

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques**

Département de Biologie

**MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Biotechnologies Végétales

ETUDE D'UNE PLANTE A CARACTERE THERAPEUTIQUE :

*Ajuga iva*

Par

**Dalila CHABANE**

Devant le jury composé de :

M.S. HAMAI	Maître de Conférences A, U S D de Blida	Président
A. BERBER	Maître de Conférences A, U S D de Blida	Examinatrice
S. MEGATLI	Maître de Conférences B, U S D de Blida	Examineur
F. SAIDI	Professeur, U S D de Blida	Promoteur
A. ROUBI	Maître assistant, U S D de Blida	Co-promoteur

Blida, 02 fevrier 2012

## RESUME

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante médicinale spontanée appelée *Ajuga iva* L. (famille des Lamiaceae).

Cette étude réalisée sur la partie aérienne de la plante a pour but d'analyser les composés chimiques, ainsi que l'évaluation de quelques effets thérapeutiques de la plante.

Le dosage phytochimique révèle la présence de polyphénols à une teneur de  $3,12 \pm 0,37$  mg/EAG en g de plante sèche, et une teneur de 3,05 % en flavonoïdes.

On a identifié par HPLC les composés suivants : la série benzoïque à 25,16 %, la série cinnamique à 9,07% et l'acide férulique comme composé majoritaire. L'identification des flavones et flavonols a révélé la présence de la lutéoline à 13,48 % et celle de la quercétine à 6,66%. L'hétéroside flavonique représente une teneur en monoglycoside de 16,67 %, quant aux anthocyanes, la cyanidine représente une teneur de 0,50 %.

L'évaluation des activités pharmacologiques de la plante, à savoir l'effet hypoglycémiant, a donné un pourcentage de réduction de la glycémie de  $62,96 \pm 7,30$  % chez les rats traités avec l'extrait aqueux de la plante à 0,15 g/ml. Après étude de la toxicité de la plante, la DL50 a été déterminée à 3,60 g/kg, et d'après l'échelle de HODGE et STERNER, nous avons conclu à une légère toxicité de la plante.

**Mots clés:** *Ajuga iva* L., métabolites secondaires, extrait aqueux, DL50, effet thérapeutique.

## ABSTRACT

As part of this work, we were interested in the study of a spontaneous medicinal plant called *Ajuga iva* L. (family of Lamiaceae).

This study carried out on the aerial part of the plant aims at characterizing, identifying and measuring some families of chemical compounds contained in this plant. We also estimated some therapeutic effects by the use of the aqueous extract. By the determination of the DL50, we were able to highlight the threshold of safety.

The phytochemical dosage reveals the presence of polyphenols in a content of  $3.12 \pm 0.37$  mg/EAG g of dry plant, and a 3.05 % content of flavonoïdes.

Using the technique of the high-performance liquid chromatography (HPLC) allowed us the identification and the quantification of some phenolic acids such as: the benzoic series at 25.16 %, the cinnamic series at 9.07 % and the ferulic acid as major compound. The identification of flavones and flavonols revealed the presence of the lutéolin at 13.48 % and the quercetin at 6.66 %. The flavonic glycoside represents a content monoglycoside of 16.67 %, as for anthocyanin, the cyanidine represents a 0.50 % content.

The evaluation of the pharmacological activities of the plant, namely the hypoglycemic effect, gave a percentage of reduction of  $62.96 \pm 7.30$  % glycemia to the rats treated with the aqueous extract of the plant at 0.15 g/ml. After studying the toxicity of the plant, the DL50 was determined at 3.60 g/kg and according to the scale of HODGE and STERNER, we concluded to a slight toxicity of the plant.

Keywords: *Ajuga iva* L., secondary metabolites, aqueous extract, DL50, therapeutic effect.

## ملخص

في إطار عملنا هذا ركزنا على دراسة نبتة طبية *Ajuga iva* تسمى الشندفورة هذه الدراسة تمحورت على إستخراج، وصف وتحديد بعض المركبات الثانوية الفعالة وإبراز الوظائف الطبية للمستخرج المائي و تحديد درجة تسممها بقياس DL50 .

التحليل الكيميائي اظهر العديد من المركبات الثانوية الفعالة كالبوليفينول 33.2 مغ في غرام من النبتة اليابسة و الفلافونويد 3,05% في غرام من النبتة اليابسة.

بفضل استعمال التقنية الحديثة الكروماتوغرافية الأيونية الدقيقة (CI) استطعنا أن نكشف عن وجود المكونات المعدنية كالكالسيوم بوتاسيوم مغنيزيوم و صوديوم. الكالسيوم و الصوديوم موجودين بكمية مرتفعة تصل إلى 573,5 ملغ/ل و 209,5 ملغ/ل. كما أنها كشفت لنا وجود مكونات أخرى كالفلوريد و الكلوريد.

أما التحليل عن طريق الكروماتوغرافية السائلة العالية الأداء سمحت لنا بتشخيص العديد من المركبات الفينولية (فلافون-فلافونول : اللوتيونوالكرستين، الأحماض الفينولية: حمض الفريك و حمض البروتوكاشيك و حمض لاجيك، حمض البارابنزويك، حمض سيرانجيك، حمض الباراكوماريك و حمض الفيروليك، الفلافوغلوسيدات الكربونية : غلوسيداتالكستين، الأنتوسيان:السياندين؛ الفلافوغلوسيدات العامة : مونوغليكوزيد- 7 لوتيونين).

أما المستخرج المائي للنبتة فقد كشف عن وجود تأثيرات علاجية مهمة جدا (مفعول مخفض لنسبة السكر في الدم، مفعول مضاد للالتهابات، و مفعول مضاد للتشنجات) و مفعول طفيف مضاد للمكروبات على بعض السلالات البكتيرية و الفطرية .

و أخيرا، فإن الدراسة الأولية للتسمم الحاد DL50 عن طريق الحقن و البلع أظهرت أن النبتة تسبب تسمم طفيف ف الحالة الاولى فقط.

الكلمات الرئيسية: *Ajuga iva*، المركبات الثانوية، المستخرج المائي، الكروماتوغرافية السائلة العالية الأداء، DL50، تأثيرات علاجية.

## REMERCIEMENTS

A vous, Professeur Saidi F., j'aimerais tout d'abord vous adresser mes sincères remerciements de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être ma promotrice, et de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Je vous remercie pour tous les soutiens, de toute nature science. Puisse Dieu vous récompenser pour tous vos efforts, soyez assurée de ma profonde gratitude et de ma vive reconnaissance.

A vous, Mr Rouibi A., j'aimerais également vous exprimer mes remerciements d'avoir accepté de codiriger ce mémoire. Je voudrais vous exprimer ici toute ma reconnaissance pour tous vos conseils et pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté tout au long de ce parcours.

A vous, Mr Hamaidi M., je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury, malgré vos différentes occupations. Je vous exprime toute ma gratitude et merci pour votre disponibilité.

A vous, Mr Berber A., j'aimerais vous exprimer ici toute ma reconnaissance et mes plus vifs remerciements pour les encouragements que vous m'avez apportés. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de consacrer une partie de votre temps pour examiner ce travail.

A vous, Mr Megatli S., je vous présente mes sincères remerciements de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce mémoire malgré vos nombreuses occupations.

## DEDICACES

A ceux qui ont toujours été près de moi, qui m'ont entouré de leur affection et de leur tendresse :

Mes chers parents, qu'ils trouvent ici mon infime reconnaissance

A la mémoire de mes grands parents

A mon mari qui m'a soutenu tout au long de ce travail, surtout pour sa patience et sa disponibilité à tous les moments.

A mon très cher fils, pour son soutien et son aide précieuse tout au long de ce travail

A toutes mes chères sœurs et tous mes chers frères

A toutes mes amies, Amina, Lila et surtout Fatouma qui m'a aidée et m'a soutenu durant ce long parcours. Je lui souhaite beaucoup de bonheur.

## TABLE DES MATIERES

RESUME	
ABSTRACT	
ملخص	
REMERCIEMENT	
LISTE DESS ILLUSTRATION ET TABLEAUX	
INTRODUCTION.....	12
PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1. Les plantes médicinales.....	15
1.2. Historique.....	15
1.3. Méthode cde préparation des plantes médicinales.....	17
1.4. Généralité sur la plante.....	18
1.5. Les principes actifs des plantes.....	22
1.6. Les souches bactériennes.....	28
1.7. Activité antioxydante.....	30
1.8. Rappel pharmacologique.....	30
PARTIE2 : MATERIEL ET METHODES.....	34
2.1. Matériel biologique.....	34
2.2. Méthodes .....	35
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	65
3.1. Résultat de l'étude botanique.....	65
3.2. Résultat de l'étude phytochimique.....	71
3.3. Résultat de l'étude biologique.....	87
CONCLUSION.....	103
APPENDICES.....	105
A. Liste des abréviations.....	105
B. Les acides phénoliques.....	106

C. Principales classes de flavonoïdes.....	107
D. Principaux groupes de tannins.....	108
E. Les teneurs en eau et en cendres.....	109
F. Activité antimicrobienne.....	113
G. Activité antioxydante.....	115
H. Activité antidiabétique.....	118
I. Activité antalgique.....	119
J. Liste des appareils et milieux de cultures.....	127
REFERENCES.....	120
GLOSSAIRE.....	154



## LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Habitat d' <i>Ajuga iva</i>	19
Figure 2.1	Schéma du principe d'une chromatographie ionique	39
Figure 2.2	Protocole expérimental d'extraction des composés au soxhlet	43
Figure 2.3	Protocole expérimental d'extraction et d'identification des flavones et flavonols et acides phénols	49
Figure 2.4	protocole expérimental d'extraction et des hétérosides flavoniques	51
Figure 2.5	Forme libre et réduite du DPPH	55
Figure 3.1	Echantillon d' <i>Ajuga iva L.</i>	65
Figure 3.2	Fleur d' <i>Ajuga iva L.</i>	66
Figure 3.3	Les étamines d' <i>Ajuga iva L.</i>	66
Figure 3.4	Calice vu à la loupe Gx8	67
Figure 3.5	Ovaire vu à la loupe GX8	67
Figure 3.6	Carpelle vue à la loupe GX8	67
Figure 3.7	Feuille face supérieure observée à la loupe GX8	68
Figure 3.8	Feuille dentelée observée à la loupe GX 2.5	68
Figure 3.9	C.T de la tige observée au MP GX10	69
Figure 3.10	C.T d'une feuille d' <i>Ajuga iva L.</i>	70
Figure 3.11	Spectre des minéraux cationique	72
Figure 3.12	Spectre des minéraux anionique	74
Figure 3.13	Teneur en composés polaire et apolaire	76
Figure 3.14	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	77
Figure 3.15	Profil chromatographique des flavones et flavonols	79
Figure 3.16	Profil chromatographique des acides phénols	81
Figure 3.17	Profil chromatographique hétérosides flavoniques	83
Figure 3.18	Profil chromatographique des C-glycosides	85
Figure 3.19	Profil chromatographique des anthocyanes	86

Figure 3.20	Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en extrait méthanolique	89
Figure 3.21	Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en $\alpha$ tocophérol	90
Figure 3.22	Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en acide ascorbique	90
Figure 3.23	Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en rutine	91
Figure 3.24	Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en acide gallique	92
Figure 3.25	Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en quercétine	92
Figure 3.26	Evolution du pourcentage de réduction de la glycémie	98
Tableau 1.1	Composition phytochimique d' <i>Ajuga iva</i> L.	21
Tableau 1.2	Activité biologique des polyphénols	23
Tableau 2.1	Condition d'analyse par chromatographie ionique	38
Tableau 2.2	Condition opératoire de l'HPLC	47
Tableau 2.3	Les souches bactériennes	52
Tableau 2.4	Les réactifs et leurs ingrédients utilisés lors du dosage par spectrophotométrie	60
Tableau 2.5	Répartition des lots utilisés dans l'activité antispasmodique	62
Tableau 2.6	Classe de toxicité : échelle de HODG et STERNER	64
Tableau 3.1	Résultat de la teneur en eau	71
Tableau 3.2	Résultat de la teneur en cendres	71
Tableau 3.3	Cations détectés par CI	72
Tableau 3.4	Anions détectés par CI	73
Tableau 3.5	Résultats de la caractérisation colorimétrique	75
Tableau 3.6	Caractérisation chromatographique des flavones-flavonols	80

Tableau 3.7	Caractérisation chromatographique des acides phénols	82
Tableau 3.8	Caractérisation chromatographique des hétérosides flavoniques	84
Tableau 3.9	Caractérisation chromatographique des C-glycosides	86
Tableau 3.10	Caractérisation chromatographique des anthocyanes	87
Tableau 3.11	Résultat de l'activité microbienne	88
Tableau 3.12	Concentration d'inhibition à 50%des différentes substances	93
Tableau 3.13	Les glycémies moyennes des divers lots	96
Tableau 3.14	Nombres de spasmes moyens et pourcentages de protection	100

## RESUME

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante médicinale spontanée appelée *Ajuga iva* L. (famille des Lamiaceae)

Cette étude réalisée sur la partie aérienne de la plante a pour but d'analyser les composés chimiques, ainsi que l'évaluation de quelques effets thérapeutiques de la plante.

Le dosage phytochimique révèle la présence de polyphénols à une teneur de  $3,12 \pm 0,37$  mg/EAG en g de plante sèche, et une teneur de 3,05 % en flavonoïdes.

On a identifié par HPLC les composés suivants : la série benzoïque à 25,16 %, la série cinnamique à 9,07% et l'acide férulique comme composé majoritaire. L'identification des flavones et flavonols a révélé la présence de la lutéoline à 13,48 % et celle de la quercétine à 6,66%. L'hétéroside flavonique représente une teneur en monoglycoside de 16,67 %, quant aux anthocyanes, la cyanidine représente une teneur de 0,50 %.

L'évaluation des activités pharmacologiques de la plante, à savoir l'effet hypoglycémiant, a donné un pourcentage de réduction de la glycémie de  $62,96 \pm 7,30$  % chez les rats traités avec l'extrait aqueux de la plante à 0,15 g/ml. Après étude de la toxicité de la plante, la DL50 a été déterminée à 3,60 g/kg, et d'après l'échelle de HODGE et STERNER, nous avons conclu à une légère toxicité de la plante.

**Mots clés:** *Ajuga iva*L., métabolites secondaires, extrait aqueux, DL50, effet thérapeutique

## INTRODUCTION

Sitôt que l'Homme apparut sur la terre, il ne tarda guère à s'intéresser aux propriétés des végétaux :

Pour les redouter et les écarter s'il s'agissait d'espèces toxiques pour lui,  
Pour en cueillir et en utiliser lorsque ces espèces s'avéraient bénéfiques à son égard.

Pareil apprentissage, nul n'en peut douter, lui coûta parfois la vie. Concernant la médecine populaire, est-on "stupéfait de la somme patiente d'expérimentations et d'observations dont tous les peuples primitifs ont fait preuve" [1].

La science moderne, en analysant et étudiant les effets thérapeutiques des plantes, n'a pas pour but de diminuer cette confiance en la nature. Elle veut préciser, comparer et classer les diverses propriétés pour grouper les plantes à effets similaires, choisir les plus efficaces et les faire connaître [2].

La quête des médicaments à partir des ressources naturelles est loin d'être terminée, même si depuis 50 ans, les chercheurs ont complété leur exploitation du monde végétal [3].

Aujourd'hui, l'OMS incite les pays en voie de développement à œuvrer dans le sens de la promotion de la recherche ethnopharmacologique. Plus de 5000 substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont avérées utiles dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

L'Algérie possède une flore très riche et diversifiée. Ainsi, parmi les nombreuses plantes médicinales à usage thérapeutique, notre choix s'est porté sur *Ajuga iva* L. qui nous a intrigué par ses nombreuses vertus thérapeutiques

largement préconisées en pharmacopée traditionnelle. Cette plante à vertu médicale est appelée communément « ivette musquée ».

Le sujet de ce mémoire rejoint l'interrogation globale suivante :

« Les ivettes musquées qui jonchent nos tells recèlent-elles, en qualité et en quantité, des molécules utiles à notre lutte contre d'éventuelles maladies ? »

Pour y répondre, nous nous sommes assignés comme objectif l'investigation approfondie de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* L.

Notre étude vise un triple objectif :

- Identification et étude botanique de la plante.
- Etude phytochimique et analyse qualitative et quantitative des molécules bioactives de la plante.
- Evaluation de quelques activités biologiques d'*Ajuga iva*.

## **PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### 1.1. Les plantes médicinales

L'homme utilise depuis des millénaires les plantes médicinales pour traiter les maladies. A cause du coût élevé des produits pharmaceutiques, la plupart des populations mondiales ne sont pas en mesure de s'offrir les soins de santé moderne et c'est pourquoi elles se tournent vers les plantes médicinales pour se soigner [4].

