *al.*, [47] et BAHORUN [3], les flavonoïdes sont reconnus pour leurs activités antioxydantes

et d'après les travaux d'OKUDA et *al.*, [54] et d' OKAMURA et *al.*, [55], les tannins catéchiques présentent également des propriétés antioxydantes.

Par rapport à l'extrait méthanolique, l'huile essentielle des capitules du Chrysanthème à couronne a une faible activité antiradicalaire. Cependant, nous avons remarqué que pour une concentration de 120mg/ml, l'huile a piégé 56% des radicaux libres (Figure 3.20).

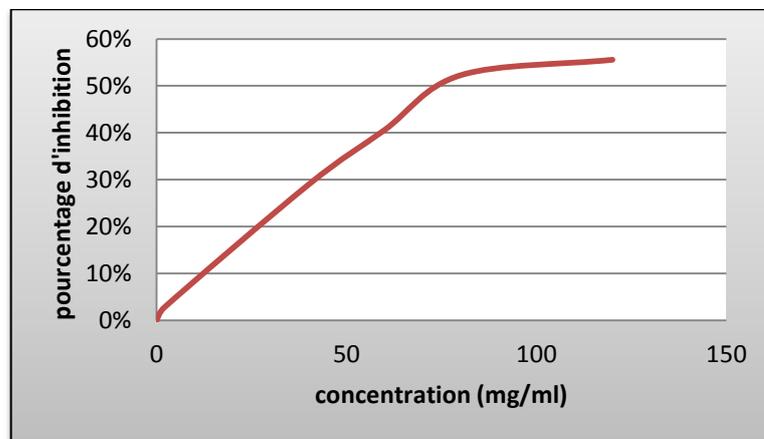


Figure 3.20 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *C.coronarium* possède une activité antiradicalaire qui est liée à sa composition chimique, et il est difficile d'attribuer cette activité à un seul composé puisque un effet de synergie entre les différents composés peut avoir lieu. Les travaux de RUBERTO et BARATTA [151] relatifs à l'activité antioxydante de 98 composants chimiques purs des huiles essentielles ont montré que les hydrocarbures monoterpéniques avaient un effet antiradicalaire significatif.

Les Figures 3.21, 3.22, 3.23, 3.24 et 3.25 illustrent respectivement les variations de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration de l'acide gallique, la Quercetine, l'acide ascorbique, la Rutine et l' α tocophérol. Leurs activités sont plus importantes que celle des produits testés.

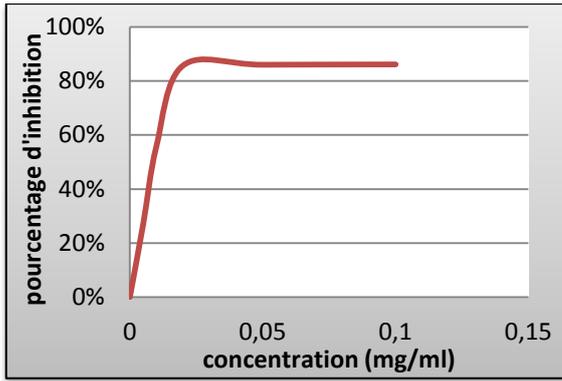


Figure 3.21 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'acide gallique

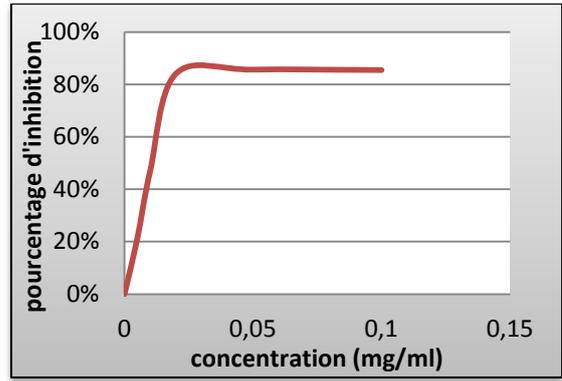


Figure 3.22 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de la

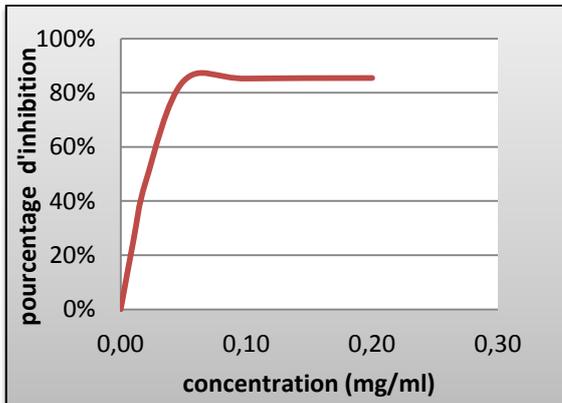


Figure 3.23 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'acide

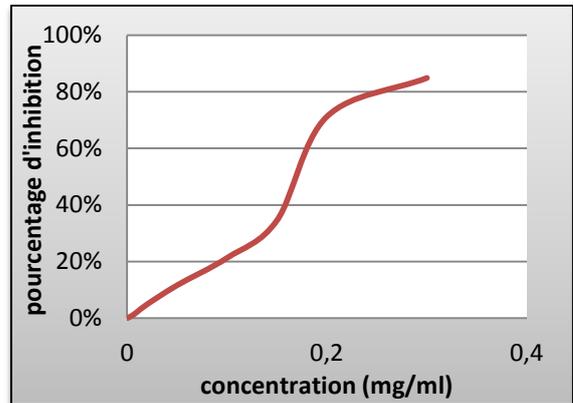


Figure 3.24 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de la

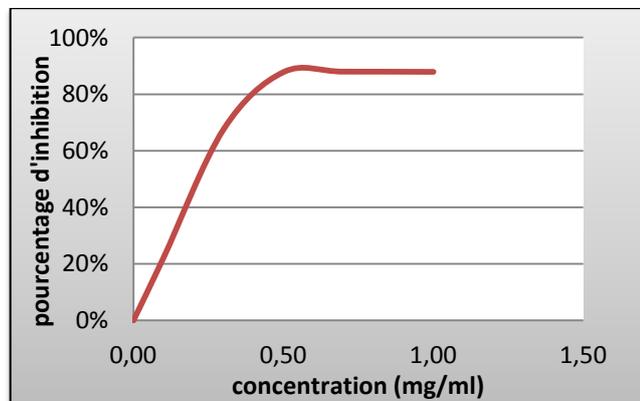


Figure 3. 25 : Pourcentage d'inhibition de l'activité oxydante en fonction de la concentration de l'α tocophérol

L'activité antradradaire est exprimée en EC50 (Tableau 3.12), ce paramètre a été introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs. Il définit la concentration efficace du substrat responsable de la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur) [152]. La plus faible valeur de la EC50 correspond au pouvoir réducteur le plus élevé.

Tableau 3.12 : EC50 des standards, de l'extrait méthanolique et l'huile essentielle

Le substrat	EC50
acide gallique	0,010±0,004 mg/ml
Quercétine	0,012±0,002 mg/ml
acide ascorbique	0,026±0,011 mg/ml
Rutine	0,171±0,022 mg/ml
α tocophérol	0,223±0,013mg/ml
extrait méthanolique	0,850±0,045 mg/ml
huile essentielle	75,33±10,31 mg/ml

Après comparaison des différents EC50 par ANOVA, Nous avons obtenu une différence très hautement significative entre les substances anti-radicalaires ($p=0,000000$, APPENDICE D).

Le test de Tukey a montré que l'acide gallique, la quercétine et l'acide ascorbique ont des valeurs comparables basses (de 0,0105 à 0,0264). La rutine et l' α -tocophérol ont des valeurs comparables mais significativement plus élevées que celles du groupe précédent (0,171 et 0,223). L'extrait méthanolique a une valeur significativement beaucoup plus élevée que toutes les substances testées (0,850) (APPENDICE D). Donc les standards ont présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée, suivie par l'extrait méthanolique ($EC_{50}=0,850\pm 0,045\text{mg/ml}$) et en dernier l'huile essentielle ($EC_{50}=75,33\pm 10,31\text{mg/ml}$).