Ces dernières années, plusieurs molécules, isolées des plantes, sont devenues des médicaments efficaces [5].

### 1.2. Historique

La phytothérapie moderne est fondée sur une somme d'expériences et de connaissances dont les origines remontent à plusieurs millénaires.

Le recours à la thérapeutique des plantes est aussi vieux que l'humanité. L'Égypte ancienne, les Grecs et les Romains se sont transmis ce savoir [6].

Les Égyptiens possédaient déjà des notions de pharmacopée et plus de 200 plantes différentes, ramenées de Syrie par le Pharaon Thoutmosis III, apparaissent sur le bas relief du temple de Karnak (1450 ans avant J.C.).

En Inde, les « Veda », livres sacrés contenant toute la sagesse divine, rédigés vers 1500 ans avant J.C., témoignent eux aussi de la connaissance des plantes [7] ; [8].

Excellents pharmaciens, les Arabes mélangeaient les plantes pour en accroître les effets et en améliorer le goût.

Avicenne (930-1037), fût le plus célèbre médecin de l'époque, auteur du « canon » de la médecine. Ce sont les Arabes qui donnèrent à la pharmacie son caractère scientifique. [9]

C'est au 18<sup>ème</sup> siècle, avec le botaniste suédois Linné, qu'apparaissent en Europe les premières descriptions et surtout la classification des végétaux [10].

### 1.2.1 Définitions :

#### 1.2.1.1. Les plantes médicinales :

On appelle plante médicinale un végétal dont un ou plusieurs organes possèdent des activités pharmacologiques qui permettent son utilisation en thérapeutique [1].

Les plantes médicinales ou pharmaceutiques interviennent dans la préparation des médicaments. En médecine, les remèdes à base de plantes portent le nom de préparation galénique, du nom de Galien, médecin du premier siècle [11].

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont dépourvus. Aujourd'hui les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérées comme une solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les plantes proposées comme remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme.

#### 1.2.1.2. La phytothérapie :

La phytothérapie est une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes. Ce n'est ni une thérapie « spéciale », ni une médecine « alternative », car elle fait partie intégrante de la thérapeutique [12] ; [8] ; [13].



### 1.2.1.3. La récolte

Le choix de l'époque de la récolte dépend de la nature de l'organe récolté et des variations du taux des principes actifs en fonction de la période de végétation [14].

La récolte des plantes s'effectue dans des lieux non pollués, les lisières des forêts et les prairies peu fréquentées.

Il est toujours préférable de procéder à la récolte par un temps sec et ensoleillé car les plantes mouillées de pluie ou de rosée s'altèrent, moisissent, fermentent et perdent toute valeur thérapeutique.

### 1.2.1.4. Le séchage :

Les plantes, une fois débarrassées de leurs impuretés, peuvent être mises à sécher à l'ombre, dans un endroit aéré. Certaines plantes entières telles que la menthe, la citronnelle, et les branches d'arbres et d'arbustes sont liées en botte par variété puis suspendues à l'envers sur un fil [15].

### 1.2.1.5. La conservation :

Pour conserver les plantes, il faut vérifier qu'elles soient parfaitement séchées avant de les stocker [16] ; [17].

Les plantes séchées, lorsqu'il ne reste aucune trace d'humidité, se rangent soigneusement et séparément dans des récipients portant le nom de la plante et la date, il faut choisir des boîtes ou des bocaux propres, et fermant hermétiquement [18].

## 1.3. Méthodes de préparations des plantes médicinales

- L'infusion: Elle consiste à verser de l'eau bouillante sur la plante, convenablement divisée. Ce procédé convient bien pour les fleurs, les feuilles, les somites fleuris et les plantes riches en huiles essentielles (1 càc de plante séchée dans une tasse d'eau).

- Décoction: On pèse 20g d'une plante séchée ou 40g d'une plante fraîche. On fait bouillir dans 750 ml d'eau, on laisse réduire à 500 ml. Le temps d'ébullition est de 10 à 30min.
- Macération : Cette préparation s'obtient en mettant les plantes en contact, à froid, avec un liquide quelconque tel que l'alcool, le vin ou l'huile. Le temps de contact est parfois très long [19] ; [20] ; [21].

#### 1.4 Généralités sur la plante

##### 1.4.1. Généralités sur le genre *Ajuga*

La cinquantaine « d'annuelles et de vivaces basses » constituant ce genre, se rencontrent de l'Europe à l'Asie, en passant par l'Afrique et l'Australie, surtout en zone humide. Bien qu'elles soient de la même famille que la menthe, leur feuillage n'est pas aromatique [22].

##### 1.4.2 Généralités sur la famille des lamiacées

A la famille des lamiacées ou des labiées appartiennent une grande quantité de plantes odorantes et aromatiques, riches en huiles étherées. Elles sont originaires du bassin méditerranéen, mais se retrouvent dans les jardins particuliers et jardins botaniques dans toute l'Europe [23].

Leur tige est quadrangulaire. Les fleurs sont groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescence plus au moins denses.

Les fruits sont formés de cinq petites noix qui contiennent chacune une graine.

##### 1.4.3. Généralités sur l'espèce *Ajuga iva* L

L'espèce *Ajuga iva* L Schreber, appartient au genre botanique *Ajuga iva* L. et à la famille des labiées.

##### 1.4.4. Noms communs.

- Algérie (nom vernaculaire) : Chendgoura, Meusq el qobour.
- Tergui - Berbère : Touftolba.

- Français : Ivette musquée.
- Anglais : Musky-bugle, Herb –Ivy.
- Italien : Iva, Iva moscata.
- Egyptien : Miseyka, meskeh.
- Lybien : Sciandagura [25] ; [26] ; [27]

#### 1.4.5. Systématique

**Règne** : Plantae.

**Embranchement** : Phanérogames.

**Sous-embranchement** : Angiospermes.

**Classe** : Dicotylédones

**Ordre** : Lamiales

**Famille** : Lamiaceae

**Genre** : *Ajuga* [28].

#### 1.4.6. Distribution géographique

En Algérie, l'espèce est commune dans tout le Tell mais sa disponibilité est très rare dans le reste du pays [27].

Dans le monde, elle est présente dans toute l'aire méditerranéenne, l'ensemble du Maghreb et les Iles Canaries.

#### 1.4.7. Les espèces du genre *Ajuga* L.

Selon Ait Youssef, 2006, la répartition des espèces se fait comme suit :

- *Ajuga chameapitys* L. Schreber : Ouest, Centre et Sud de l'Europe, Sud Ouest de l'Asie et Nord de l'Afrique,
- *Ajuga genevensis* L. : Europe, Nord et Ouest de l'Asie, Amérique du Nord,
- *Ajuga occidentalis* : en Occident,
- *Ajuga reptans* : presque toute l'Europe, Ouest de l'Asie, Algérie et Tunisie [27].

#### 1.4.8. Description de la plante.

C'est une plante herbacée de petite taille, de 5 à 20 cm de long. Elle est vivace par des stolons. Elle montre une odeur musquée. Elle évolue da

endroits arides, sur les vieux murs, les coteaux pierreux et en bordure des champs [26]. (fig1.1).



Figure1.1 : Habitat d'*Ajuga iva* L. (Original).

Les fleurs : Elles sont hermaphrodites, groupées par 2 ou 4 au niveau des aisselles des feuilles. Elles forment une inflorescence dense. Les fleurs s'épanouissent de mai à octobre.

La corolle : Elle est de couleur pourpre, rose ou jaune. Elle présente une longueur de 1,2 à 2 cm. Elle présente à l'intérieur de la corolle des poils épidermiques. La lèvre supérieure est très courte, tandis que la lèvre inférieure est beaucoup plus longue et présente 3 lobes à symétrie bilatérale. La fleur est zygomorphe [29] ; [26] ; [30].

Le calice : Il est laineux, velu, à dents assez inégales. Ces dernières sont peu aigues à leur sommet. Elles mesurent environ le tiers de la longueur du reste du calice.

La tige : Elle est étalée, rameuse et ligneuse vers la base.

La plante se perpétue par des bourgeons qui naissent à la base des tiges ligneuses. Quelquefois, la corolle et les étamines ne se développent pas ; cependant ces fleurs produisent des fruits à graines, en l'occurrence leurs stigmates sont pollinisés par le pollen d'autres fleurs [31] ; [26].

#### 1.4.9. Récolte de la plante.

*Ajuga iva* L. est généralement récoltée au printemps entre mars et juin.

#### 1.4.10. Doses et modes d'administration.

La plante est généralement utilisée en usage interne, en décoction à raison de 20g dans un litre d'eau. Elle est bouillie pendant 15 minutes.

On peut aussi préconiser le décocté préparé à partir de la plante fraîche ou sèche, seul ou en association avec du thé et du sucre ou la poudre mélangée avec du miel [32] ; [25] ; [27].

#### 1.4.11. Les propriétés thérapeutiques

- Cardiotonique [33].
- Apéritive et tonique [26].
- Dépurative [34].
- Diurétique [35].
- Antimicrobienne [36].
- Antimitotique [37].
- Anti-inflammatoire, antiparasitaire [38].
- Hypocholestérolémiant [39].
- Antidiabétique et antioxydante [40].
- Vasorelaxante [41].
- Insecticide [42] ; [43].
- Cicatrisante [44] ;[45], [46].

#### 1.4.12. La composition chimique de la plante :

Les travaux de certains auteurs concernant la composition chimique d'*Ajuga iva* L. ont donné les résultats suivants :

Tableau 1.1. Composition phytochimique [60].

Nom	Composition	Références
Ajuga iva Schreber	Néo-Clérodane diterpénoides	Ikan et Ravid, 1971; Cantrell et <i>al.</i> , 1991
	Phytoecdystéroïdes (Ajugalactone)	Khafagy et al, 1978; Khafagy et <i>al.</i> , 1979; Wessner et <i>al.</i> , 1992
	Diglycérides, 24, 25- dihydrocyastérone	Sabri et <i>al.</i> , 1981
	Precyastérone	Camps et <i>al.</i> , 1982
	Les flavonoïdes (Naringine, apegenine-O-neohespiroside) et les tanins	Nothis-Paris, 1969; Ghedira et <i>al.</i> , 1997; Ben jannet et <i>al.</i> , 1997
	Les saponines et stérols	Duart et <i>al.</i> , 1993 ; Bondi et <i>al.</i> , 2000
	Ivaide A (1,3-di-(R)- $\beta$ - hydroxy-glycerideglycerol) acide meristique acide palmitique.	Ramazanov, 2005; Chenni et <i>al.</i> , 2007
Iridoides (barbagide, 8-O- acetylharpagide)	Ben Jannet et <i>al.</i> , 1999	

### 1.5. Les principes actifs des plantes

Ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques ont été isolés à partir des plantes et étudiés.

Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme [61].

Ces composés actifs n'appartiennent pas aux substances fondamentales qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes vitaux de la plante. On les range plutôt dans les « substances secondaires » qui dérivent

des principes primordiaux résultant de la photosynthèse et qui semblent avoir un rôle dans la défense de la plante qui les fabrique [62] ; [63].

### 1.5.1. Les principales familles de métabolites secondaires

#### 1.5.1.1. Les polyphénols

Ils sont largement distribués chez les végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Les polyphénols sont les produits du métabolisme secondaire des végétaux. Ils sont présents dans tous les organes de la plante [64].

Les composés phénoliques, les acides phénoliques, les flavonoïdes, et les proanthocyanidines, forment le groupe de composés phytochimiques le plus important des plantes.

Le tableau suivant résume quelques activités biologiques des polyphénols.

Tableau 1.2: Activité biologique des polyphénols [65].

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériennes Antifongiques antioxydantes	Didry et <i>al.</i> , 1982 Ravn et <i>al.</i> , 1984 Hayase et <i>al.</i> , 1984
Coumarines	Vasoprotectrices Antiœdémateuse	Marbry Ulubelun, 1980
Flavonoïdes	Antitumorales Anti carcinogène Anti-inflammatoire Hypotenseurs Diurétiques Antioxydantes	Stavric et <i>al.</i> , 1992 Das et <i>al.</i> , 1994 Bidet et <i>al.</i> , 1987 Bruneton, 1999 Aruoma et <i>al.</i> , 1995
Anthocyanes	Effet stabilisant sur le collagène  Antioxydantes  Antitumorales  Antifongiques  Anti-inflammatoires	Masquelier et <i>al.</i> , 1979  Bohorun et <i>al.</i> , 1996  De Oliveira et <i>al.</i> , 1972  Browlee et <i>al.</i> , 1992  Kreofsky et <i>al.</i> , 1992
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes	Okuda et <i>al.</i> , 1983



#### 1.5.1.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

##### - Les acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque. Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certain tanins.

##### - Les acides hydroxycinnamiques

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique.

Les molécules de base de la série hydroxycinnamiques sont des acides : l'acide p-coumarique (et ses isomères, les acides o- et m-coumarique), les acides caféique et férulique, ainsi que l'acide synaptique [78] (appendice B).

Les acides phénoliques possèdent les activités biologiques suivantes :

-Antioxydantes [68].

-Antibactériennes [66].

-Antifongiques [67].

#### 1.5.1.1.2. Les flavonoïdes

Ils constituent le groupe le plus large des phénols de la plante. Les flavonoïdes identifiés jusqu'à maintenant représentent 5000 composés. Ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits. Ils protègent contre les effets nocifs du rayonnement UV [80].

Plusieurs flavonoïdes ont montré des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, inhibitrices d'enzymes et de prévention des maladies cardiovasculaires [79] (appendice C).

Les flavones et les flavonols sont les plus connus grâce à leur pouvoir antioxydant élevé et les plus divers sur le plan structural.

#### 1.5.1.1.3. Les tanins.

En raison de leur caractère astringent, les tanins sont utilisés pour le tannage des peaux. Bien qu'ils attaquent les cellules, en resserrant les pores, ils protègent des bactéries, des champignons, des produits chimiques. Ils sont anti-inflammatoires et antibiotiques.

Ce sont des molécules à poids moléculaire relativement élevé. Ils constituent le 3<sup>ème</sup> groupe important des composés phénoliques [79] (appendice D).

Il existe deux grands groupes de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

##### - Les tanins hydrolysables.

Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique (tannases) [83].

Ils sont formés par une partie non phénolique (souvent de glucose) et une partie phénolique qui peut être, soit de l'acide gallique, quelquefois appelé acide tannique (cas des gallotannins), soit un dimère d'un même acide, l'acide ellagique [78] (appendice D) [84].

##### - Les tanins condensés.

Les tanins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane 3-ols (3-flavonols). Ils dérivent de la (+) catéchine ou de ses nombreux isomères [79].

Ces tanins se rencontrent chez l'ensemble des végétaux (des fougères aux plantes à fleurs) [83] ; [85]

#### 1.5.1.1.4. Hétérosides ou glucosides :

Certains dérivés secondaires, extrêmement intéressants à défaut d'être importants, et synthétisés par les plantes, sont les hétérosides. La plupart d'entre eux peuvent exercer une fonction de dissuasion vis-à-vis des herbivores.

Le glucide le plus fréquemment rencontré dans les hétérosides est le glucose, bien que des hétérosides spéciaux renferment des glucides rares. Les saponosides, les hétérosides cardiotoniques (cardinolides) et les hétérosides cyanogènes constituent trois familles de métabolites secondaires qui se présentent sous forme d'hétérosides.

Les glucosides cardiotoniques ont une action directe et puissante sur le cœur. Ils l'aident à maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement [86].

#### 1.5.1.1.5. Les alcaloïdes :

Leur diversité structurale et l'éventail de leurs activités pharmacologiques font des alcaloïdes l'un des groupes les plus importants des substances d'origine naturelle d'intérêt thérapeutique [87].

A la différence des polyphénols, les alcaloïdes forment une grande famille chimiquement hétérogène. Leurs caractéristiques communes sont leur solubilité dans l'eau, la présence d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique [88] ; [89].

Les alcaloïdes sont localisés dans les tissus périphériques : assises externes des écorces de tige et de racine et tégument des graines.

La basicité et les actions anti-métabolites de la plupart de ces molécules imposent leur compartimentation, elles sont normalement stockées dans les vacuoles cellulaires.

Comme pour beaucoup d'autres métabolites secondaires dans les végétaux, on ne sait pratiquement rien du rôle des alcaloïdes dans les

végétaux. Certains pourraient intervenir dans les relations plantes-prédateurs en protégeant les premières contre l'agression des seconds [90].

Les alcaloïdes sont généralement classés en fonction de la nature du cycle qui prédomine dans la molécule. La plupart sont synthétisés à partir d'un petit nombre d'acide aminés ordinaires (tyrosine, tryptophane, ornithine, ou arginine et lysine) [15].

#### 1.5.1.1.6. Les saponosides.

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives : ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes, leur nom dérive du mot savon [91].

Les saponosides retiennent l'attention pour leur exploitation industrielle. Certains sont des matières premières destinées à l'hémisynthèse de molécules médicamenteuses stéroïdique. L'industrie des cosmétiques exploite leurs propriétés détergentes.

Les saponines assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne et fongique. Ils ont une action anti-œdémateuse.

De nombreuses plantes utilisées pour leur effet anti-inflammatoire et dermatologique doivent leurs propriétés aux saponines [85] ; [92].

La plupart des saponosides possèdent des propriétés hémolytiques [92] ; [93], [94].

Du point de vue structural, les saponines peuvent être classées selon la nature de leur aglycone [60] ; [94].

### 1.6. Les souches microbiennes

Les bactéries sont pathogènes pour l'homme et sont à l'origine de nombreuses maladies [97].

Dans le souci de tester l'effet antiseptique de l'extrait aqueux d'*ajuga iva* L., nous présenterons dans cette partie, l'ensemble des souches microbiennes sur lesquelles nous avons travaillé

### 1.6.1. Les Entérobactéries

#### 1.6.1.1. Espèce *Escherichia coli*

Ce sont des bacilles à Gram négatif ou «colibacille» appartenant à la famille des enterobacteriaceae. *Escherichia coli* est l'hôte habituel de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud [96] ; [97] ; [98].

Les souches d'*E. coli* responsables des infections chez l'homme sont différentes de celles qui constituent l'espèce dominante de la flore intestinale[99].

### 1.6.2. Autres bactéries à Gram négatif.

#### 1.6.2.1. Espèce *Pseudomonas aerogenosa*

C'est une bactérie aérobie à Gram négatif. Elle est présente dans le sol et l'eau. Cette souche est considérée comme un modèle d'agent pathogène opportuniste. Elle est souvent responsable des infections nosocomiales. En culture sur gélose, elle produit un pigment bleu-vert soluble dans l'eau.

### 1.6.3. Bactéries à Gram positif.

#### 1.6.3.1. *Staphylococcus aureus*.

Ce sont des bactéries à Gram positif qui s'assemblent en grappes de formes irrégulières. Elles sont responsables de nombreuses maladies de la peau. Elles colonisent souvent les voies nasales.

#### 1.6.3.2. *Enterococcus faecalis*.

*E. faecalis* est l'espèce la plus rencontrée chez l'homme avec *E. faecium*. Elle représente 90% des isolats. Les Enterococcus sont responsables des infections urinaires et de bactériémies. Ces bactéries sont peu virulentes [100].

#### 1.6.3.3. *Bacillus cereus*

Ce sont des bactéries à Gram positif. Elles produisent des endospores, elles sont très répandues sur le sol et les végétaux et sont généralement

considérées comme inoffensives, bien qu'elles causent des maladies d'origine alimentaire.

#### 1.6.4. Les mycètes.

##### 1.6.4.1 *Candida albicans*

C'est un mycète luvuriforme qui croît souvent sur les muqueuses de la bouche, du tractus intestinal et des voies vaginales [101].

#### 1.7. Activité antioxydante

C'est la capacité que possède une molécule, de capter ou de piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant.

##### 1.7.1. Les radicaux libres

Ce sont des entités chimiques qui deviennent instables et très réactives car elles ont perdu un électron. Elles cherchent alors à le remplacer [102] ; [103] ; [106]; [80].

Les radicaux libres sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires et qui se traduit par l'oxydation des lipides membranaires, des protéines cellulaires et des acides nucléiques. Cet effet entraîne la mort cellulaire [71] ; [102] ; [105].

##### 1.7.2. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation de substrats biologiques Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. Ils agissent en formant des produits finis non radicaux [104].

#### 1.8. Rappel pharmacologique

##### 1.8.1. Effet anti-diabétique

### 1.8.1.2. Définition.

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit.

L'insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang.

L'hyperglycémie, ou concentration sanguine élevée de sucre, est un effet fréquent du diabète non contrôlé. Ce dernier conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins.

#### 1.8.1.2.1. Le diabète de type I

Il est connu sous le nom de diabète insulino-dépendant ou juvénile. Il se caractérise par la production insuffisante d'insuline et exige une administration quotidienne de cette dernière.

#### 1.8.1.2.2. Le diabète de type II

Auparavant connu sous le nom du diabète non insulino-dépendant ou diabète de la maturité, il résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Le diabète de type II représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde. Il traduit une surcharge pondérale et une sédentarité. Ainsi, plus de 220 millions de personnes sont diabétiques dans le monde (OMS, 2009).

#### 1.8.1.2.3. L'insuline

Il s'agit d'une hormone quasi-exclusivement synthétisée par les cellules  $\beta$  du pancréas.

La fonction générale de l'insuline est le contrôle strict de la glycémie, ses effets hypoglycémisants s'opposant à ceux du glucagon, qui lui, est synthétisé par les cellules  $\alpha$  [111].

Dans le plasma, l'insuline circule sous forme libre, non liée à une « protéine de transport » [112].

### 1.8.2. Effet antalgique

#### 1.8.2.1. Définition de la douleur

La douleur est une sensation spécifique ayant des récepteurs et des conducteurs périphériques et centraux qui lui sont propres [107].

La douleur apparaît à la suite d'une inflammation, d'une contraction musculaire, d'un spasme vasculaire ou d'une infection locale [108].

#### 1.8.2.2. Définition d'un spasme

Le spasme est une contraction involontaire des fibres musculaires, celle-ci est intense mais passagère. La douleur provient de l'arrêt de la circulation sanguine dans le muscle pendant cette contraction anormale [107].

##### 1.8.2.2.1. Les antispasmodiques

C'est une substance d'origine naturelle ou synthétique. Elle est utilisée pour atténuer ou supprimer un spasme. Ce sont des sédatifs et dans certains cas, des dépresseurs du système nerveux central [109].

### 1.8.3. Etude toxicologique de la plante

#### 1.8.3.1. Définition de la toxicité

On appelle « toxique » ou « poison » toute substance qui, après pénétration dans l'organisme par une voie quelconque, provoque instantanément ou après une phase de latence plus ou moins prolongée, des troubles d'une ou de plusieurs fonctions de l'organisme qui peuvent entraîner la mort [113].

On distingue, en général, trois formules d'intoxication suivant la rapidité d'apparition, la sévérité, la durée des symptômes et la rapidité d'absorption de la substance toxique. [114].



#### 1.8.3.1.1. Toxicité aiguë.

La toxicité aiguë est celle qui résulte de l'administration d'une dose très forte, en une fois ou en plusieurs fois, d'une substance quelconque.

Cette dose peut varier en fonction de l'espèce animale expérimentée et de la voie d'administration. L'administration a lieu par voie orale ou intrapéritonéale, chez des rongeurs subdivisés en plusieurs groupes. La mortalité de chaque groupe est mesurée au cours l'expérimentation [115].

#### 1.8.3.1.2. Toxicité sub-aiguë

Elle résulte de l'absorption répétée d'une substance pendant un temps limité, au maximum 90 jours, chez l'animal, à des doses relativement élevées. Ces dernières sont insuffisantes pour entraîner des effets toxiques lors d'une administration unique [114].

#### 1.8.3.1.3. Toxicité chronique

Elle se manifeste avec retard, à la suite de l'administration répétée et prolongée d'une substance active. Leur ingestion se fait à des doses faibles et répétées entraînant une action cumulative ou une sommation [116].

#### 1.8.3.1.4 La dose létale ou DL50

La DL50 est la dose qui entraîne la mort de 50% des animaux soumis à l'administration de la substance [117] ; [118]

## PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Matériel biologique

#### 2.1.1. Matériel végétal

*Ajuga iva* L. a été récoltée au mois de mai 2009 à la station de Sidi Rabah à El Hamdania (wilaya de Médéa). Pour l'ensemble de nos expérimentations, nous avons utilisé approximativement 3 kg de plante.

Des échantillons ont été conservés à l'état frais afin de déterminer la teneur en eau de la plante. Le reste de la récolte a été séché à l'air libre dans un endroit sec et à l'abri la lumière et de l'humidité.

#### 2.1.2. Matériel animal

✓ Souris NMRI : l'animal utilisé est la souris NMRI (Naval Medical Research Institute, USA).

La souris blanche est la race albinos de la souris domestique ou souris grise : *Mus musculus*. Elle provient du Laboratoire de Pharmacotoxicologie, Unité Animalerie du CRD d'El Harrach du groupe SAIDAL.

✓ Rat Wistar : Ce sont des rats d'élevage de laboratoire qui proviennent de l'animalerie du CRD d'El Harrach du groupe SAIDAL.

#### 2.1.3. Matériel bactériologique

Les souches utilisées sont au nombre de 08. Elles proviennent du Laboratoire de Microbiologie du CRD d'El Harrach du groupe SAIDAL. Il s'agit de : *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Entérocooccus*

*faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Candidas albicans*.

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Identification de la plante

L'identification de la plante à été effectuée au niveau :

- du Laboratoire de Recherche de la Post Graduation «Biotechnologies Végétales» du Département de Biologie - Université Saâd Dahlab (Blida).
- de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie(ENSA) d'El Harrach, Département de Botanique.
- Du département d'agronomie- Université Saâd Dahlab (Blida).

Pour l'identification nous avons procédé comme suit :

#### 2.2.1.1. Aspect macroscopique

Des spécimens de la plante récoltée ont été comparés à ceux archivés au niveau de l'herbier de l'ENSA.

Nous avons aussi cherché des spécificités florales caractéristiques d'*Ajuga iva*.

##### 2.2.1.1.1. Observation à la loupe

La fleur : Les nombres de pétales, de sépales et d'étamines sont déterminés, ainsi que leurs positions par rapport à l'ovaire. Nous avons aussi compté le nombre de carpelles et cherché le type de placentation.

La forme des feuilles et leurs positions par rapport aux tiges ont été observées.

##### 2.2.1.1.2. Aspect microscopique

L'examen microscopique des feuilles et des tiges a été réalisé en effectuant des coupes très fines au niveau des organes à l'état frais. Nous avons réalisé une double coloration pour observer les tissus.

La coloration est réalisée selon le protocole décrit par BENSALÉM et BENDJELLOUL, (1998), selon les étapes suivantes :

- Les coupes sont plongées dans hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules,
- Après rinçage à l'eau courante de 5 à 10 min, les coupes sont traitées par l'acide acétique à 10% pendant 1 à 2 min pour faciliter la diffusion des colorants,
- Ces coupes sont ensuite lavées à l'eau courante 5 à 10 min et placées dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 min,
- Les coupes sont rincées à l'eau courante de 5 à 10 min puis plongées dans le rouge Congo 15 à 20 min,
- Après lavage à l'eau courante, elles sont montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique.

## 2.2.2. Etude phytochimique de la plante

### 2.2.2.1. Teneur en eau

Nous avons suivi le protocole de ZERRAD et *al.*, (2006). Ainsi, nous avons placé des échantillons de plantes de poids déterminé dans une étuve portée à 75°C. Les échantillons ont été pesés chaque 24 heures jusqu'à la stabilisation du poids sec de la matière végétale.

La teneur en eau a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{\text{Poids frais} - \text{Poids sec}}{\text{Poids frais}} \times 100$$

### 2.2.2.2. Dosage des cendres

La minéralisation a été réalisée selon la méthode de MARTIN et *al.*, (1984) ; PINTA, (1973) ; PINTA,(1968) qui consiste à incinérer et à calciner la poudre végétale jusqu'à l'obtention des cendres blanches.

#### Technique

Les creusets préalablement portés au rouge sont refroidis et tarés. Dans chacun des creusets est introduite une prise d'essai de 1g. Ensuite, ces creusets sont mis au four à 500 °C pendant 4 à 6 heures. Ils sont ensuite déposés dans un dessiccateur pour refroidir avant leur pesée. Cette quantité est rapportée à 100g de plante sèche par la formule suivante :

$$\% \text{ de cendres totales} = \frac{\text{Masse des cendres}}{\text{Masse de poudre de la plante essai}} \times 100$$

Masse des cendres = masse totale après calcination – tare

Masse de poudre de la plante essai = masse totale avant calcination - tare

### 2.2.2.3. Dosage des ions

Le dosage des ions est réalisé par chromatographie ionique.

#### 2.2.2.3.1. La chromatographie ionique

La chromatographie ionique est une technique qui s'apparente à la HPLC mais qui présente cependant suffisamment de particularités, tant au niveau du principe de la séparation que de certaines méthodes de détection. Elle est adaptée à la séparation des ions minéraux des molécules organiques polaires.

La phase mobile est constituée de par un milieu aqueux ionique. La phase stationnaire est constituée par un solide qui se comporte comme un échangeur de d'ions.

#### Principe

Cette technique de chromatographie est orientée vers la séparation des ions et des composés polaires. Pour cela, on utilise des colonnes contenant

des phases stationnaires comportant des sites ioniques pour qu'il se crée des interactions dipolaires avec les analytes à séparer [125].

### Mode opératoire

Une solution de cendres (1ml) est diluée dans un litre d'eau. De cette solution, 20  $\mu$ l sont injectés dans l'appareil de chromatographie ionique de type ICS 3000. Les conditions de cette analyse sont regroupées dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Conditions de l'analyse par chromatographie ionique

	Cations	Anions
Eluant	NaOH mM	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> mM
Débit	1,5 ml/min	1 ml/min
Température	30°C	Ambiante (25-28°C)
Colonne	Ion PAC ASM-HC 4x 250 nm	Ion PAC CS12A 4x 250 nm
Détecteur	CD25	CD25
Suppresseur	ASRS ultra II 4mm	CSRS ultra II 4mm

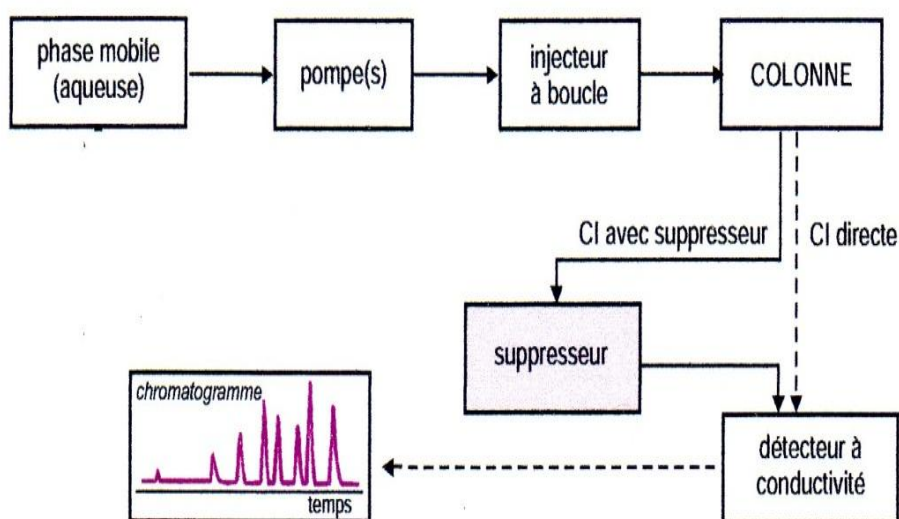


Figure 2.1: Schéma du principe d'une chromatographie ionique

### 2.2.3. Etudes des principes actifs d'*Ajuga iva L*

### 2.2.3.1. Caractérisation colorimétrique des principes actifs

#### 2.2.3.1.1. Les tanins

On introduit 5ml d'infusé dans un tube à essai auquel on a ajouté 1ml de  $\text{FeCl}_3$  à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre. La présence de tanins catéchiques est caractérisée par addition à 5ml d'infusé d'un ml d'acide chlorhydrique concentré. Porté à ébullition pendant 10min, il apparaît un précipité rouge soluble dans l'alcool isoamylique. La différenciation des tanins catéchiques et galliques est obtenue par la réaction de Stiasny. A 30ml d'infusé à 5 %, ajouter 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40 % + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré), puis chauffer au bain-marie pendant 15 à 30 min. L'obtention de précipité rouge montre la présence de tanins catéchiques. Le filtrat (10ml) est saturé avec de l'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1ml d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1 %.

Le développement d'une teinte-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

#### 2.2.3.1.2. Flavonoïdes

A 5ml d'infusé, ajouter 15ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 10% puis 5ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dilué au demi. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu-violacé en milieu basique, nous pouvons conclure à la présence d'anthocyanes.

#### - Réaction à cyanidine

Introduire dans un tube à essai 5ml d'infusé, ajouter 5ml d'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95°C, eau distillée, acide chlorhydrique concentré à parties égales V/V/V = 5ml), puis quelques copeaux de magnésium et 1ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rose-orangée (flavones) ou rose-violacée (flavonones) ou rouge (flavonol, flavononol).

#### 2.2.3.1.3. Alcaloïdes

Evaporer 25 ml d'extrait méthanolique à sec, ajoutez 5ml d'HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain-marie.

Filtrer le mélange et réaliser le test de Mayer.