3.3.3. Activité anti-inflammatoire

Afin d'évaluer le pouvoir anti-inflammatoire de l'huile essentielle, de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux, des expériences ont été réalisées sur des œdèmes de pattes de souris induits par la Carragénine. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux du Clofenac (Tableau 3.13).

Tableau 3.13 : Activité anti-inflammatoire

	Concentration	Réduction de l'œdème (%)
Clofenac	0 mg/kg	0%
	50 mg/kg	-42,23%
	100 mg/kg	-47,31%
	150 mg/kg	-50,26%
Huile essentielle	0 mg/kg	0%
	50 mg/kg	-47,20%
	100 mg/kg	-15,52%
	150 mg/kg	+11,48%
Extrait méthanolique	0 mg/kg	0%
	50 mg/kg	+4,29%
	100 mg/kg	+16,07%
	150 mg/kg	+27,33%
Extrait aqueux	0%	0%
	1,5%	-38,28%
	3%	+48,01%
	8%	+69,96%

Après injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche, une augmentation significative du volume apparaît. Elle est de 19,30% pour le lot témoin T1 et de 21,60% pour le lot témoin T2.

L'administration du Clofenac aux doses respectives : 50, 100 et 150 mg/kg prévient de façon significative l'augmentation du volume des pattes de souris en réduisant l'œdème à 42,23%, 47,31% et 50,26% (Figure 3.26). Cependant, nous avons noté que la dose de 150 mg/kg a été létale pour 2 souris parmi les 5 testées. Cela est probablement dû aux lésions gastriques. En effet les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens, bien qu'ils soient efficaces présentent souvent des effets indésirables lors de leur utilisation [153].

L'huile essentielle des capitules du Chrysanthème à couronne utilisée à une concentration de 50 mg/kg présente un pouvoir anti-inflammatoire plus important que celui du Clofenac. Cependant, l'augmentation de la concentration diminue ce pouvoir, ainsi, à une concentration de 150mg/kg l'huile devient inflammatoire au lieu d'être anti-inflammatoire.

L'extrait méthanolique des capitules du Chrysanthème à couronne utilisé à des concentrations respectives de 50, 100 et 150 mg/kg a provoqué l'augmentation du poids de l'œdème de 4,29%, 16,07% et 27,33%. Quelque soit sa concentration, l'extrait méthanolique se caractérise par un pouvoir inflammatoire.

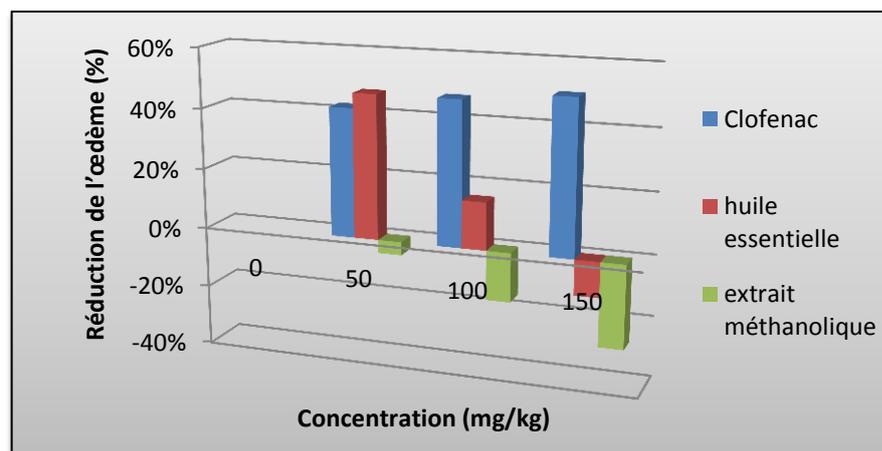


Figure 3.26 : Pourcentage de réduction de l'œdème par le Clofenac, l'huile essentielle et l'extrait méthanolique en fonction de la concentration

L'administration de l'extrait aqueux de *C. coronarium* à une concentration déterminée par les phytothérapeutes (1,5%) provoque une réduction du poids d'œdème de 38,28% (Figure 3.27). Donc, l'efficacité de l'extrait aqueux est légèrement inférieure à celle du Clofenac dosé à 50mg/kg. Nous avons remarqué que des concentrations élevées de l'infusé provoquent une action inverse (action inflammatoire).

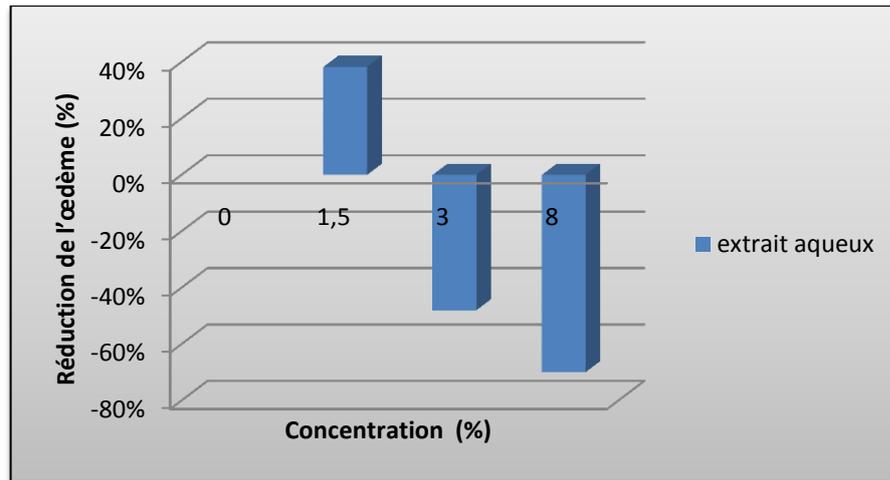


Figure 3.27 : Pourcentage de réduction de l'œdème par l'extrait aqueux en fonction de la concentration

Concernant l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Chrysanthemum coronarium*, elle est probablement due à la présence de composés phénoliques, qui sont selon DUFOUR *et al.*, [154] responsables des effets anti-inflammatoires de certaines plantes.

Les travaux de BIDEET *et al.*, [45] et de BAHORUN [3] ont montré que les flavonoïdes présentent également des propriétés anti-inflammatoires.

Pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux, les solvants utilisés pour l'extraction sont de polarités différentes, le méthanol étant très polaire par rapport à l'eau explique la présence probable de composés inflammatoires au niveau de l'extrait méthanolique. Ces résultats suggèrent que les composés inflammatoires des capitules de *Chrysanthemum coronarium* auraient plutôt un caractère très polaire du fait que l'extrait aqueux n'en contient pas en quantités importantes. C'est pour cette raison qu'il est plus efficace que l'extrait méthanolique dans la prévention de l'apparition de l'œdème.

3.3.4. Test de toxicité

En général, l'espèce humaine est qualitativement similaire aux autres animaux dans la réponse aux molécules toxiques. Quelques effets sont spécifiques de l'espèce humaine tels que les maux de tête [155]. Cette similitude

est la base de l'extrapolation des résultats obtenus sur les animaux. Dans cette étude toxicologique, nous avons utilisé une dose plus élevée que celle à laquelle l'homme sera exposé.

Durant les 15 jours qui ont suivi l'administration orale de l'extrait aqueux, aucune réaction visible n'a été enregistrée. L'administration de l'extrait aqueux de la poudre sèche des capitules du Chrysanthème à couronne à 8 %, n'est pas toxique pour les souris. L'extrait aqueux de *Chrysanthemum coronarium* L. peut donc être utilisé à la dose prescrite par les phytothérapeutes sans risque d'une éventuelle toxicité.

DISCUSSION GENERALE

Les résultats obtenus par l'étude de la surface des fleurons du Chrysanthème à couronne, ont montré l'existence de deux structures responsables de la sécrétion des huiles essentielles : les papilles et les glandes sécrétrices sessiles. Ces dernières se rencontrent également selon SVOBODA et SVOBODA [156], chez la Camomille Romaine (Asteraceae).

Les rendements obtenus lors des différentes extractions de l'huile essentielle, de l'extrait apolaire et de l'extrait polaire des capitules secs du Chrysanthème à couronne sont respectivement de l'ordre de 0,15%, 13,48% et 34,88%.