Réactif de Mayer : 25g de KI et 1,358g de HgCl<sub>2</sub> solubilisé dans 100 ml d'eau.

La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence d'alcaloïdes.

#### 2.2.3.1.4. Caractérisation des composés réducteurs

- Introduire 5ml de décocté aqueux à 10 % dans une capsule et évaporer à sec au bain-marie.
- Ajouter au résidu sec 1ml de réactif de Fehling (0,5 ml de réactif A + 0,5 ml de réactif B).
- L'obtention d'un précipité rouge-brique indique la présence de composés réducteurs.

#### 2.2.3.1.5. Les saponosides

Préparer un décocté à 1 %, filtrer et ajuster à 100ml après refroidissement. Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, répartir successivement de 1 jusqu'à 10 ml de décocté.

- Ajuster le volume de chacun des tubes à 10ml avec de l'eau distillée.
- Agiter chaque tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de deux agitations par seconde.
- Laisser reposer 15min et mesurer la hauteur de la mousse de chacun des tubes.
- Le tube dont la hauteur est de 1cm indique la valeur de l'indice de mousse [126].

$$\text{Indice de mousse} = \frac{1000}{\text{n}^\circ \text{ du tube à 1 cm de mousse de hauteur}}$$

#### 2.2.3.2. Extraction des composés polaires et apolaire :

Les composés polaires et apolaires sont extraits à l'aide du soxhlet.

#### Principe



L'extracteur de soxhlet permet le traitement de solides (matériel végétal), avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal.

Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et surmontée d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient clair [127].

#### 2.2.3.2.1. Extraction au soxhlet

On pèse 40 g de plante sèche finement broyée et on l'introduit dans la cartouche en cellulose située dans le soxhlet. Ce dernier est constitué aussi d'un ballon à fond plat où sont placés 400ml d'éther de pétrole. Par la suite le dispositif est porté à ébullition (105°C).

Après une douzaine de siphonages, nous récupérons d'une part, le ballon contenant le solvant enrichi en substances solubles (fraction lipidique) et d'autre part, la matière végétale contenue dans la cartouche de cellulose que l'on nommera marc et qu'on laisse sécher à l'air libre.

Le marc récupéré et séché est réintroduit dans une seconde cartouche et soumis à une seconde extraction au soxhlet en utilisant cette fois-ci du méthanol

(65°C), afin de récupérer les substances polaires [128].

Après une douzaine de siphonages, nous récupérons un marc et le ballon contenant le solvant qui renferme la fraction polaire de la plante.

Les extraits méthanolique et éthéré secs des deux extractions sont obtenus par évaporation du solvant grâce à un évaporateur rotatif

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des fractions polaire et apolaire de la plante. L'extrait méthanolique sera utilisé dans l'activité antioxydante et antimicrobienne.

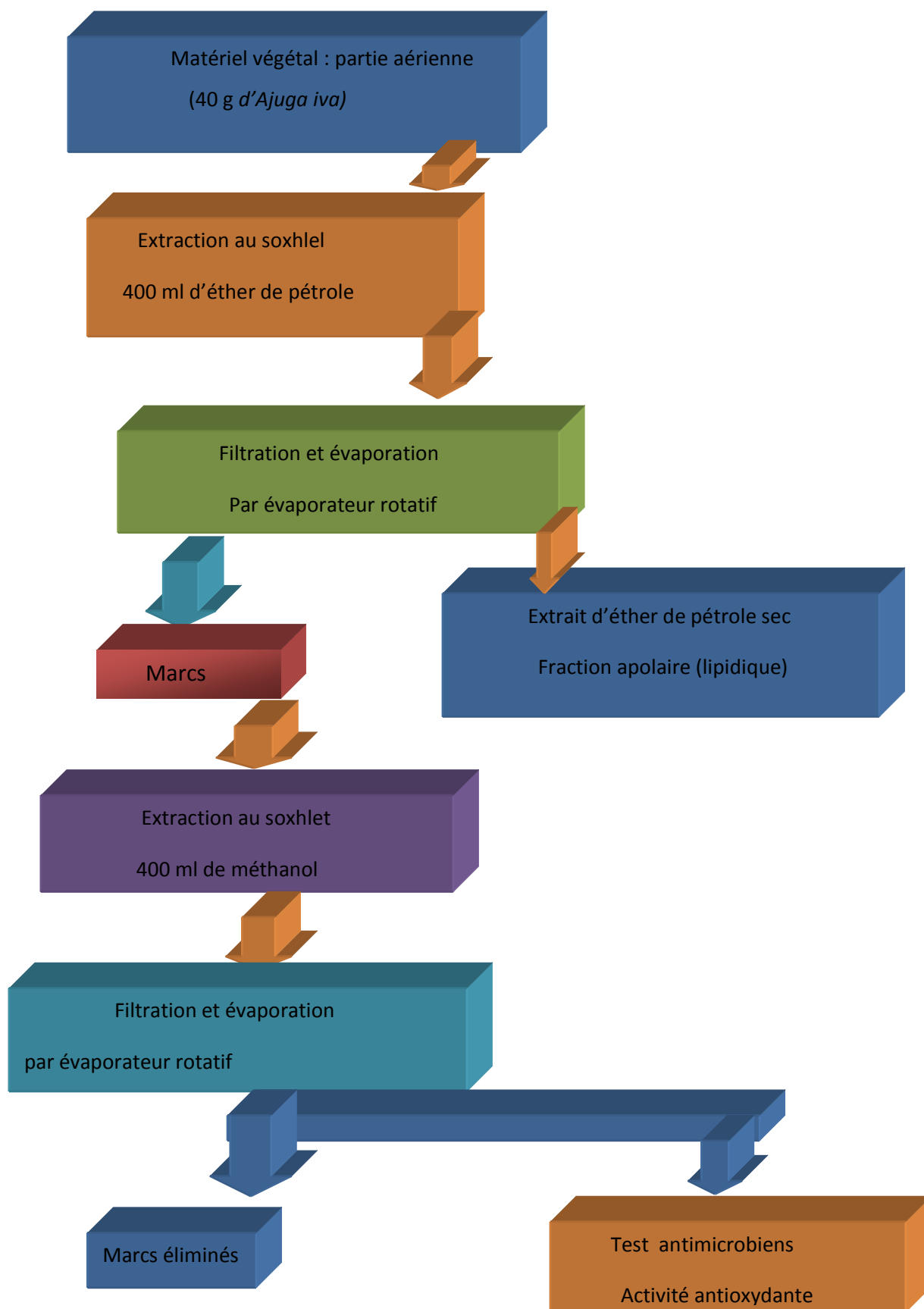


Figure 2.2 : Protocole expérimental d'extraction des composés polaire et apolaire par soxhlet [129].

### 2.2.3.3. Dosage de quelques principes actifs d'*Ajuuga iva* L.

#### 2.2.3.3.1. Analyse par spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie est une technique analytique qui consiste à mesurer l'absorbance d'une substance chimique donnée en solution préalablement étalonnée sur la longueur d'onde de l'espèce chimique à étudier [130].

#### 2.2.3.3.2. Dosage des composés phénoliques

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols, l'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu décrit par Singleton et Rossi en 1965 est la plus utilisée.

#### Principe

Le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3Mo_{12}O_{40}P$ ). Ce mélange est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène [131].

Les polyphénols sont déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par MIAULISKAS et al., (2004).

Nous laissons macérer 1 g de poudre dans 20 ml de solvant organique (éthanol absolu). Après 24 h, le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif.

De cet extrait éthanolique, 1 ml est mélangé à 5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois auquel nous ajoutons 4 ml de bicarbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à concentration de 75 g/l.

La lecture de la densité optique s'effectue à 765nm après une heure d'incubation. Le témoin est préparé en suivant le même protocole que précédemment mais sans ajout de l'extrait éthanolique.

La quantification des polyphénols est réalisée en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax$ ). Cette dernière est obtenue par l'utilisation de l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions opératoires que pour l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en mg équivalence d'acide gallique (EAG/g) par gramme de plante sèche. Nous avons réalisé 3 répétitions [133].

#### 2.2.3.3.3. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d'ABDEL-HAMEED, (2008)

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode du chlorure d'aluminium qui utilise la rutine comme composé de référence. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïdes-aluminium dont l'absorbance maximale est à 415 nm.

A partir de l'extrait méthanolique (10mg/ml), 100 $\mu$ l sont prélevés et mélangés à 100  $\mu$ l d'une solution de trichlorure d'aluminium (à 20 % dans du méthanol), nous ajoutons une goutte d'acide acétique. L'ensemble est dilué avec 5ml de méthanol. Après incubation à une température ambiante pendant 40 min, la lecture de la DO se fait à 415 nm.

Le blanc est préparé avec 100 $\mu$ l d'extrait méthanolique de la plante et une goutte d'acide acétique. L'ensemble est dilué avec 5ml de méthanol.

La lecture de l'absorbance du standard (rutine à 0,5 mg/ml) est effectuée dans les mêmes conditions opératoires. La teneur en flavonoïdes est déterminée selon la formule suivante en rutine équivalence (RE) :

$$x = \frac{A.m_0}{A_0.m}$$

x : Teneur en flavonoïdes (mg/mg)

A : Absorbance de l'échantillon.

A<sub>0</sub> : Absorbance du standard (rutine)

m : Masse de l'échantillon

m<sub>0</sub> : Masse de la rutine

#### 2.2.3.3.4. Analyse qualitative par HPLC

L'analyse qualitative par HPLC a pour but de déterminer la composition des différentes fractions analysées : flavones-flavonols, acides phénoliques, C-glycosides, anthocyanes et hétérosides flavoniques.

L'analyse a été réalisée en utilisant la chromatographie à haute performance à détecteur d'iode (HPLC/DAD).

##### 2.2.3.3.4.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

###### Principe

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Les applications de ce procédé sont donc potentiellement très nombreuses, d'autant plus que beaucoup de mélanges hétérogènes, ou sous forme solide, peuvent être mis en solution par l'utilisation d'un solvant.

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit :

1. On immobilise dans une colonne un solide finement divisé appelé phase stationnaire,
2. On place au sommet de cette colonne un petit volume de l'échantillon à séparer,
3. On force cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas au moyen de la phase mobile afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile [126] ; [135] ; [136].

La séparation des composés dépend de leur affinité pour les deux phases non miscibles, une phase stationnaire et une phase mobile (solvants d'élution de polarités différentes) [84] ; [137].

###### - Appareillage de HPLC

L'appareillage de HPLC est formée de :

- Un ou plusieurs réservoirs de la phase mobile,
- Un système de pompe,
- Un système d'induction d'échantillon,
- Une colonne,
- Un système de détection et d'enregistrement

Tableau 2.2 : Les conditions opératoires de HPLC/D

Matériel	Type et caractéristiques	Fournisseur
Colonne	C18	SHIMADZU
Diamètre	4,6 mm	
Longueur	25 mm	
Température	25°C	
Pompe	1 ml/min	SHIMADZU
Détecteur multi-faisceaux	260nm ≤ λ ≤ 380 UV visible	SHIMADZU

- Phase mobile utilisée pour les flavones et flavonols et les acides phénols :  
Solvant A : CH<sub>3</sub>COOH à 2% (acide acétique)  
Solvant B : CH<sub>3</sub>OH pure (méthanol)
- Phase mobile utilisée pour les C-glycosides et anthocyanes :  
Solvant A : CH<sub>3</sub>COOH à 2% (acide acétique)  
Solvant B : CH<sub>3</sub>OH pure (méthanol)
- Phase mobile utilisée pour les hétérosides :  
Solvant A : H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N (Acétonitril) (98 :2)  
Solvant B : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N (79 :19 :2)

#### 2.2.3.4.Méthodes d'extraction des polyphénols

##### 2.2.3.4.1. Extraction étherée et n-butanolique

Cette extraction est réalisée dans le but d'obtenir : des flavones et flavonols, des acides phénols, des anthocyanes et des C-glycosides.

Le protocole suivi a été mis au point par LEBRETON *et al.*, 1967 à partir du schéma initial de BATE SMITH *et al.*, 1954 (Figure 2.3).

### Mode opératoire

Dans un bécher, une hydrolyse acide est réalisée à partir de 1g de poudre végétale auquel on ajoute 80 ml d'acide chlorhydrique 2N. Le mélange est porté au bain-marie à 40°C pendant 40 min avec insufflation d'air toutes les 10 min à l'aide d'une pipette permettant ainsi l'oxydation des anthocyanes. Après refroidissement, le décocté est transféré dans une ampoule à décanter et soumis à 3 bains d'éther successifs de 50 ml chacun pendant 30 min. C'est l'extraction à l'éther.

A chaque décantation, deux phases se distinguent, l'une supérieure dite épiphase, et l'autre inférieure dite hypophase.

Epiphase étherée : De couleur vert-jaunâtre, elle contient les flavones-flavonols et les acides phénols. Elle est récupérée après chaque bain, et soumise à évaporation sous hotte ventilée, dans de grandes boîtes de Pétri en verre, le résidu sec est récupéré avec 5 ml de méthanol (CH<sub>3</sub>OH).

Hypophase acide : De couleur brune rougeâtre, elle renferme les C-glycosides et les anthocyanes. A cette phase, on ajoute 50 ml de n-butanol. La décantation dure 30 min. C'est l'extraction n-butanolique.

Le n-butanol forme une épiphase rougeâtre qui est récupérée et séchée sous hotte ventilée, le résidu sec est récupéré avec 5 ml de méthanol.

L'extrait est conservé au frais, à 4°C, pour une analyse qualitative par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Figure 2.3)



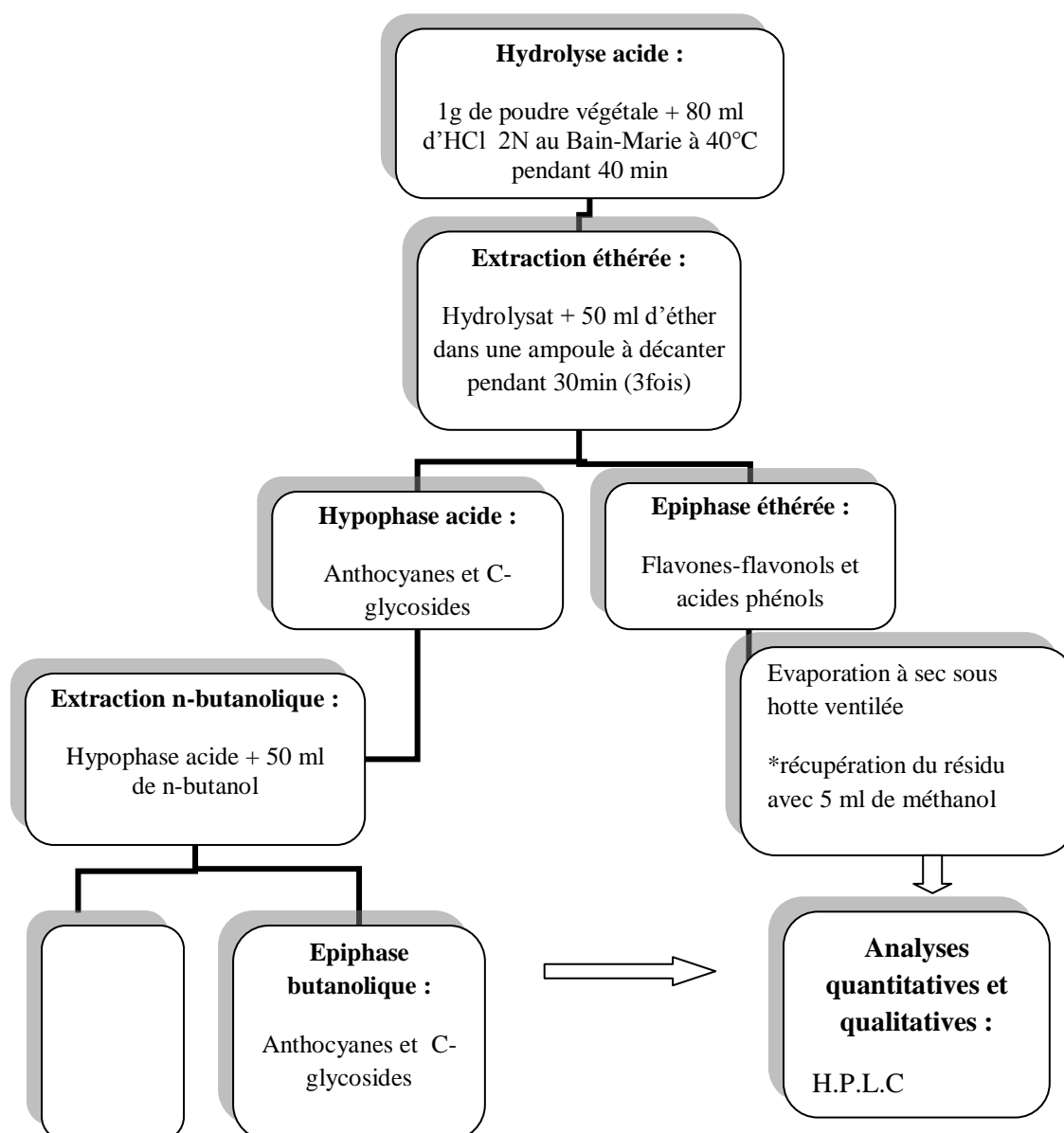


Figure 2.3 : Protocole expérimental d'extraction et d'identification des flavones et flavonols, des acides phénols, des anthocyanes et des C-glycosides (LEBRETON et al., 1967)

#### 2.2.3.4.2. Extraction des hétérosides flavoniques :

Dans un bécher, 1g de poudre végétale est additionnée à 100 ml d'éthanol à 70° pendant 48 h. Le mélange est séché dans un évaporateur rotatif. Le résidu sec est récupéré avec 100 ml d'eau distillée bouillante. Après refroidissement, le mélange est décanté avec 50 ml de n-butanol, deux phases apparaissent [138].