Le rendement en huile essentielle est compris dans l'intervalle fixé par SENATORE et *al.*, [157] , ces auteurs ont démontré que le rendement des capitules de la même espèce du sud Italien varie entre 0,13 et 0,16%. Les travaux de PEREZ et *al.*, [6] ont montré que ce taux est supérieur à celui de l'Espagne dont le rendement est de 0,1%.

L'huile essentielle de *C. coronarium*, dont les constituants les plus importants sont: 3(10)-Caren-4-ol, ester d'acide aceto-acétique (14,01%), verbenyl acétate (8,196%), 1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-(7,308%), Santolina triène (6,322%), 6-Isopropenyl-3-methoxymethoxy-3-methyl-cyclohexene (5,986%) et (-)-cis-Myrtanol (5,525%), présente un polymorphisme chimique très important. En effet, la teneur et la nature des composés majoritaires varient considérablement d'un échantillon à l'autre en fonction de la répartition géographique des plantes. Nos résultats ont mis en évidence des composés qui ne figurent pas dans le Chrysanthème à couronne d'Espagne. En effet, l'étude menée par ALVAREZ-CASTELLANOS et *al.*, [4] sur l'huile essentielle des

capitules du Chrysanthème à couronne d'Espagne a montré que sa composition chimique est différente de celle que l'on a obtenue. Le Chrysanthème à couronne d'Espagne se caractérise par le Camphre (29,2%), α -Pinène (14,8%), β -Pinène (9,5%), Lyratyl acétate (9,8%), Camphène (5,2%), 2,7,7-triméthylbicyclo-[3,1,1]hept-2-en-6-ol acétate (3,8%), *p*-menthatriène (3,4%), germacrène D (2,7%), α phellandrène (2,6%) et le Chamazulène (0,5%).

D'après les travaux de BASTA et *al.*, [158], l'huile essentielle des capitules de *C. coronarium* de deux régions différentes de la Grèce contiennent essentiellement des monoterpènes oxygénés dont les constituants majeurs sont : trans-chrysanthényle acétate (13.2%), trans-chrysanthényle isovalérate (10.2%) et cis-chrysanthényle acétate (9.9%) pour la première région et le camphre (15.7%), le cis-chrysanthényle acétate (9.1%) et le trans-chrysanthényle acétate (7.8%) pour la deuxième région.

L'huile essentielle des capitules du Chrysanthème à couronne de d'Italie contient selon FLAMINI et *al.*, [159], les composés majoritaires suivants : Camphre (22.1%) et cis-chrysanthényle acétate (19.9%).

Les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif sont tributaires de certains facteurs écologiques, de la partie de la plante utilisée, de son âge, de la période de son cycle végétatif, ou même des facteurs génétiques [160 ; 161 ; 162 ; 163 ; 164].

Nous avons également déterminé la teneur en eau (81,36%), celle-ci concorde avec celle déterminée par FUINEL [165]. En effet, pour cet auteur la présence de l'eau constitue 70 à 90% de son poids. Le taux d'humidité qui est de 10,98% indique que le séchage a été convenablement réalisé. Le pourcentage des cendres des capitules du Chrysanthème à couronne avoisine 7,88%, cette valeur est légèrement inférieure à celle des capitules d'une espèce voisine : *Spilanthes oleraceae* Jacq. (Compositae), qui selon est MAIGA [166] de 9,0%±0,2.

La concentration des composés phénoliques dans les capitules secs du Chrysanthème à couronne est du même ordre que celle de certaines plantes médicinales Algérienne de la famille des Astéracées. Elle varie selon DJERIDANE et *al.*, [167] entre 13.06 ± 0.40 mg de GAE/g et 32.32 ± 0.2 mg de GAE/g. Ces résultats confirment que l'abondance des composés phénoliques est une caractéristique de cette famille.

Concernant les flavonoïdes et les flavonols, leur présence est importante avec des teneurs respectives de 13,88 mg/g de capitules secs en équivalent Rutine et 12,11mg/g de fleurs sèches en équivalent Rutine. Les flavonols constituent donc la majeure partie des flavonoïdes.

Les capitules de *Chrysanthemum coronarium* L. sont riches en alcaloïdes. Ils contiennent aussi des tannins catéchiques et ne renferment pas des saponines.

L'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle des capitules du Chrysanthème à couronne s'est montrée exceptionnellement importante contre *Bacillus subtilis*. Cependant, cette huile n'a eu aucun effet inhibiteur sur la croissance fongique des deux espèces testés, mais selon ALVAREZ-CASTELLANOS et *al.*, [4], l'huile essentielle des capitules de *C.coronarium* inhibe la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes, notamment : *Pythium ultimum*, *Aspergillus flavus* et *Alternaria sp.*

L'extrait méthanolique s'est montré inefficace contre la majorité des souches testées avec une faible inhibition de la croissance de trois souches seulement. Ces résultats sont similaires à ceux d'URZUA et MENDOZA [168], qui ont trouvé que l'extrait méthanolique des capitules frais du Chrysanthème à couronne ne possède aucun effet antimicrobien.

Les activités antiradicalaires des différentes substances étudiées s'enchaînaient selon l'ordre décroissant suivant : acide gallique ($0,0105 \pm 0,0039$ mg/ml) > Quercetine ($0,0116 \pm 0,0016$ mg/ml) > acide ascorbique ($0,0264 \pm 0,0110$ mg/ml) > Rutine ($0,171 \pm 0,022$ mg/ml) > α tocophérol ($0,223 \pm 0,013$ mg/ml) > l'extrait méthanolique ($EC_{50} = 0,850 \pm 0,045$ mg/ml) > l'huile

essentielle ($EC_{50}=75,33\pm 10,31$ mg/ml). Donc l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *C. coronarium* est plus faible que celle de l' α tocophérol. Ce résultat est semblable à celui de DEBA et *al.*, [169], qui ont trouvé que l'huile essentielle des capitules de *Bidens pilosa* (Asteraceae) avait une EC_{50} de 50 μ g/ml, alors que celle de l' α tocophérol était de 36 μ g/ml.

L'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Chrysanthemum coronarium* L. possèdent une activité anti-inflammatoire comme beaucoup d'autres Asteraceae telle que : *Sonchus oleraceus* [170], *Bidens tripartita* L. [171] et *Baccharis dracunculifolia* [172].

L'infusé des capitules de *Chrysanthemum coronarium* L. à 8% n'est pas toxique. Cela confirme les résultats obtenus par HMAMOUCHE [11] qui a décrit cette plante comme étant médicinale, aromatique et non toxique.

CONCLUSION

Les travaux de recherche entrepris au cours de cette étude ont permis de mettre en lumière l'aspect macroscopique et microscopique du Chrysanthème à couronne, ainsi que la caractérisation de certains métabolites secondaires et la mise en évidence de certaines propriétés thérapeutiques.

L'étude microscopique a montré la présence des glandes sécrétrices sessiles et des papilles responsables de la sécrétion de l'huile essentielle au niveau des capitules du Chrysanthème à couronne.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle du Chrysanthème à couronne (*Chrysanthemum coronarium* L.) a permis d'identifier cinquante-sept composés, ce qui correspond à 89,46% de la totalité de l'huile. Les composés majoritaires sont : 3(10)-Caren-4-ol, ester d'acide aceto-acétique (14,01%), verbenyl acétate (8,196%), 1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ène, 2-(2,4-hexadiénylidène)- (7,308%), *Santolina* triène (6,322%), 6-Isopropenyl-3-méthoxyméthoxy-3-méthyl-cyclohexène (5,986%) et (-)-cis-Myrtanol (5,525%).

Le dosage des composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanolique a révélé la présence de quantité considérable estimée de 20,410±0,713 mg d'équivalent d'acide Gallique/g de matière végétale sèche, avec une teneur élevée en flavonoïdes (13,8806±2,4868 mg/g de capitules secs en équivalent Rutine), ainsi qu'une présence importante des flavonols (12,1114±0,0004 mg/g de fleurs sèches en équivalent Rutine). Le contenu en alcaloïdes est de 10,3 mg/g de capitules secs. Qualitativement, les analyses effectuées ont démontré la présence des tannins catéchiques et l'absence des saponines.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux testés sur onze micro-organismes par la méthode de diffusion sur Gélose, a montré une inhibition variable vis-à-vis de ces souches, avec un pouvoir antimicrobien remarquable de l'huile essentielle contre *Bacillus subtilis* ATCC 937.