- une hypophase aqueuse : de couleur brunâtre et qui est éliminée.
- une épiphase butanolique : de couleur verdâtre contenant les hétérosides flavoniques, et qui est évaporée à sec sous hotte ventilée. L'extrait est récupéré avec 5 ml de méthanol puis conservé au frais pour être utilisé pour les analyses qualitatives et quantitatives (Figure 2.4).

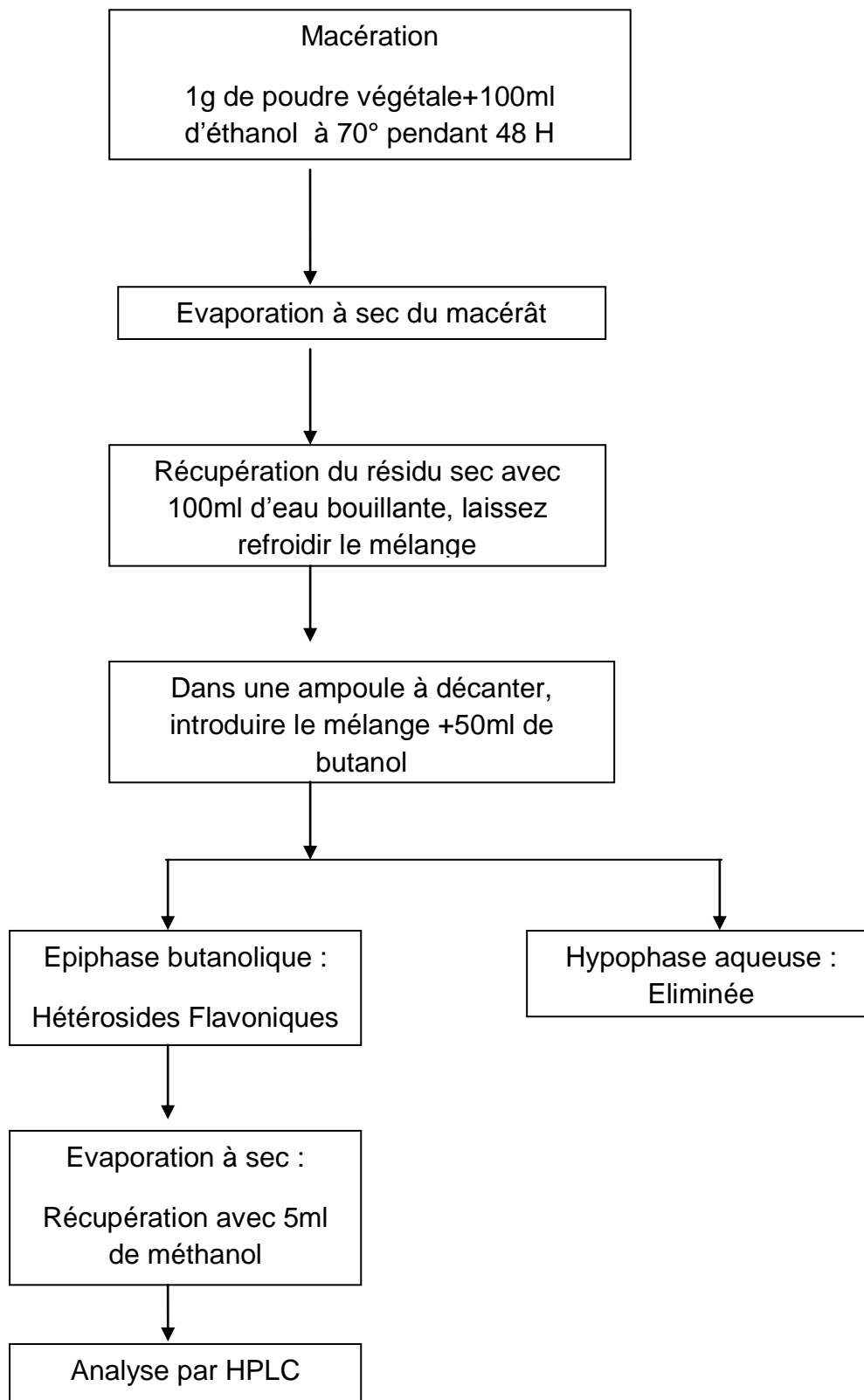


Figure 2.4 : Protocole expérimentale d'extraction des hétérosides flavoniques selon HARBORNE, (1973)

## 2.2.4 Etude biologique d'Ajuga iva

### 2.2.4.1. Activité antimicrobienne

Dans cette partie nous avons testé la sensibilité de quelques souches microbiennes, vis-à-vis de la plante, référencées ATTC et présentées dans le tableau 2.3 suivant :

Tableau 2.3. Les souches bactériennes

Gram	Bactéries	Référence(ATTC)
+	<u>Micrococcus luteus</u>	533
+	<u>Staphylococcus aureus</u>	6538
+	<u>Bacillus cereus</u>	10876
+	<u>Bacillus subtilis</u>	9372
+	<u>Enterococcus faecalis</u>	C2035
-	<u>Pseudomonas aerogenosa</u>	27853
-	<u>Esherichia coli</u>	25922
	<u>Candida albicans</u>	24433

#### 2.2.4.1.1. Milieux de culture

Les milieux suivants ont été utilisés pour l'étude de l'effet antibactérien :

- Bouillon nutritif et gélose Mueller Hinton pour les bactéries,
- Bouillon nutritif et gélose de dextrose de Sabouraud pour les levures(GDS).

#### 2.2.4.1.2. Préparation des boîtes de Pétri

Après liquéfaction des milieux à autoclave à température de 120°C pendant 20min, nous coulons les boîtes aseptiquement, nous utilisons des boîtes en plastique à usage unique, stérile (Cf. annexes).

#### 2.2.4.1.3. Préparation des suspensions microbiennes

Il est indispensable d'utiliser des cultures jeunes, leur réactivation se fait comme suit :

- Prélèvement de la souche à partir du milieu de conservation de gélose nutritive à l'aide d'une anse de platine stérile,
- Culture de cette souche Gélose Mueller Hinton. La durée de l'incubation est de 24 heures à une température de 37°C.

Nous préparons la suspension de chaque souche séparément en prélevant à l'aide d'une anse de platine stérile 2 colonies qui équivalent à  $2 \cdot 10^6$  CFU/ml. Elles sont déposées dans un tube contenant une solution physiologique stérile.

La densité optique de chaque suspension est ajustée à 0,5; la lecture se fait à 570 nm [142].

#### 2.2.4.1.4. Produit à tester

Afin de tester le pouvoir antimicrobien, nous avons procédé comme suit :

- Dans un premier temps, nous avons testé l'extrait méthanolique dilué dans de l'éthanol et le méthanol,
- Dans un deuxième temps nous avons testé un décocté et un infusé à 10 % de la plante[86].

Nous avons utilisé des standards de référence : antibiotiques (600mg/ml) tels que :

- ATB1 : Pénicilline G
- ATB2 : Lymécilline
- Fongicide : Exodéril.

#### 2.2.4.1.5. Mise en évidence de la zone d'inhibition

Les méthodes de diffusion appelées aussi antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Elles ont l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester et de s'appliquer à un très grand nombre de bactéries [144].

Des disques de papier buvard de 6 mm, imprégnés de la solution à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, la solution testée diffuse de manière uniforme. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture[139]. (Nous procédons de la même manière pour les antibiotiques).

Les boîtes de Pétri sont étiquetées et installées dans un incubateur à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 72 heures pour les levures.

#### 2.2.4.1.6. Expression des résultats

L'activité antimicrobienne est évaluée en mesurant le diamètre d'inhibition [144].

Selon LECLERC, (1975) une souche est dite :

- Sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieure ou égale à 15mm,
- Peu sensible lorsque la zone d'inhibition est inférieure à 15mm,
- Résistante lorsque la zone d'inhibition est inexistante.

### 2.2.4.2. Activité antiradicalaire au DPPH

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer les activités antioxydantes des extraits des plantes.

Pour évaluer les activités antiradicalaire et antioxydantes nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil), qui est un radical libre stable et qui montre une coloration violette foncée mais, lorsqu'il est réduit, cette coloration devient jaune pâle[143] ; [144].

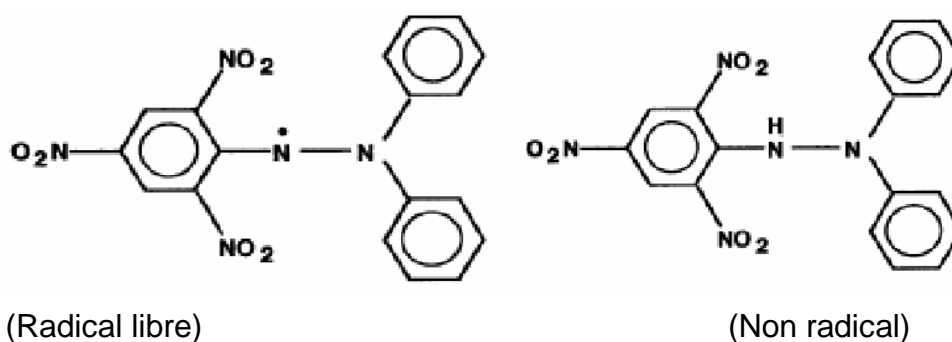


Figure 2.5 : Forme libre et réduite du DPPH[147] ; [146].

#### 2.2.4.2.1. Préparation de la solution du DPPH

Nous solubilisons 2 mg de DPPH dans 50 ml de méthanol absolu. Le mélange est conservé à l'abri de la lumière.

#### Préparation de l'extrait

Une solution mère est préparée en dissolvant 1 mg d'extrait méthanolique dans 1 ml de méthanol absolu (1mg/ml). A partir de cette solution, on réalise une série de dilution de l'ordre du µg/ml.

#### 2.2.4.2.2. L'essai au DPPH

Dans des tubes secs stériles, on introduit à partir de la solution mère (100µl, 200µl,300µl ,500µl,700µl et 900µl) ; on ajuste à 1 ml avec du méthanol. On ajoute 2ml de la solution de DPPH dans chaque tube. On laisse incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Des solutions standards (acide gallique,  $\alpha$  tocophérol, rutine, acide ascorbique et quercétine) sont préparées en suivant les mêmes étapes que précédemment (voir 2.2.3.2.2.). La lecture de la densité optique se fait à 515 nm [149].

#### 2.2.4.2.3. Expression des résultats.

L'activité antioxydante exprime la capacité de piéger le radical libre. Elle est estimée par le pourcentage(%) de décoloration du DPPH en solution dans du méthanol selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{blanc}} - \text{Abs}_{\text{test}}}{\text{Abs}_{\text{blanc}}} \right) \times 100 \quad [150]$$

$\text{Abs}_{\text{blanc}}$  : absorbance du blanc

$\text{Abs}_{\text{test}}$  : absorbance de l'échantillon

Le blanc est composé de 1 ml de méthanol et 2 ml de solution de DPPH. On effectue 3 répétitions pour chaque essai. Chaque valeur de l'activité oxydante est donc calculée sur la moyenne de trois répétitions. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures  $\pm$ SEM.

La valeur EC50 (appelée aussi IC 50) est déterminée pour chaque extrait. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Le témoin est constitué de méthanol.

Les valeurs EC50 moyennes ont été calculées par régressions linéaires ou polynomiales sur les courbes qui portent en abscisse, la concentration des composés testés, et en ordonnée, l'activité antioxydante en pourcentage [151].

#### 2.2.4.2.4. Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée sur Statistica 7.0 de Statsoft Inc, Tulsa, USA et IBM SPSS Statistics 19.0 d'IBM Company, Chicago, Illinois, USA.

Il existe diverses manières d'accéder à la concentration efficace d'inhibition à 50% des radicaux. La méthode graphique qui consiste à



déterminer visuellement les points reste grossière dans ses résultats. De façon plus rigoureuse, on peut établir des régressions linéaires ou polynomiales sur des portions de courbe (2 à 4 points autour de la concentration recherchée correspondant à un pourcentage d'inhibition à 50%).

La validité de ces régressions est testée par le calcul des coefficients de corrélation qui doivent être très proches de 1,000 et des degrés de signification  $p$  qui doivent être aussi bas que possible ( $<<0,05$  voire  $<<0,01$ ). Ces simulations autour du pourcentage d'inhibition à 50% nous permettent d'en déduire la valeur et la marge d'erreur correspondante. Nous donnons à chaque fois les intervalles de confiance à 95

#### 2.2.4.3. Activité hypoglycémiante

##### Principe

Le principe de l'étude consiste à mettre en évidence l'activité hypoglycémiante de l'extrait aqueux de la plante chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane.

L'alloxane est l'acide mésoxalique. Il provoque un diabète expérimental en détruisant les cellules des îlots de Langerhans, conduisant par conséquent au diabète.

##### Matériel et protocole expérimental

Dans cette partie expérimentale, nous avons suivi le protocole du Laboratoire de Pharmacologie du CRD de SAIDAL selon le document de référence de NOVES PANDA., (2001).

##### 2.2.4.2.1. Matériel végétal

Nous préparons trois doses d'une infusion à partir de la poudre de plantes sèches.

- Dose 01:0, 05g/ml.
- Dose 02 : 0,10 g/ml.
- Dose 03 :0,15g/ml

### Matériel animal

L'expérience a été conduite sur 30 rats femelles (5 lots de 6 rats chacun) de souche Wistar de poids variant entre 190 et 200 g. Ils sont élevés à une température de 25°C et alimentés avec des granulés d'origine ONAB.

- Lot 01 (témoin eau) : animaux traités par l'alloxane monohydrate + eau physiologique,
- Lot 02 (témoin Diabénil®) : animaux traités par l'alloxane monohydrate + médicament antidiabétique (Diabénil®),
- Lot 03(essai E<sub>1</sub>) : animaux traités par l'alloxane monohydrate+ extrait aqueux de plante à une dose de 0,05g/ml,
- Lot 04(essai E<sub>2</sub>) : animaux traités par l'alloxane monohydrate + extrait aqueux de plante à une dose de 0,10g/ml,
- Lot 05 (essai E<sub>3</sub>) : animaux traités par l'alloxane monohydrate + extrait aqueux de plante à une dose de 0,15g/ml.

Notre expérimentation se déroule selon les étapes :

#### Etape 1 :

- Détermination de la glycémie à T<sub>0</sub>, début de l'expérimentation. Les rats sont mis à jeun 18 heures avant la détermination de la glycémie de base (T<sub>0</sub>).
- Prélèvement du sang : Le sang est prélevé de l'animal légèrement anesthésié par voie respiratoire (en utilisant de l'éther), par ponction au niveau du sinus recto-orbital à l'aide d'un tube capillaire ; le sang est récupéré dans des tubes héparine.

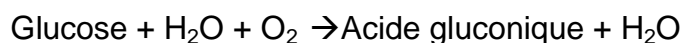
Après centrifugation à 4000t/min pendant 10 min, le plasma est récupéré dans des tubes secs et le dosage de la glycémie est effectué par la méthode enzymatique.

- Dosage du glucose

Le glucose dans le sang est déterminé par une méthode colorimétrique.

#### Principe

- L'enzyme glucose oxydase déshydrogénase (GOD) oxyde le glucose en gluconolactone.
- Le gluconolactone en présence d'eau se transforme en acide gluconique et en eau oxygénée.



- L'eau oxygénée obtenue est scindée par la peroxydase qui oxyde un donneur d'hydrogène, l' amino-4-antipyrine-phénol qui passe d'une forme réduite incolore à une forme oxydée de couleur rosâtre.



Le GOD agit sélectivement sur le glucose.

#### Mode opératoire

Trois tubes secs sont préparés et nous introduisons :

- Dans un premier tube : 1 cc de réactif (blanc)
- Dans un deuxième tube : 1 cc de réactif + 10µl de glucose
- Dans un troisième tube : 1 cc de réactif + 10µl de l'échantillon

La préparation des réactifs pour le dosage de la glycémie est reportée dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Les réactifs utilisés lors du dosage de glucose par spectrophotométrie

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif	1 cc	1 cc	1 cc
Etalon	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10µl

1 cc=1000 µl

On agite les tubes et on laisse incuber à température ambiante pendant 30 min. On effectue la lecture de la densité optique à 505 nm. Le taux de glucose C est donné par la relation suivante :

$$C = \frac{DO_{\text{essai}}}{DO_{\text{étalon}}} * N$$

C : Taux de glucose (g/l)

DO<sub>essai</sub> : Densité optique de l'échantillon

D<sub>étalons</sub> : Densité optique standard

N : concentration de glucose standard (1 g/l)

### Etape 2 :

On provoque le diabète sucré (hyperglycémie) chez les rats par l'administration de 1 ml/rat, par voie sous cutanée, d'une solution d'alloxane monohydrate (à raison de 150mg/kg). Cette solution est diluée dans de l'eau physiologique à 0,9%

- La détermination du taux de glycémie pour chaque rat est notée 72 heures après l'administration de l'alloxane.

### Etape 3 :

Les différentes solutions utilisées : l'eau physiologique, le Diabénil® et les différentes doses de l'extrait aqueux sont quotidiennement administrées par voie orale à raison de 1ml/rat pendant 03 semaines.

- Chaque fin de semaine, le dosage des taux de glycémie est effectué pour chaque rat.

- Le pourcentage de réduction de la glycémie est calculé selon la formule suivante :

$$P = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100$$

P : pourcentage de réduction de la glycémie

C<sub>i</sub> : glycémie moyenne du témoin (g/l)

C<sub>e</sub> : Glycémie moyenne de l'essai (g/l) [152].

#### 2.2.4.2.1. L'analyse statistique

Nous avons comparé, par un test de Student, les variations de la glycémie entre les différents échantillons (témoin eau, témoin Diabénil®), essais E<sub>1</sub> à E<sub>3</sub>) pour chaque période (de la 1<sup>ère</sup> à la 3<sup>ème</sup> semaine).

Un test de Levene d'homogénéité des variances accompagne systématiquement le test de Student pour la lecture des degrés de signification p adéquats (selon l'homogénéité ou l'hétérogénéité des variances).

#### 2.2.4.3. Etude de l'activité antalgique <<Writhing test >>.

La méthode utilisée est similaire à celle décrite par KOSTER et *al.*, (1959) et modifiée par COLLIER et *al.*, (1968). Nous avons étudié l'activité antalgique sur des souris.

##### Principe :

Une réaction douloureuse est provoquée chez les souris par injection intrapéritonéale d'acide acétique à raison de 0,10/10g de poids corporel (Pc).

Les douleurs se manifestent par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et des torsions de la musculature dorso-abdominale (spasmes), qui peuvent être réduites par un produit antispasmodique (extrait aqueux).

##### Mode opératoire :

Cinq (5) doses de l'extrait aqueux sont administrées aux souris réparties en 7 lots. Chaque lot se compose de 6 souris mâles, souche NMRI, de poids 18±2g.

Le lot contrôle positif reçoit de l'ibuprofène diluée dans de l'eau physiologique à 0,9% à raison de 200mg/kg.

Tableau 2.5 : Répartition des lots utilisés dans l'activité antispasmodique

Lot	Injection
Lot témoin eau	Eau physiologique
Lot témoin Ibuprofène	Dose = 200mg/kg.
Lot essai 1	Dose 01 = 0,025g/ml.,
Lot essai 2	Dose 02 =0,050 g/ml
Lot essai 3	Dose03 =0,150g/ml
Lot essai 4	Dose 04 =0,200 g/ml
Lot essai 5	Dose 05=0,400 g/ml

- A T<sub>0</sub>: Injection par voie intrapéritonéale de 0,5ml de la dose de l'extrait aqueux équivalente pour chaque lot (Figure I6),
- Après 30min : Toutes les souris mâles reçoivent 0,2ml de la solution d'acide acétique à 1 % par voie intrapéritonéale,
- 
- Après 5min : Le comptage du nombre de spasmes est observé directement sur les souris pendant 10 min [155],
- L'ibuprofène a été utilisé comme contrôle positif (200mg/kg).

#### 2.2.4.3.1. Calcul du pourcentage de réduction des spasmes [156]

Le pourcentage de réduction des spasmes (pourcentage de protection), est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de protection} = \frac{\text{Moy. des spasmes du lô t ém.} - \text{Moy. des spasmes du lô t essai}}{\text{Moy. des spasmes du lô t témoin}} \times 100$$

#### 2.2.4.4. Etude de la toxicité

Sur le plan expérimental, la DL50 est un paramètre toxicologique qui caractérise la toxicité aiguë. C'est la dose létale qui entraîne la mort de 50% des animaux soumis à l'administration de la substance.

Le but de cette expérimentation est de vérifier les résultats obtenus par El Hillaly et al., (2004 ; 2006), qui par voie orale, ont obtenu une DL50 supérieure à 14g/kg Pc, tandis que celle obtenue par voie intrapéritonéale est de 3,60g/kg Pc.

Les tests de toxicité ont été réalisés sur des souris NMRI alimentées par un mélange constitué de poudre et d'eau distillée.

#### Mode opératoire

L'étude toxicologique est effectuée en testant une dose maximale de poudre. Cette dernière peut engendrer une mortalité lors de l'administration par :

- Injection par voie intrapéritonéale,
- Gavage (voie orale) ;

Nous avons utilisé 24 souris, réparties en 2 lots de 6 souris mâles chacun et 2 lots de 6 souris femelles chacun.

- ✓ Chaque souris des 2 lots mâles et 2 lots femelles reçoit 0,5ml de la solution à 14g/kg par gavage.
- ✓ Chaque souris 2 lots mâles et 2 lots femelles reçoit une injection de 0,5ml de la solution à 3,60g/kg.

Le comportement général des souris est observé pendant une période de 14 jours.

#### Lecture du résultat :

Le calcul de la DL50 se fait selon la méthode de BERHENS et KARBER, 1949

$$DL50 = DL100 - \frac{\sum ab}{n}$$

DL50 et DL100 : doses létales à 50% et 10%

a: différence entre deux doses successives.

b = nombre moyen de morts entre deux doses successives

n = nombre moyen d'animaux par lot

Les valeurs obtenues vont être comparées avec celles fournies dans le tableau 1.3

Tableau 2.6 : Classe de toxicité : échelle de HODGE et STERNER

DL50	Indice de toxicité
Jusqu'à 1mg/kg	1 : Extrêmement toxique
De 1 à 50 mg/kg	2 : Hautement toxique
De 50 à 500mg/kg	3 : Modérément toxique
De 500 à 5000mg/kg	4 : Légèrement toxique
De 5000 à 15000 mg/kg	5 : Presque pas toxique
Plus de 15000mg/kg	6 : relativement inoffensif



## PARTIE3 : RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1 Résultat de l'étude botanique de la plante

#### 3.1.1. Etude macroscopique :

La plante récoltée est comparée au spécimen de l'herbier de l'ENSA, nous avons constaté que les deux échantillons sont identiques (Figure 3.1).



Figure 3.1 : (a): Echantillon d'*Ajuga iva* L. récoltée à Sidi Rabah (Originale)  
(b): Spécimen d'*Ajuga iva* L. de l'herbier de ENSA d'El Harrach

A l'étape suivante, nous nous sommes intéressés à d'autres aspects de la plante pour pouvoir confirmer l'identification.

#### 3.1.1.1. La fleur

Les fleurs sont petites, de 0,5 à 1 cm de longueur. Elles ont une couleur purpurine. Elles sont regroupées par 2 ou par 4 et ont une lèvre supérieure très

courte. La lèvre inférieure est plus longue, elle est composée de 3 lobes, plus grande que les sépales (Fig. 3.2). La fleur renferme 2 à 4 étamines (Fig. 3.3).



Figure 3.2 : Fleur d'*Ajuga iva* L. (loupe Gx8) (Originale)

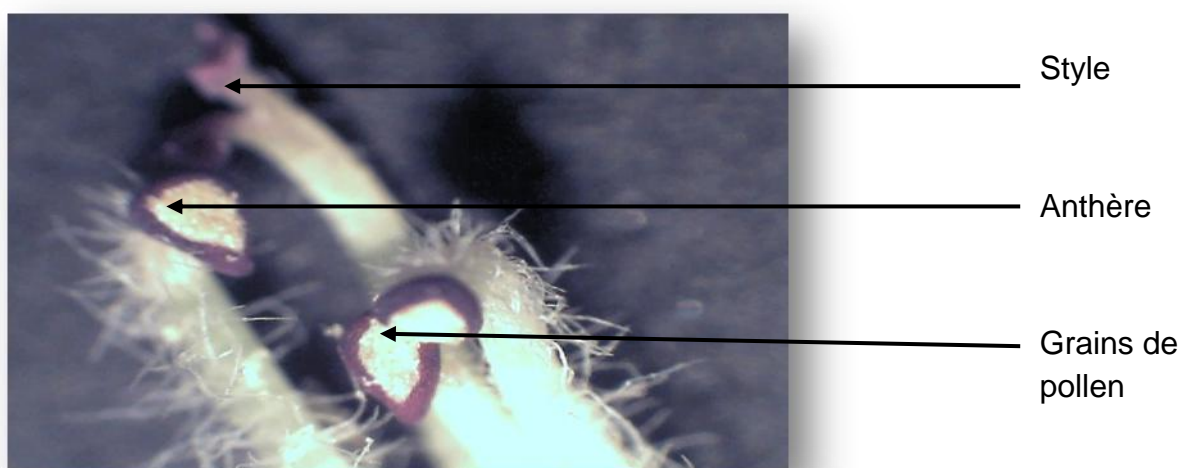


Figure 3.3 : Les étamines d'*Ajuga iva* L. vue à la loupe (GX8) (Originale)

#### 3.1.1.2. Le calice

Il mesure de 0,5 à 1cm de longueur. Il se compose de 5 dents. Il est recouvert de poils denses (fig. 3.4).

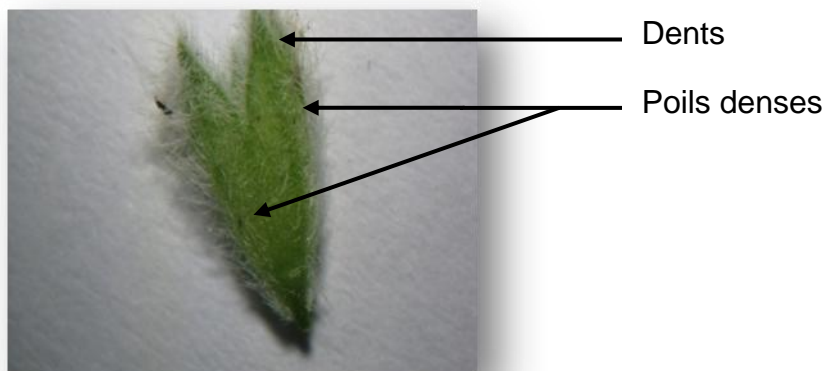


Figure 3.4 : Calice dentelé d'*Ajuga iva* L. vu à la loupe (GX8) (Originale)

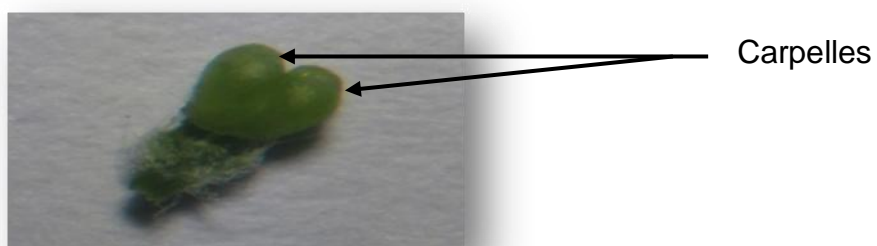


Figure 3.5 : Ovaire vu à la loupe GX8 (Originale)

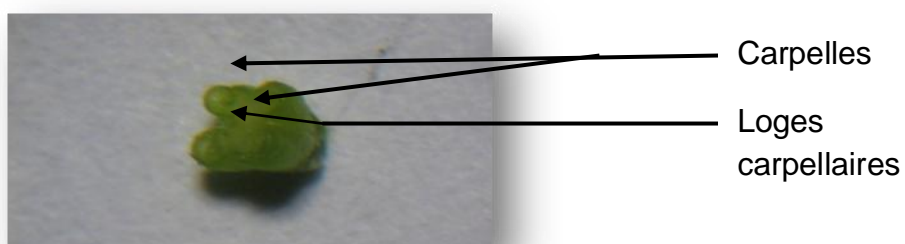


Figure 3.6 : Carpelle vue à la loupe (GX8) (Originale)

### 3.1.1.3. Les feuilles

Elles sont nombreuses, serrées et sessiles. Elles sont de forme lanceolée, longues de 3 à 5cm. Elles sont recouvertes de poils épidermiques très denses (Fig. 3.7 et 3.8)



Figure 3.7: Feuille, face supérieure, observée à la loupe (GX8) (Originale)

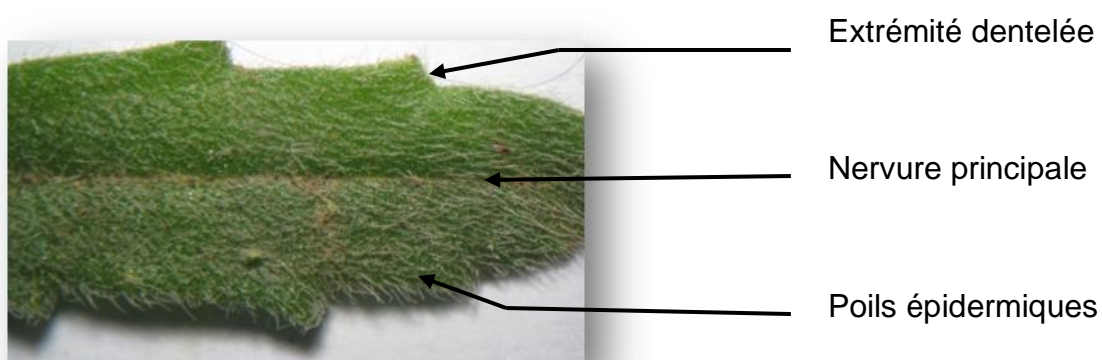


Figure 3.8 : Feuille dentelée, face supérieure, observée à la loupe (GX 2,5)

#### 3.1.1.4. La tige

La tige a une longueur de 10 à 15 cm, à section rectangulaire. Elle est couverte de poils épidermiques. Elle est ligueuse vers la base.

#### 3.1.2. Aspect microscopique

Afin de détecter ou de localiser des structures particulières, les tissus sécréteurs, nous avons effectué des coupes minces. Ces dernières ont subi une double coloration. Nous avons obtenu les résultats suivants :

##### 3.1.2.1. Les tiges :

La tige présente, de l'extérieur vers l'intérieur :

- une cuticule striée (Figure 3.9)
- une seule assise de cellule épidermique,

- un parenchyme angulaire formé par plusieurs couches de cellules vers les angles de la tige,
- un parenchyme cortical,
- du liber suivi de bois hétéroxylé,
- un parenchyme médullaire.