L'étude de l'activité anti-radicalaire par la méthode de DPPH a dévoilé les propriétés que possèdent l'extrait méthanolique et l'huile essentielle à piéger les radicaux libres, avec un EC50 plus important pour l'extrait méthanolique ($0,850 \pm 0,045$ mg/ml) que pour l'huile essentielle ($75,33 \pm 10,31$ mg/ml).

L'huile essentielle et l'extrait aqueux du Chrysanthème à couronne présentent une efficacité sur l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine sans aucun effet de toxicité gastrique apparent, avec une meilleure efficacité de l'huile essentielle par rapport à l'extrait aqueux. Ces résultats posent les bases scientifiques de l'utilisation des capitules de *C. coronarium* pour prévenir les processus inflammatoires.

L'administration de l'extrait aqueux de la poudre sèche des capitules de *Chrysanthemum coronarium* L. à une dose beaucoup plus élevée que celle prescrite par les phytothérapeutes n'est pas toxique.

Le *Chrysanthemum coronarium* est une plante dont le potentiel pharmacologique n'est pas suffisamment étudié. Une exploitation de ses propriétés pharmacologiques implique une recherche plus poussée de ses principes actifs, ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

% : Pourcentage

°C : Degrés Celsius

ATCC : American Type Culture Collection

CG/MS : chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

cm : centimètre

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil

g : gramme

ml : millilitre

mm : millimètre

nm : nanomètre

pH : potentiel d'hydrogène

T_f : Température de fusion

T_i : Température initiale

UV : Ultra Violet

µl : microlitre

GLOSSAIRE

Anthrax	: gros furoncle accompagné d'une infection staphylococcique
Anticarcinogène	: produit pouvant prévenir le cancer.
Antitussif	: qualifie un traitement contre la toux.
Astringent	: produit resserrant les tissus et diminuant les sécrétions.
Catarrhe	: inflammation des muqueuses se traduisant par une hypersécrétion.
Cholagogue	: qualifie une substance à effet cholérétique, évacuant la bile.
Cystite	: inflammation de la vessie.
Dépurative	: qui épure l'organisme.
Fébrifuge	: qui combat et fait tomber la fièvre.
Goutte	: maladie due à un excès d'acide urique et affectant les articulations.
Iatrogène	: traitements thérapeutiques provoquant des maladies.
Mydriatique	: substance qui provoque la mydriase, dilatation de la pupille.
Narcotique	: composé qui a des propriétés sédatives.
Onguent	: pommade à base de résine et de corps gras.
Révulsive	: qui fait affluer le sang.
Sédatif	: se dit de substances agissant contre la douleur.
Spasmolytique	: substance destinée à éviter ou réduire les contractions spasmodiques.
Stomatite	: inflammation de la muqueuse de la bouche.
Teinture	: c'est une macération d'une plante dans de l'alcool.
Tonique	: substance qui fortifie.

APPENDICE B

MATERIEL UTILISE

- Agitateur magnetique (HANNA)
- Ampoule à décanter 500ml
- Appareil d'hydrodistillation Cleavenger
- Bain marie (nuve nb 20)
- Balance (Kern Kb)
- Balance de précision (Kern ALS 220-4N)
- Ballon 250, 500, 1000 ml
- Bécher 100, 500 ml
- Bistouri
- Boîtes de pétri
- Centrifugeuse (nuve NF 200)
- Chauffe ballon
- Chromatographe (HP-6890 sériel) couplé à un spectromètre de masse (5973 N MS)
- Ciseau
- Creuset en platine
- Disques d'antibiogramme stériles
- Entonnoir en verre
- Erlen Mayer 100, 500 ml
- Etuve d'incubation (nuve EN 50)
- Etuve de stérilisation (nuve FN 400)
- Four à moufle
- Loupe binoculaire (CARL ZEISS)
- Loupe binoculaire à camera (Motic ST-30)

- Micro pipette 100 μ l
- Micro pipette 1000 μ l
- Micro pipette 50 μ l
- Microscope photonique à camera (Motic BA 200)
- Microscope photonique binoculaire (Motic)
- papier aluminium
- Papier filtre
- pH mètre (HANNA pH 211)
- Pince
- Pipettes graduées de 1, 5, 10, 20 et 50 ml
- Pipettes pasteurs
- Plaque chauffante (Stuart CB162)
- Portoir
- Réfrigérant à eau
- Rota vapeur (Stuart RE300)
- Sonde de gavage pour souris
- Spatule
- Spectrophotomètre UV-VIS (WPA Lightwavell)
- Tube à essai
- Vortex



Souris albinos NMRI (Original, 2010)

APPENDICE C

REACTIFS UTILISES

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil
- Acétate de sodium
- Acide acétique
- Acide ascorbique
- Acide chloridrique
- Acide Galique
- Bicarbonate de Sodium
- Carbonate de sodium
- Carragénine
- Chlorhydrate de naftifine
- Chloroforme
- Clofenac
- Eau distillée
- Eau physiologique
- Éther de pétrole
- Folin Ciocaltheu
- Gélose nutritive
- Hypochlorite de sodium
- Lymécycline
- Méthanol
- Milieu Muller Hinton
- Milieu Sabouraud
- Pénicilline G
- Quercetine
- Rouge Congo
- Rutine
- Trichloride d'aluminium

- Tween 80
- Vert de méthyle
- α tocophérol

APPENDICE D

Teneur en eau

	PF (en g)	PS (en g) après 24h	PS (en g) après 48h	teneur en eau %
1^{er} essai	30	5,5700	5,5500	81,5000%
2^{ème} essai	30	6,0400	5,7700	80,7667%
3^{ème} essai	30	5,5800	5,4500	81,8333%
Moyenne	30	5,7300	5,5900	81,3667%
Ecart-type	0	0,2685	0,1637	0,0055

PF: Poids frais; **PS:** Poids sec.

Taux de cendres

	PI (en g)	PC (en g)	teneur en cendre %
1^{er} essai	2,0004	0,1593	7,9634%
2^{ème} essai	2	0,1558	7,7900%
3^{ème} essai	2	0,1578	7,8900%
Moyenne	2,0001	0,1576	7,8811%
Ecart-type	0,0002	0,0018	0,0009

PI: Poids initial; **PC:** Poids des cendres.

Rendement en huiles essentielles

	Poids des fleurs sèches (g)	poids de l'huile essentielle (g)	Rendement %
1^{er} essai	120	0,1884	0,1570%
2^{ème} essai	120	0,1941	0,1618%
3^{ème} essai	120	0,1735	0,1446%
Moyenne	120	0,1853	0,1544%
Ecart-type	0	0,0106	0,0001

Les absorbances de l'acide Gallique en fonction des concentrations

Concentration de l'acide Gallique (µg/ml)	Absorbance du 1^{er} essai	Absorbance du 2^{ème} essai	Absorbance du 3^{ème} essai	Moyenne	Ecart- type
0	0	0	0	0,0000	0,0000
10	0,091	0,094	0,065	0,0833	0,0159
20	0,202	0,194	0,172	0,1893	0,0155
30	0,303	0,304	0,284	0,2970	0,0113
40	0,414	0,419	0,39	0,4077	0,0155
50	0,534	0,53	0,502	0,5220	0,0174
60	0,622	0,652	0,633	0,6357	0,0152
70	0,738	0,788	-	0,7630	0,0354
80	0,899	0,915	-	0,9070	0,0113
100	1,135	1,144	-	1,1395	0,0064

Les absorbances et les concentrations des polyphénols

	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai	Moyenne	Ecart-type
Absorbance de l'extrait méthanolique (1mg/ml)	0,621	0,644	0,666	0,6437	0,0225
Concentration des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique (mg de GAE/g)	58,8869	60,3941	61,4778	60,2529	1,3012
Concentration des composés phénoliques dans les fleurs sèches (mg de GAE/g)	20,5398	21,0655	21,4435	21,0162	0,4539

Les Absorbances et les teneurs en flavonoïdes

	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai	Moyenne	Ecart-type
Absorbance de la Rutine	0,083	0,019	0,046	0,0493	0,0321
Absorbance de l'extrait méthanolique	0,062	0,013	0,044	0,0397	0,0248
teneur en flavonoïdes (mg/mg de l'extrait méthanolique en équivalent Rutine)	0,0373	0,0342	0,0478	0,0398	0,0071
teneur en flavonoïdes (mg/mg de fleurs sèches en équivalent Rutine)	0,0130	0,0119	0,0167	0,0139	0,0025