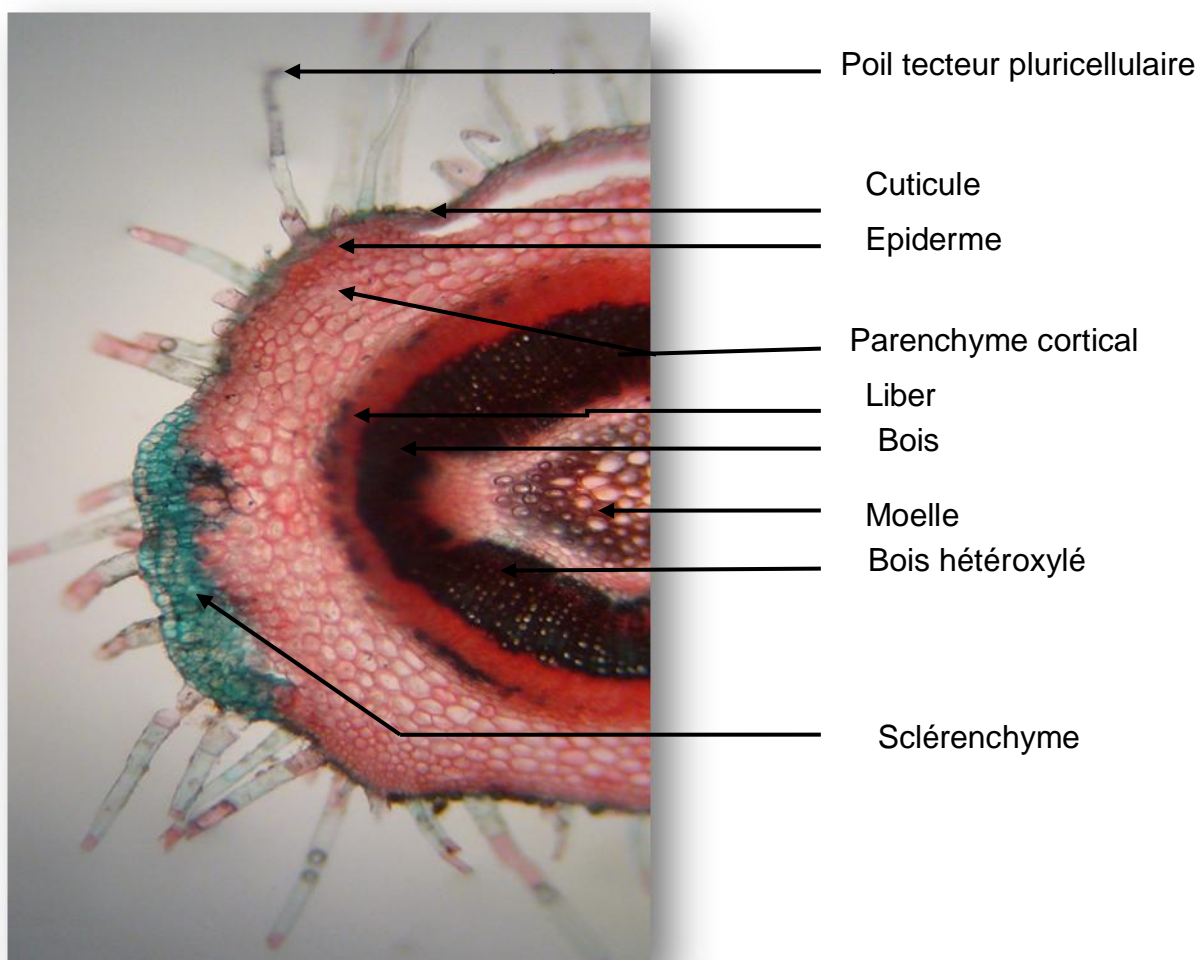


Figure 3.9 : C.T de la tige d'*Ajuga iva* L. observée au MP (GX10)(originale)

### 3.1.2.2. Les feuilles

La feuille est constituée de trois parties : deux parties minces ensérant une partie lobée.

En coupe transversale, après la double coloration, la partie mince de la feuille nous a permis d'observer les tissus suivants (en partant de l'extérieur vers l'intérieur) :

- Un épiderme supérieur constitué par une assise de cellules. Il couvre des cellules allongées contenant de nombreux chloroplastes. C'est le parenchyme palissadique.
- Un parenchyme lacuneux
- Des faisceaux conducteurs issus du méristème secondaire formé par le bois et le liber.
- Une assise de cellules épidermiques sur la face inférieure des feuilles (Figure3.10).

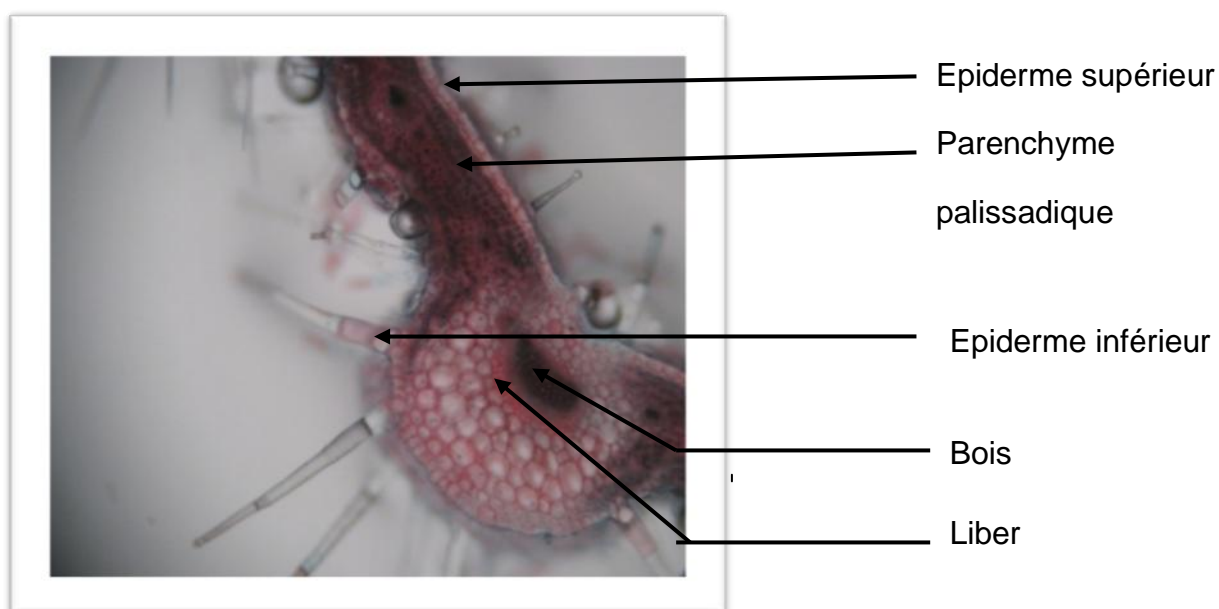


Figure 3.10 : C.T de la feuille d'*Ajuga iva* vue au MP (G 10X) (originale)

### 3.2. Résultats de l'étude phytochimique d'*Ajuga iva* L.

#### 3.2.1 .Teneur en eau

La teneur en eau de la planta est rapporté dans le tableau suivant

Tableau : 3.1 Résultats de la teneur en eau chez *Ajuga iva* L.

Poids frais(g)	1,064±0,008
Poids sec (g)	0,354±0,011
Teneur en eau de la plante	66,73±2,29 %

Les végétaux sont riches en eau, élément essentiel pour le métabolisme de la plante. Les valeurs moyennes sur 5 essais (appendice E1) nous ont donné un poids frais égal à  $1,064 \pm 0,008$  g et un poids sec égal à  $0,354 \pm 0,011$  g. La plante contient  $66,7 \pm 2,29$  % d'eau. Cette teneur en eau est conforme à celle observée par la pharmacopée Européenne 1999.

La teneur élevée en eau, chez les plantes, est en relation étroite avec l'activité métabolique. Elle fournit l'hydrogène indispensable aux réactions de biosynthèse [159].

### 3.2.2. La teneur en cendres :

La teneur en cendres obtenue est mentionnée dans le tableau 3.2 (appendice E2).

Tableau 3.2 : Teneur en cendres d'*Ajuga iva* L.

Masse de poudre(g)	Masse des cendres(g)	Teneur en cendres(%)
1,000	$0,1267 \pm 0,0029$	$12,67 \pm 0,29$

Les cendres obtenues sont de couleur claire et représentent chez *Ajuga iva* L. une teneur de  $12,67 \pm 0,29$  %. Cette teneur est conforme à celle rapportée par la pharmacopée européenne en 2002 et qui la situe entre 10 et 12 %.

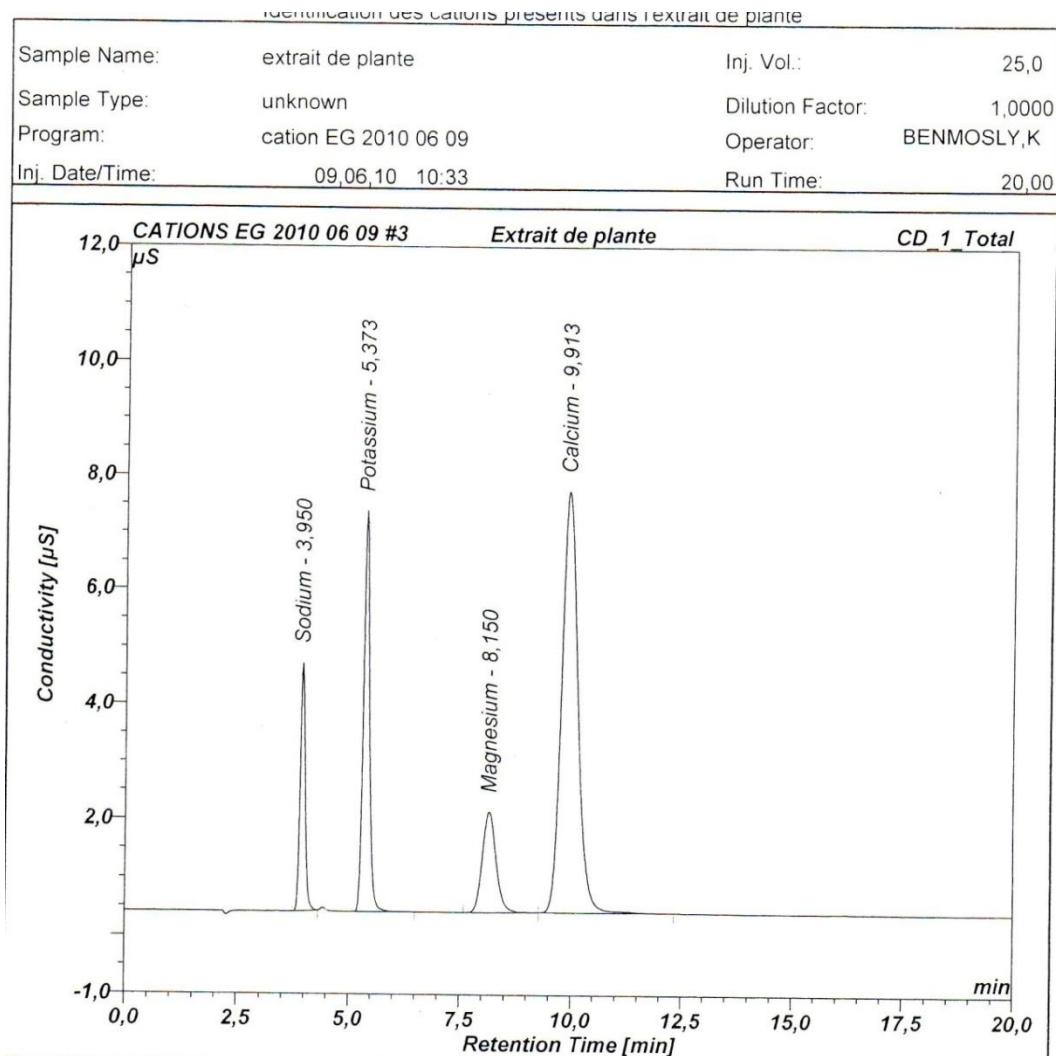
### 3.2.3. Les minéraux

#### 3.2.3.1. Les cations

La chromatographie ionique nous a permis d'obtenir le chromatogramme représenté en figure 3.11. Les teneurs en cations sont rapportées dans le tableau 3.3

Tableau 3.3 : Cations détectés par Cl

N° de pic	Minéraux	Teneur (%)	Concentration (mg/l)
01	Sodium	10,34	103,4
02	Potassium	20,96	209,6
03	Magnésium	11,35	113,5
04	Calcium	57,35	273,5

Figure 3.11 : Spectre des minéraux cationiques chez *Ajuga iva* L.

Le chromatogramme relatif aux cations montre l'absence d'oligoéléments. Néanmoins, il indique la présence des macroéléments indispensables pour le développement de la plante tels que : sodium, potassium, magnésium, calcium. Les ions Calcium et potassium sont



prédominants avec des concentrations respectives de 273,50 mg/l et 209,60 mg/l.

- On remarque aussi que la teneur en cations alcalino-terreux est de 68,70 %, elle est appréciable en comparaison à celle des métaux alcalins qui n'atteint que 31,30 %.
- La teneur en calcium dépasse largement celle du magnésium.

### 3.2.3.2. Les anions :

Les anions ont été quantifiés dans les mêmes conditions que pour les cations. La figure 3.12 représente les spectres d'absorption des différents anions. Les teneurs en anions sont consignés dans le tableau 3.4 et la figure 3.12.

Tableau 3.4 : Anions détectés par CI

N° de pic	Minéraux	Teneur (%)	Concentration (mg/l)
01	Fluorure	0,42	4,2
02	Chlorure	97,97	979,7
03	Nitrite	1,20	12,0
04	Sulfate	1,61	16,1

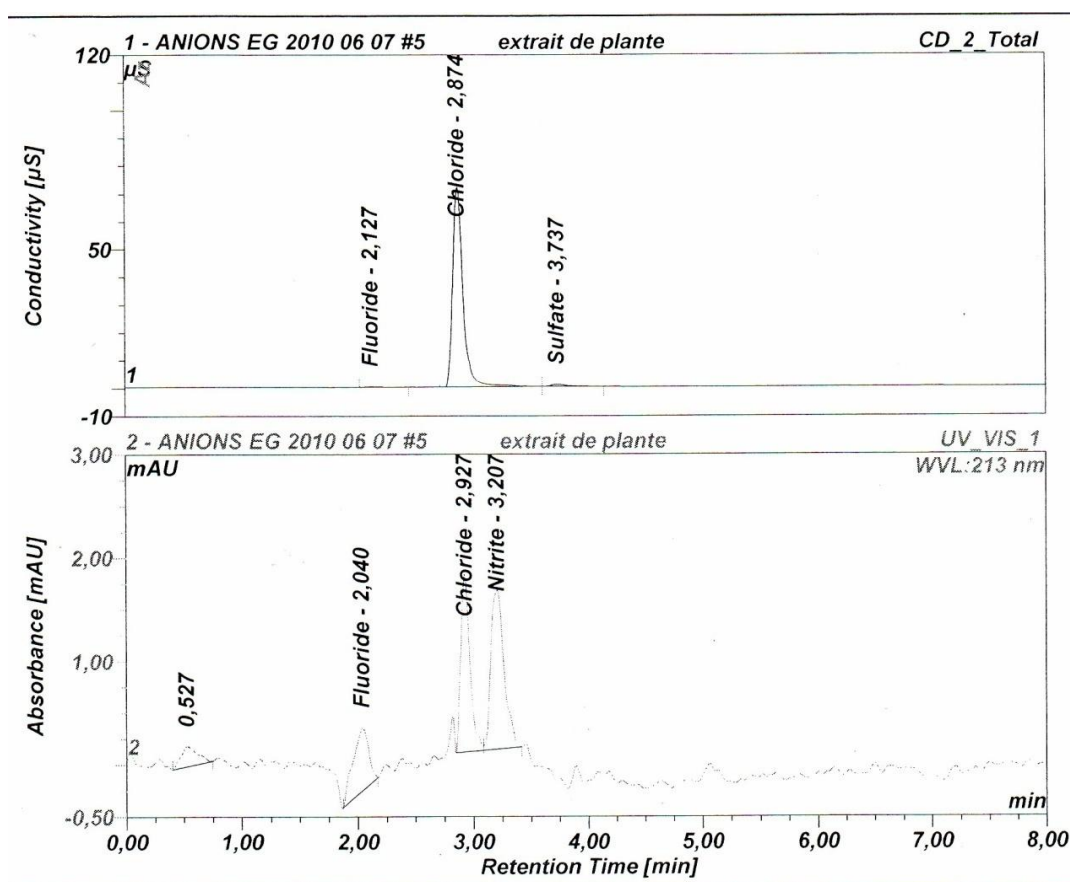


Figure 3.12: Spectre des minéraux anioniques

L'analyse du chromatogramme anionique révèle la présence des ions fluorides, sulfates et des ions nitrites en proportions variables. En revanche, on a souligné la présence en excès des ions chlorures (97,97 %).

L'excès en ions chlorures est dû à l'attaque des cendres par l'acide chlorhydrique au cours de la minéralisation.

La richesse en minéraux d'*Ajuga iva* L. expliquerait le fait qu'elle s'adapte très bien à des zones arides ou semi arides [161].

#### 3.2.4. Résultat de l'identification colorimétrique des principes actifs

L'étude de l'identification colorimétrique a permis de mettre en évidence quelques métabolites secondaires présents dans la plante, résumés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Résultat de la caractérisation colorimétrique d'*Ajuga iva*

Principes actifs	Résultats
Tanins galliques	+++
Tanins catéchiques	+++
Composés réducteurs	++
Flavonoïdes	+++
Alcaloïdes	+
Saponines	+

- +++ : Réaction très positive  
 ++ : Réaction moyennement positive  
 + : Réaction faiblement positive

Sur l'ensemble des réactions en tube, celles des tanins et des flavonoïdes ont été les plus prononcées, en comparaison à celles des alcaloïdes, des saponines et des composés réducteurs, dont la réaction est plus faible. Nos résultats concordent avec ceux de (Imai et *al.*, 1969 ; Koreeda et *al.*, 1970 ; Chung et *al.*, 1980 ; Takeda et *al.*, 1987 ; Min et *al.*, 1989 ; Muhammed et *al.*, 1999 )

### 3.2.5. Résultat de l'extraction des composés polaire et apolaire

Nous avons obtenu une teneur en composés apolaires de 15 %. Concernant les principes actifs polaires, la teneur est de 18 % dans l'ensemble de la plante sèche (Figure 3.13).