Les Absorbances et les teneurs en flavonols

	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai	Moyenne	Ecart- type
Absorbance de la Rutine	2,4133	2,4105	2,4103	2,4114	0,0017
Absorbance de l'extrait méthanolique	1,6766	1,6737	1,6735	1,6746	0,0017
teneur en flavonols (mg/mg de l'extrait méthanolique en équivalent Rutine)	0,0347	0,0347	0,0347	0,0347	0,0000
teneur en flavonols (mg/mg de fleurs sèches en équivalent Rutine)	0,0121	0,0121	0,0121	0,0121	0,0000

L'activité antiradicalaire

L a nature de la substance chimique	Concentration (mg/ml) de l'antiradicalaire	Pourcentage d'inhibition de l'oxydation	Ecart-type
α-Tocophérol	0,00	0%	0,0000%
	0,10	22%	2,1662%
	0,30	68%	1,5796%
	0,50	88%	0,5036%
	0,70	88%	0,5343%
	1,00	88%	0,0707%

L a nature de la substance chimique	Concentration (mg/ml) de l'antiradicalaire	Pourcentage d'inhibition de l'oxydation	Ecart-type
Acide ascorbique	0,00	0%	0,0000%
	0,01	25%	1,8844%
	0,02	47%	1,9541%
	0,05	84%	0,3661%
	0,10	85%	0,1921%
	0,20	85%	0,0994%
Rutine	0	0%	0,0000%
	0,005	1%	0,6801%
	0,01	2%	0,8238%
	0,02	5%	1,0329%
	0,05	12%	0,7792%
	0,1	21%	0,2803%
	0,15	35%	1,6700%
	0,2	71%	4,2424%
	0,3	85%	0,0977%
Acide gallique	0	0%	0,0000%
	0,005	27%	0,1928%
	0,01	56%	0,4301%
	0,02	86%	0,1484%
	0,05	86%	0,1267%
	0,1	86%	0,0296%
Quercitine	0	0%	0,0000%
	0,005	21%	1,2580%
	0,01	47%	1,4183%
	0,02	84%	0,2198%
	0,05	86%	0,2886%
	0,1	85%	0,2234%

L a nature de la substance chimique	Concentration (mg/ml) de l'antiradicalaire	Pourcentage d'inhibition de l'oxydation	Ecart-type
Extrait méthanolique	0	0%	0,0000%
	0,1	15%	6,1461%
	0,2	16%	1,3536%
	0,5	22%	1,4632%
	0,7	31%	0,9699%
	1	83%	0,4180%
Huile essentielle	0	0%	0,0000%
	2	3%	0,4986%
	40	29%	1,1381%
	60	41%	0,4042%
	80	52%	0,2021%
	120	56%	1,3468%

ANOVA des EC50 des différentes substances

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,152	5	12	,129

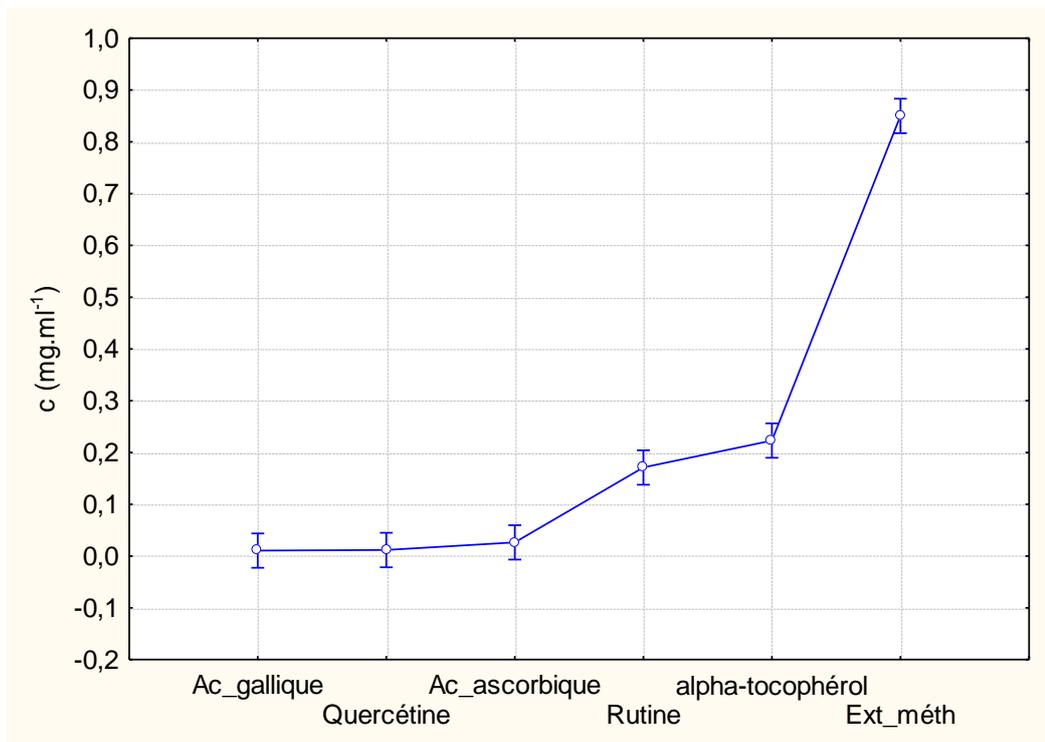
Les variances sont homogènes ($p=0,129>0,05$)

Univariate Tests of Significance for c (Spreadsheet Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,83527	1	0,83527	1195,62	0,00000
Produit	1,57195	5	0,31439	450,02	0,00000
Error	0,00838	12	0,00069		

Test de Tukey HSD

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Ac_gallique	3	,010500		
Quercétine	3	,011600		
Ac_ascorbique	3	,026400		
Rutine	3		,171000	
α-tocophérol	3		,223000	
Ext_méth	3			,850000
Sig.		,973	,227	1,000

EC50 différentes substances



REFERENCES

1. Roux, D., « Les nouvelles plantes qui soignent », Alpen Editions s.a.m, (2005), 95 p.
2. Cazaubon, M ., « Programme jambes légères », Alpen, S.A.M, (2005), 95p.
3. Bahorun, T., « Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle », Food and Agricultural Research Council, (1997), 83-94.
4. Alvarez-Castellanos, P.P., Bishop, C.D., Pascual-Villalobos, M.J., « Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens », Phytochemistry, V.57, (2001), 99-102.
5. Shonouda, M.L., Osman, S., Salama, O. et Ayoub, A., « Insecticidal effect of *Chrysanthemum coronarium* L. flowers on the pest *Spodoptera littoralis* boisd and its parasitoid *Microplitis rufiventris* kok. With identifying the chemical composition », journal of applied sciences, V.8, n° 10, (2008), 1895-1866.
6. Pérez, M.P., Navas-Cortés, J.A., Pascual-Villalobos, M.J. et Castillo, P. « Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes », Plant Pathology,(2003), V. 52, 395–401.

7. Sulas, L., Re, G.A., Molle, G., et Ligios, S., « Chrysanthemum coronarium L.: A new pasture species for Mediterranean forage systems », Options Méditerranéennes, (1999), V. 39, 83-86.
8. Jiofack, T., Ayissi, I., Fokunang, C., Guedje, N. et Kemeuze, V., « Ethnobotany and phytomedicine of the upper Nyong Valley forest in Cameroon », African Journal of Pharmacy and pharmacology, (2009), V.3, n°4, 144-150.
9. Jiofack, T., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V., Fongnzossie, E., Nkongmeneck, B.A., Mapongmetsem, P.M. et Tsabang, N., « Ethnobotanical uses of medicinals plants of two ethnoecological regions of Cameroon ». International Journal of Medicine and Medical Sciences, (2010), V.2, n°3, 60-79.
10. Aquaron. M., « Relations entre les hommes et les plantes médicinales », BIPEDIA, (septembre 2005), n° 24.4, 8p.
11. Hmamouchi. M., « Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc », Options Méditerranéennes, V. 23, (1997), 89-108.
12. Lyons, L. et Nambiar, D., « Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH », Réseau canadien d'infotraitements sida (CATIE), (2005), 56p.
13. Grunwald, J. et Janicke, C., « Guide de la phytothérapie », Marabout, (2006), 416p.
14. Rwangabo, P.C., « La médecine traditionnelle au Rwanda », Karthala, (1993), 258p.
15. Festy, D., « Ma bible des huiles essentielles », Leduc.S, (2007), 549p.

16. Volak, J., Stodola, J. et Severa F., « Plantes médicinales », Grund, Paris, (1987), 319p.
17. Vigneau, C., « Plantes médicinales : Thérapeutique – Toxicité », Masson, Paris, (1985), 290p.
18. Roux, D. et Catier, O., « Botanique, pharmacognosie, phytothérapie », Editions Porphyre, (2007), 141 p.
19. Schauenberg, P., Paris, F., « Guide des plantes médicinales », Delachaux & Niestlé, Paris, (2005), 396p.
20. Valnet, J., « Phytothérapie: traitement des maladies par les plantes », Maloine. S.A , (1983), 942p.
21. Beloued, A., « Plantes médicinales d'Algérie », Office des publications universitaires, Alger, (2001), 277p.
22. Nogaret-Ehrhart, A-S., « La phytothérapie : se soigner par les plantes », Groupe Eyrolles, Paris, (2006), 191p.
23. Poletti, A., « Fleurs et plantes médicinales », Delachaux & Niestlé, Paris, (1987), 191p.
24. Raynaud, J., « Prescription et conseil en phytothérapie », Lavoisier, (2005), 215p.
25. Bernadet, M., « La phyto-aromatothérapie pratique », Bangles, France, (1983), 384p.
26. Frély, R., « Votre beauté par les plantes », Editions de Borée, (2006), 255 p.

27. Scimeca, D. et Tétau, M., « Votre santé par les plantes: Le guide phyto utile pour toute la famille », Alpen, (2005), 136p.
28. Kartal. N., Sokmen. M., Tepe. B., Daferera. D., Polissiou. M. et Sokmen. A., « Investigation of the antioxidant properties of FerulaorientalisL.with suitable extraction procedure », Food Chemistry, n° 100, (2007), 584-589.
29. Aiache, J-M., Beyssac, E., Cardot, J-M., Hoffart, V. et Renoux, R., « Initiation à la connaissance du médicament », Elsevier Masson, (2008), 413p.
30. Richter, G., « Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie », Presses polytechniques et universitaires, Romandes, (1993), 292p.
31. El Abed, D. et Kambouche, N., « Les huiles essentielles », Dar El Gharb, Oran, (2003), 91p.
32. Baaliouamer, A., Thèse de doctorat d'état Es-sciences. Université d'Alger. U.S.T.H.B. (1987).
33. Bruneton, J., « Eléments de phytochimie et de pharmacologie », Lavoisier Technique et Documentation, Paris, (1997), 608p.
34. Capo, M., Courilleau, V. et Valette, C., « Chimie des couleurs et des odeurs », Culture et techniques, (1990), 204p.
35. Moro Buronzo, A., « Grand guide des huiles essentielles. Santé beauté bien-être », Hachette Pratique, (2008), 254p.
36. Seu-Saberno, M. et Blakeway, J., « La mousse de chêne, une base de la parfumerie », Pour la science, Edition Française de science American, (1987), Mai, 83.

37. Hopkins, W.G., « Physiologie végétale », De Boeck Université, Bruxelles, (2003), 532 p.
38. Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V., « Les polyphénols en agroalimentaire », Lavoisier, (2006), 398p.
39. Didry, N., Pinkas, M. et Torck, M., « Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de divers espèces de grindelia ». *Pl. Med. Phytother*, (1982), V. XVI, 7 - 15.
40. Ravn, H., Andary, C., Kovacs, G. et Molgaard, P., « Caffeic acid esters as in vitroinhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi ». *Biochem. Syst. Ecol*, (1984), V.17, 175 - 184.
41. Hayase, F. et Kato, M., « Antioxidant compounds of sweet potatoes ». *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* (1984), V.30, 37 - 46.
42. Mabry, T.J. et Ulubelen, A., « Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans ». *J. Agric. Food Chem.* (1980), V. 28, 188 - 196.
43. Stavric, B. et Matula, T.I., « Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health », (1992), 274 - 294. *In* : Ong A.S.H et Packer L. « Lipid soluble and antioxidants: Biochemistry and clinical applications ». Basel, Birkhauser Verlag.
44. Das, HC., Wang, J.H. et Lien, E.J., « Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids : A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis », (1994), 133 - 136. *In*: Jucker, E., « Progress in Drug Research », Basel, Birkhauser Verlag.
45. Bidet, D., Gaignault, J.C., Girard, P. et Trotin, F., « Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de

- l'acide arachidonique : Les flavonoïdes ». L'actualité chimique, (1987),89 - 97.
46. Bruneton, J., « Pharmacognosie et phytochimie des Plantes médicinales », Lavoisier, Paris, 1993.
47. Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Butler, J et Halliwell, B., «Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals ». Free Rad, (1995), V. 22, 187 - 190.
48. Masquelier, J., Dumon, M.C. et Dumas, J., «Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques ». Acta therapeutique, (1979), V.1, 101 - 104.
49. Bahorun, T., Trotin, F., Pommery, J., Vasseur, J. et Pinkas, M., « Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts ». Planta Med, (1994), V. 60, 323 - 328.
50. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C. et Pinkas, M., « Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations ». Drug Research, (1996), V.46, n°11, 1086 - 1089.
51. De Oliveira, M.M., Sampaio, M.R.P., Simon, F., Gibert, B. et Mors, WB., « Antitumor activity of condensed flavenols », An. Acad. Brasil, (1972), V. 44, 41 - 44.
52. Brownlee, HE., Hedger, J. et Scott, IM., « Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa* », *Phys. Mol. Plant Pathol*, (1992), V. 40, 227 - 232.
53. Kreofsky, T., Schlager, J.W., vuk-Pavlovic, Z., Abraham, R.T. et Rohrbach, MS., « Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from

- rabbit resident alveolar macrophages ». Am. J. Resir. Cell. Mol. Biol, (1992), V.7, 172 - 181.
54. Okuda, T., Kimura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., Okuda, H. et Arichi, S., « Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver ». Chem. Pharm. Bull, (1983), V. 31, 1625 - 1631.
55. Okamura, H., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M. et Takahara, Y., « Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata* », Phytochem. (1993), V.33, 557 – 561.
56. Martiné, M.C. et Seiller, M., « Actifs et additifs en cosmétologie », Technique et documentation, (1999), 632p.
57. Macheix, J-J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C., « Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique », PPUR presses polytechniques, (2005), 192 p.
58. Verbois, S., « Plantes et herbes aromatiques. Saveurs et vertus », Fernand Lanore, Paris, (2003), 234 p.
59. Verdrager, J., « Les plantes médicinales dans les traitements modernes », Maloine. S.A, (1978), 227p.
60. Padrini, F. et Lucheroni, M.T., « Le grand livre des huiles essentielles », DeVecchi S.A , Paris, (2003), 206p.
61. Thurzova, L., « Les plantes santé qui poussent autour de nous », Bordas, (1985), 268p.
62. Fournier, P., « les quatre flores de la France », Paul LECHEVALIER, Paris, (1961), 1105p.

63. Ozenda, P., « Flore du sahara », centre de la recherche scientifique, Paris, (1983), 622p.
64. Kothe, H.W., « 1000 plantes aromatiques et médicinales », Terres Editions, (Septembre 2007), 336p.
65. Chevallier. A., « Encyclopédie des plantes médicinales », Larousse, (2001),335 p.
66. Boullard. B., « Plantes médicinales du monde: croyances et réalités » De Boeck Secundair, (2001), 660 p.
67. Shi,G.B., Zhao,M.H., Zhao,Q.C., Huang,Y. and Chen,Y.F., « Mechanisms involved in the antinociception of petroleum ether fraction from the EtOH extract of *Chrysanthemum indicum* in mice » Phytomedicine, (2011), V. 18, , 609-616.
68. Guittonne, G-G. et Huon, A., « Connaitre et reconnaitre la flore et la végétation méditerranéennes »,Edilarge, France, (1992), 331p.
69. Bayer, E., Buttler, K.P., Finkenzeller, X. et Grau, G., « Guide de la flore méditerranéenne : caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces », Delachaux et Niestlé, Paris, (1990), 287p.
70. Schonfelder, I. et Schonfelder, P., « Guide de la flore méditerranéenne », Hatier, (1989), 314p.
71. Blamey, M. et Grey-Wilson, C., « Toutes les fleurs de Méditerranée : les fleurs, les graminées, les arbres et arbustes », Delachaux et Niestlé, Paris, (2000), 560p.

72. Couplan, F., « Véritable régime crétois », Editions Ellebore, (2009), 342 p.
73. Roberts, M.G., « Edible & medicinal flowers », New Africa Books, (2000), 160 p.
74. Seidemann, J., « World spice plants », Springer, (2005), 591p.
75. Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. et Stevens, P., « Botanique systématique : une perspective phylogénétique », De Boeck université S.A, (2002), 467p.
76. Spichiger, R-E., « Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales »,PPUR presses polytechniques, (2002), 413 p.
77. Kowal, R-R., « Keys to the asteraceae of wisconsin », (2007).
78. Muley, BP., Khadabadi, SS. et Banarase, NB., « Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae) », Tropical Journal of Pharmaceutical Research, Vol. 8, n° 5, (October 2009), 455-465.
79. Chooi Ong, H., « Vegetables for health and Healing », Utusam, (2008), 244p.
80. Staples,G. et Kristiansen, M.S., « Ethnic culinary herbs: a guide to identification and cultivation in Hawaii », University of Hawaii Press, (1999), 122 p.
81. Quezel, P. et Santa, S., « Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales », Centre national de la recherche scientifique, (1963), 1165p.

82. Munro, D.B. et Small, E., « Les légumes du Canada », NRC Research Press, (1998), 436p.
83. Allimuthu, M. et Vennila, M., « Catalogue of Siddha Anti-Malarial Herbs », (2005), 2p.
84. Clark, A.M., « Natural products as source for new drugs », Pharmacol, V. 13, (1996), 1996 p.
85. Kirby, G.C., « Medicinal plants and the control of protozoal disease , with particular reference to malaria ». Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, V. 90, (1996), 605-609.
86. Hostettmann, K. et Marston, A., « Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives ». Phytochem, V. 1, (2002), 275-285.
87. Cowan, M.M., « Plant products as antimicrobial agents ». Clin. Microbiol, V. 12, (1999),564-582.
88. Duarte, M.C.T., « Activité antimicrobienne de plantes médicinales et aromatiques utilisées au Brésil », MULTICIÊNCIA, V. 7,(Octobre 2006).
89. Valnet, J., « Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes », Maloine, (1984), 544p.
90. Sanchez-Moreno. C., « methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems ». *Food Science and Technology International*, (2002), V.8, n°3, 121-137.
91. Marc. Fr., Davin. A., Deglène-Benbrahim. L. et Ferrand C. « Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments », *médecine sciences*, (2004), V.20, n°4,458-463.

92. Huang. D., Ou. B. et Prior. R. L., « The chemistry behind antioxidant capacity assays ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,(2005), n°53, 1841-1856.
93. Popovici. C., Saykova.I. et Tylkowski. B., «Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH »,e-Revue de génie industriel, (2009), n° 4.
94. Loriol, M. et Hervé, N., « 100 Conseils de comptoir », Editions Porphyre, (2008), 213 p.
95. Cano, N., « Traité de nutrition artificielle de l'adulte », シュプリンガー・ジャパン株式会社, (2007), 1189 p.
96. Causse, C., « Les secrets de santé des antioxydants », Alpen Editions s.a.m, (2005), 95 p.
97. Karp, G., Bouharmont, J. et Wissocq, J-C., « Biologie cellulaire & moléculaire », De Boeck Université, (2004), 850 p.
98. Edeas, M., « Les secrets de santé du thé », Alpen Editions s.a.m, (2005), 95 p.
99. Duclos, A., « Les aliments 100% santé », Dauphin, (2007), 158p.
100. Poirier, j., « L'indispensable pour vivre en santé », Merlin Éditeur, (2004), 242 p.
101. Stevens, A., Lowe, J-S.et Young, B., « Anatomie pathologique: Atlas de Wheater », De Boeck Université, (2004), 304 p.

102. Prescott, L-M., Harley, J-P., Klein, D-A., Bacq-Calberg,C-M. et Dusart, J., « Microbiologie », De Boeck Université, (2003), 1164 p.
103. Cohen, Y. et Jacquot, C., « Pharmacologie », Elsevier Masson, (2008), 487 p.
104. Muster, D., « Thérapeutique médicale buccodentaire: moyens et méthodes », Elsevier Masson, (2004), 288 p.
105. Martini, M-C., « Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie », Lavoisier, (2003), 401p.
106. Sofowora, A., « Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique », KARTHALA Editions, (2010), 378 p.
107. Patrick, G-L. et Depovere, P., « Chimie pharmaceutique », De Boeck Université, (2002), 629 p.
108. Clevenger, J. F., « Apparatus for the determination of volatile oil », Journal of the American Pharmaceutical Association, V. 17, n° 4, (April 1928), 345–349.
109. Walton, N-J. etBrown, D-E., « Chemicals from plants:perspectives on plant secondary products », World Scientific, (1999), 425 p.
110. Zerrad, W., Hillali, S., Mataoui, B., S. EL Antri, S. et Hmyene A., « Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur », (2006), Congrès International de Biochimie, Agadir, 371-376.
111. Gaywe, R., « Contribution à l'étude chimique et pharmacologique de *Adansonia digitata* L », Thèse de Doctorat d'état en pharmacie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, (1987).

112. Pinta, M., « Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux : Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique », Oléagineux, n° 2, (Février, 1973), 87-92.
113. Diarra, M-N., « Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *Spilanthes oleracea*. Jacq. (Asteraceae) », Thèse de doctorat d'état en Pharmacie, Université de Bamako, Mali, (2003), p78.
114. Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K. et Kujala, T.S., « Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds », Journal of Agricultural and Food Chemistry, n° 47, (1999), 3954-3962.
115. Mohd-Esa, N., Hern, F.S, Ismail, A, et Yee C.L., « Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds », Food Chemistry, n° 122, (2010), 1055-1060.
116. Kumaran, A .et Karunakaran, J., « In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India », LWT, n° 40, (2006), 344-352.
117. Abdel-Hameed, E-S.S., « Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples », Food Chemistry, n°114, (2009), 1271-1277.
118. Rizk, A.M., Hammouda, F.M.et Ismail, S.I., « Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. II. Lipid fraction », Plant Med., (1974), V.26, n°4, 346-358.
119. Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A. et Gmira, N., « Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelae lythroides* », Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, (2003), n°142, 61-78.

120. Harbone, J.B., « Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis », Chapman et Hall, London, (1998), 302 p.
121. Benhammou, N., Atik Bekkara, F. et Kadifkova Panovska, T., « Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus* », Comptes Rendus Chime, (2009), 3p.
122. Rios, J.L., Recio M.C. et Villar, A., « Screening methods for natural products with antimicrobial activity », Journal of Ethnopharmacology, V. 23, (1988), 127–149.
123. Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. et Bollet, C., « Précis de bactériologie clinique », ESKA, Paris, (2002), 565p.
124. Najjaa , H., Neffati , M., Zouari ,S. et Ammar, E., « Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum* L., a North African endemic species », Comptes Rendus Chimie, V. 10, (2007), 820-826.
125. Arnao, M.B., Cano, A. et Acosta, M., « Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion», Free Radical Res , n° 31, (1999), 89-96.
126. Mc Donald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. et Robards, K., « Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts », Food Chemistry, n° 73, (2001), 73–84.
127. Brand-William, W., Cuvelier, M.E. et Berset, C., « Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity», Lebensm-Wiss U-Techno, n° 28, (1995), 25-30.

128. Cotelle, N., Bernier, J.-L., Catteau, J.-P., Pommery, J., Wallet, J.-C. et Gaydou, E.M., « Antioxidant properties of hydroxy-flavones », *Free Radical Biology and Medicine*, V. 20, n° 1, (1996), 35-43.
129. Hsiao. G., Ko.F.-N., Lin.C.-N.et Teng.C.-M., « Antioxidant properties of isotorachryson isolated from *Rhamnus nakaharai* », *Protein Structure and Molecular Enzymology*, *Biochimica et Biophysica Acta*, V. 1298, n° 1, (Novembre 1996), 119-130.
130. Avlessi, F.,Dangou, J., Wotto, V.D, Alitonou, G. A., Sohounhloue, D.K. et Menut, C., « Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuillesde *Clausena anisata* (Wild) Hook », *Comptes Rendus Chimie*, n° 7, (2004), 1057-1061.
131. Hanato, T., Kagawa, H., Yasuhara, T. et Okuda, T., « Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effect », *Chemistry and Pharmacology Bulletin* . V.36, (1988), 1090–1097.
132. Yildirims, A., Mavi, A. et Kara, A.A., « Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts », *J Agric Food Chem*, V. 49, n° 8, (Aout 2001), 4083-4089.
133. Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila,A.,Skandrani, I.,Falleh, H. et Marzouk, B., « Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots », *Comptes Rendus Biologies*, V. 331, (2008), 48–55.
134. Colot. M., “Notions techniques de pharmacologie générale”, Masson, (1972), 140p.
135. Miller, L.C. et Tainter, M.L., « Estimation of the ED50 and its errors by means of logarithmic probit graph paper », *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*,(1944), V. 57, 261–264.

136. Candaele, B., « LE SECHAGE », La journée annuelle technico-économique des plantes à parfum, aromatiques et médicinales bio, Puy de Dôme, (9 octobre 2008).
137. Wichtl, M. et Anton, R., « Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique », Éd. Tec et Doc, (2003), 692 p.
138. Paris. R. et Moyse. M., « Précis de matière médicale », Masson édit, Paris, (1965), 450p.
139. Hoffmann.David., « Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine », Inner Traditions / Bear & Co, (2003), 666 p.
140. Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A. et Saija, A., « Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices », Food Chem, (1999), V. 47, 4718–4723.
141. Fratianni, F., Tucci, M., De Palma, M., Pepe, R. et Nazzaro, F., « Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori) », Food Chem, (2007), V. 104, 1282–1286.
142. Pokorny, J., Yanishlieva, N. et Gordon M., « Antioxidants in Food: Practical Applications », Woodhead Publishing, England, (2001), 7–21.
143. Guillot, G., « La planète fleurs », Editions Quae, (2010), 208 p.
144. Carovic´-Stanko,K., Orlic,S., Politeo,O., Strikic, F., Kolak, I., Milos, M. et Satovic, Z., « Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa* », Food Chemistry, (2010), V. 119, 196–201.
145. Davidson, P., « Antimicrobials in foods », Marcel Dekker, New York, (1993), 647p.

146. Kerharo, J. et Adam, J.G., « La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques », Vigot frères, Paris, (1974), 1007 p.
147. N'guessan, K., Kouassi, K. E. et Zirihi, G. N., « Etudes botaniques et tri phytochimique de *Petersianthus macrocarpus* (Barringtoniaceae), une plante utilisée en médecine traditionnelle, dans la lutte contre le cholera », Pharm. MM Trad. Afr, (2006), V. XIV, 97-116.
148. Omulokoli, E., Khan, B. et Chhabra, S., « Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants », Journal of Ethnopharmacology, (1997), V.56, 133–137.
149. Chang, S. T., Wu, J. H., Wang, S. Y., Kang, P. L., Yang, N. S., et Shyur, L. F., « Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood », Journal of Agricultural & Food Chemistry, (2001), V. 49, n° 7, 3420–3424.
150. Ismail, H. I., Chan, K. W., Mariod, A. A. et Ismail, M., « Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts », Food Chemistry, (2010), V. 119, 643–647.
151. Ruberto. G., et Baratta. M.T., « Antioxidant activity of selected essential oils components in two lipid model systems », Food Chemistry, (2000), V. 69, 167–174.
152. Molyneux. P., « the use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) of estimating antioxidant activity », journal of science technology, (2004), V.26, n°2, 211-219.
153. Gaziano. J.M. et Gibson. C.M., « Potential for drug-drug interactions in patients taking analgesics for mild-to-moderate pain and low-dose aspirin for cardioprotection », Am J Cardiol, (2006), V.97, 23-9.

154. Dufour, D., Pichette A., Mshvildadze V., Bradette-Hébert M.-E., Lavoie S., Longtin A., Laprise C. et Legault, J., « Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius », accepté par Journal of ethnopharmacology, (2006).
155. Litchfield, J.T., « Forecasting drug effects in man from studies in laboratory animals », JAMA, (1961), V.177, 34-38.
156. Svoboda. K. P. et Svoboda. T.G.,« secretory structures of aromatic and medicinal plants », K. P. & T. G. SVOBODA, (2000), 60p.
157. Senatore, F., Rigano, D., De Fusco, R. et Bruno, M., « Composition of the essential oil from flowerheads of *Chrysanthemum coronarium* L. (Asteraceae) growing wild in Southern Italy », Flavour and fragrance journal, (2004), vol. 19, n°2, 149-152.
158. Basta. A, Pavlovic. M., Couladis. M. et Tzakou. O., « Essential oil composition of the flowerheads of *Chrysanthemum coronarium* L. from Greece », Flavour and fragrance journal, (2007), V. 22, n°3, 197-200.
159. Flamini. G., Cioni. P.L. et Morelli. I., « Differences in the fragrances of pollen, leaves, and floral parts of garland (*Chrysanthemum coronarium*) and composition of the essential oils from flowerheads and leaves », Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2003), V.51, n°8, 2267-2271.
160. Senatore. F., « Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy) », Journal of Agricultural and Food Chemistry, (1996), n°44, 1327-1332.
161. Kokkini. S., Karousou. R., Dardioti. A., Krigas. N. et Lanaras. T., « Autumn essential oils of Greek oregano », Phytochemistry, (1997), V.44, n°5, 883-886.

162. Russo.M., Galletti. G.C., Bocchini. P. et Carnacini. A., « Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1998),V.46, 3741-3746.
163. Thompson. J.D., Chalchat. J.C., Michet, A., Linhart. Y.B. et Ehlerset. B., « Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype », *Journal of Chemistry and Ecology*, (2003), V.29, n°4, 859-880.
164. Karousou. R., Koureas. D.N. et Kokkini. S., « Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete », *Photochemistry*, (2005), V. 66, 2668-2673.
165. Fuinel , G., « Plantes de vie. Du corps et de l'esprit », Fernand Lanore, (2003), 161 p.
166. Maiga. A., « Détermination de certains métaux dans les plantes médicinales ou alimentaires du mali », pharmacopoeial monographs on mappsand their products for african region bamako,(24-26 november 2008).
167. Djeridane, M., Yousfi, B., Nadjemi, D., Boutassouna, P. et Stocker, N., « Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds », *Food Chem*, (2006), V. 97, 654–660.
168. Urzua.A., Mendoza. L., «Antibacterial activity of fresh flower heads of *Chrysanthemum coronarium*», *Fitoterapia*, (2003),V.74, 606–608.

169. Deba.F., Xuan.T.D., Yasuda.M. et Tawata.S.,« Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata* », Food Control, V.19, n° 4, (April 2008), 346-352.
170. Vilela. F.C., Bitencourt. A.D., Cabral.L.D.M., Franqui.L.S.,Soncini.R. et Giusti-Paiva. A., « Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Sonchus oleraceus* in rats », Journal of Ethnopharmacology, (2010), V. 127, 737–741.
171. Pozharitskaya. O.N., Shikov. A.N., Makarova. M.N., Kosman. V.M., Faustova. N.M., Tesakova. S.V., Makarov. V.G. et Galambosi. B., “Anti-inflammatory activity of a HPLC-fingerprinted aqueous infusion of aerial part of *Bidens tripartita* L.”, Phytomedicine, (2010), V. 17, 463–468.
172. Dos Santos. D.A., Fukui. M.J., Nanayakkara. N.P.D., Khan. S.I., Sousa. J.P.B. Bastos. J.K., Andrade. S.F., Da Silva Filho. A. A., Quintão. N.L.M.,“Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models”, Journal of Ethnopharmacology, (2010), V.127, 543–550.