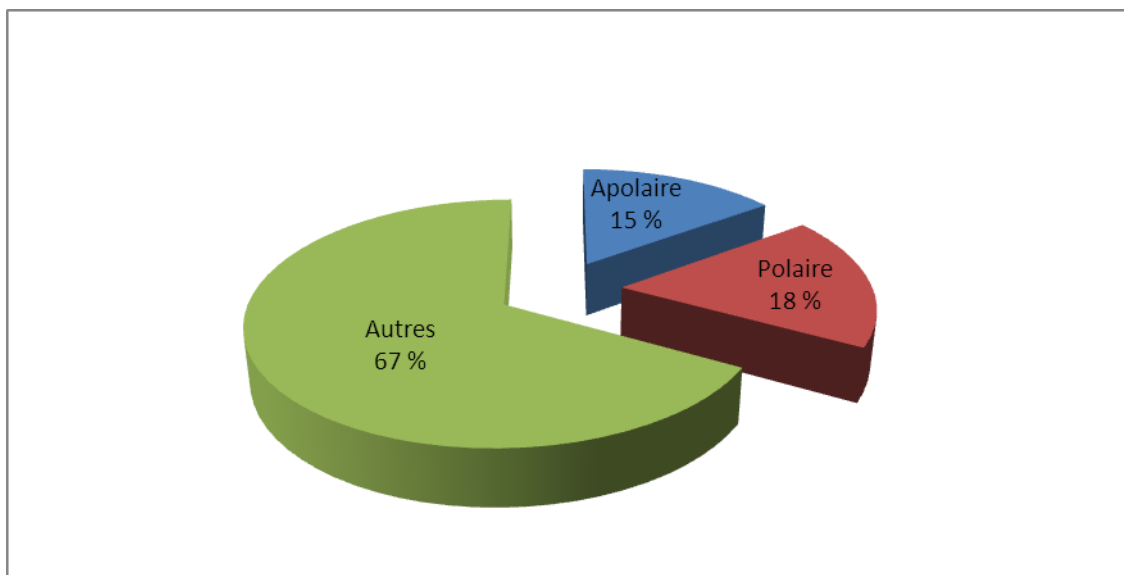


Figure 3.13 : Teneur en composés polaire et apolaire

### 3.2.6. Résultat du dosage de quelques principes actifs de la plante

#### 3.2.6.1. Dosage des polyphénols totaux

Nous avons quantifié le taux des polyphénols totaux à partir de l'extrait éthanolique de la plante. La courbe d'étalonnage est réalisée avec différentes concentrations d'acide gallique (Figure 3.14).

La teneur en polyphénols totaux est rapportée en mg équivalent acide gallique/g de plante sèche. La teneur en polyphénols totaux observée au cours de notre expérimentation est de  $33,12 \pm 0,37$  mg/EAG en g de plante sèche. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par ADJADJ, (2009) sur la même plante.

Néanmoins, la teneur en polyphénols totaux peut être différente d'une plante à une autre, et entre les espèces du même genre. Ainsi, MILIAULISKAS et al.,(2004) ont trouvé des teneurs différentes pour 4 espèces de *Salvia* ; en effet elles oscillent entre  $9,7 \pm 0,4$  et  $24 \pm 1,1$  mg EAG/g plante sèche. Des résultats similaires ont été signalés par CASIO et al., (2006), lors d'une étude effectuée sur plusieurs plantes de la famille des lamiacées. En effet, les espèces de *Thym* montrent des teneurs en polyphénols totaux de  $12,1 \pm 1,1$  mg

à  $14,1 \pm 1,2$  mg EAG/g de plante sèche. A contrario, les espèces de la sauge ont montré un taux plus élevé.

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

1- Facteurs climatiques et environnementaux : zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies, (Ebrahimi *et al* 2008).

2- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (Miliauskas *et al* 2004). ,

3- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des polyphénols totaux (Lee *et al* 2003). .

Il a été prouvé que les teneurs en polythènes totaux et en flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de croissance de la plante n'est pas adéquat.

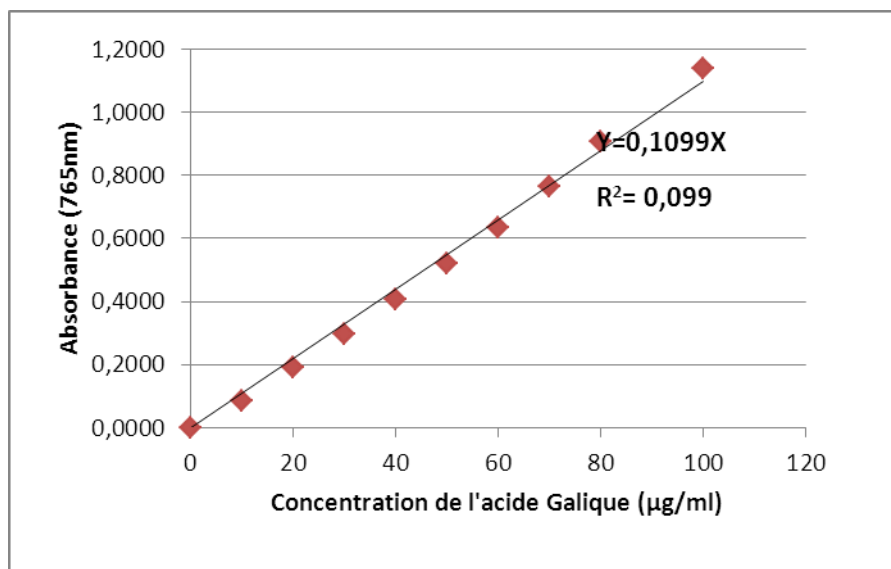


Figure 3.14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

### 3.2.6.2. Résultat du dosage des flavonoïdes dans la plante

La teneur en flavonoïdes a été déterminée à partir de l'extrait méthanolique par la formule citée dans le chapitre précédent, elle est de 3,05 %. Selon LEE et al., (2003), il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie car le rendement n'est que relatif, il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été réalisée.

### 3.2.6.3. Teneur de la plante en saponine

La teneur en saponine est déterminée selon la méthode de l'indice de mousse qui a donné une valeur inférieure à 100, ceci implique que la plante est pauvre en saponine.

### 3.2.7. Interprétation des résultats obtenus par HPLC

Lors de cette analyse nous avons obtenu les résultats suivant :

#### 3.2.7.1. Identification des flavones-flavonols

Le passage à l'HPLC de l'extrait du végétal qui contient des aglycones flavoniques se fait à une longueur d'onde de 365 nm en mode gradient de dilution. Le chromatogramme des aglycones flavoniques est représenté par la figure 3.15.

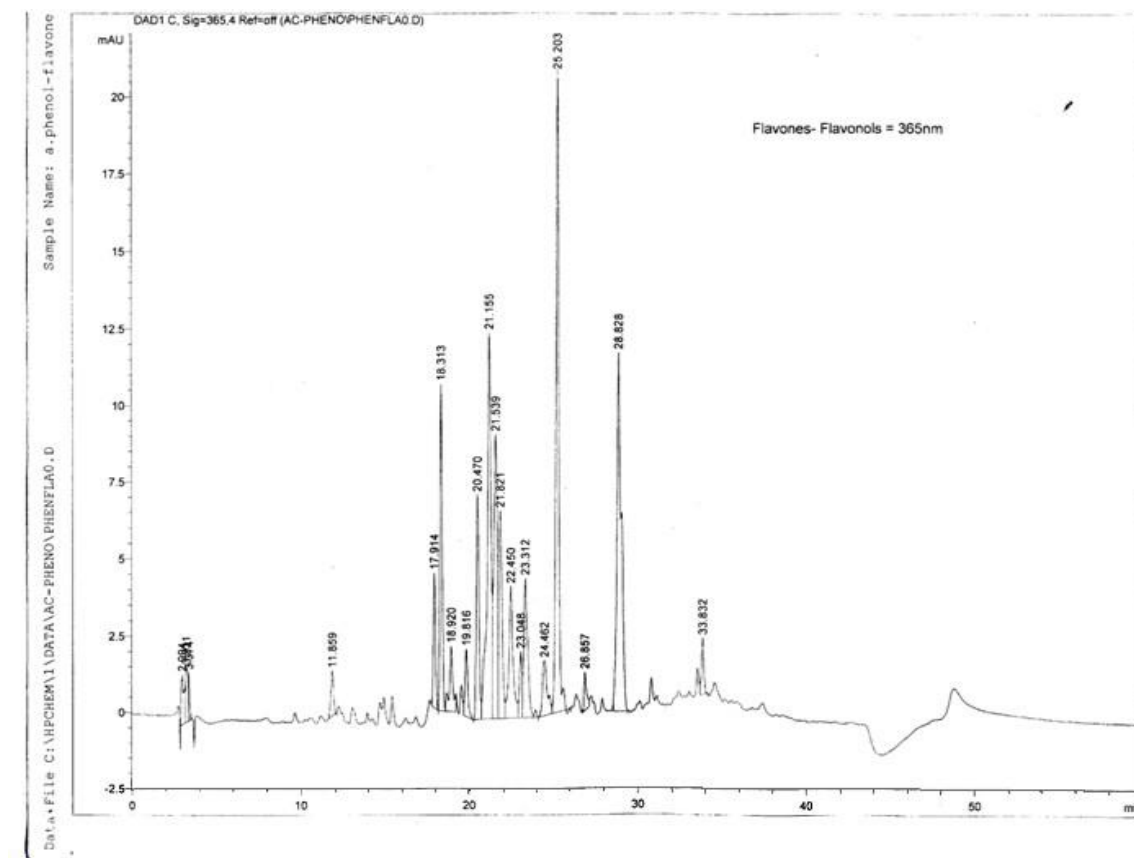


Figure 3.15 : Profil chromatographique des flavones–flavonols à 365 nm en mode gradient d’élu

Dans cette partie expérimentale, en absence de standards, nous avons eu recours à une comparaison des temps de rétention avec ceux de la bibliographie. Le profil chromatographique obtenu par HPLC à une longueur d’onde de 365 nm montre une richesse en flavones-flavonols. Cette richesse s’explique par la présence de 20 pics. La distribution de la teneur en flavones–flavonols est caractérisée par la présence de deux pics majoritaires non identifiés à 25,203 min et 28,83 min. L’identification des autres composés a été réalisée par la comparaison entre les temps de rétention de la plante avec ceux obtenus par les travaux de OUAFI, (2007).

Les caractéristiques des composés identifiés sont regroupées dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Caractéristiques chromatographiques des flavones-flavonols  
détectés chez *Ajuga iva* L. A 365nm

Pics	Temps de Rétention(min)	Teneurs Relatives(%)	Composés
07	18,313	06,660	Quercétine
11	21,155	13,475	Lutéoline
18	25,203	16,678	Non identifié
20	28,828	14,643	Non identifié

Parmi les composés identifiés figurent la quercétine et la lutéoline.

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes ont des propriétés anti-inflammatoires, notamment les flavonols tel que la quercétine. Ces composés calment la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire de manière spécifique. Ils inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est un déclencheur chimique de l'inflammation Lahlah et *al.*, 2008. Selon ZHAO et *al.*, (2006) ; TSAI et *al.*, (2008), la quercétine est un flavonoïde majeur. Cette dernière est responsable de l'activité antioxydante de la majorité des plantes. Certains auteurs suggèrent qu'elle pourrait présenter un intérêt dans le traitement des désordres allergiques [173, [175] ; [175].

D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes et plus particulièrement celle de la lutéoline. Cette dernière a une action inhibitrice sur la cyclo-oxygénase, enzyme synthétisée dans le processus inflammatoire [175]. Selon CHEN et *al.*, (2008), la lutéoline inhibe la dégénérescence des neurones qui entraîne la maladie de Parkinson.

#### 3.2.7.2. Identification des acides phénols :

Les acides phénols sont été identifiés à une longueur d'onde de 260 nm. Le profil chromatographique suivant (Fig. 3.16) a été observé.



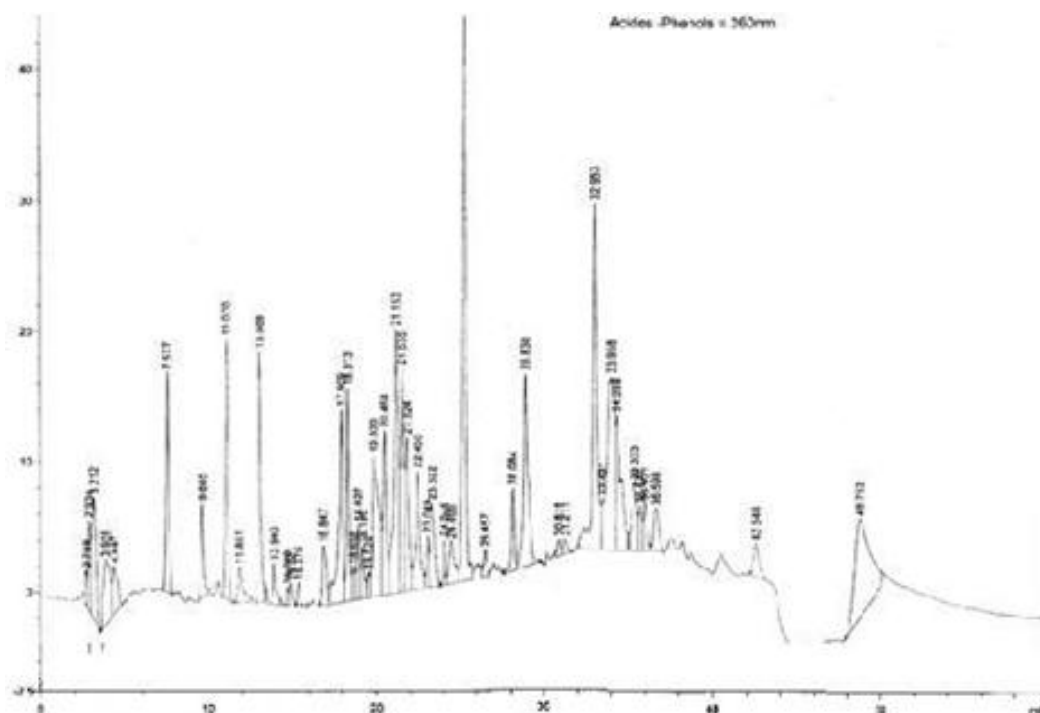


Figure 3.16 : Profil chromatographique des acides phénols présent chez *Ajuga* *iva* L. détectés par HPLC à 260 nm en mode gradient d'élution

Le chromatogramme relatif aux acides phénols est plus riche en composés que celui relatif aux flavones- flavonols et cette richesse est visualisée par la présence de 48 pics.

Ce profil indique la présence d'un composé majoritaire avec un temps de rétention de 25,303 min ; par ailleurs, 8 pics ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux obtenu par OUAFI (2007).

Les acides phénols identifiés sont : l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide gentisique, l'acide ellagique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque qui appartient à la série benzoïque, ainsi que l'acide *p*-cinnamique, l'acide férulique et syringique qui appartient à la série cinnamique.

Les caractéristiques des composés identifiés sont regroupées dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7 : Caractéristiques chromatographiques des acides phénols détectés chez *Ajugaiva L.*

Pics	Temps de Rétention (min)	Teneurs relatives (%)	Composés
04	3,312	2,362	Acide gallique
17	17,909	3,725	Acide protocatéchique
23	19,839	4,754	Acide gentisique
24	20,468	2,702	Acide ellagique
25	21,153	5,159	Acide p-hydroxybenzoïque
33	25,203	7,944	Non identifié
36	28,830	4,246	Non identifié
39	32,953	6,431	Acide syringique
43	35,33	1,694	Acide p-coumarique
48	42,544	7,378	Acide férulique

Nous constatons que la teneur en acides phénols de la série benzoïque est de 25,16 %, avec l'acide syringique comme composé majoritaire. Au contraire, la teneur en acides phénols de la série cinnamique atteint 9,07 %, avec l'acide férulique comme composé majoritaire. Ces pics ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux obtenu par HOSSAIN et *al.*, (2010).

Ces acides phénols (cinnamique et benzoïque) manifestent plusieurs activités à savoir : antibactériennes [65]; antifongiques [66] et antioxydantes [67].

Des études ont souligné qu'une consommation importante d'antioxydants phénoliques pouvait être corrélée avec une baisse significative des décès par artériosclérose, grâce à une diminution de l'oxydation des LDL [179] ; [180].

D'autres études ont démontré que l'acide férulique présente un large éventail d'effets thérapeutiques. Ainsi, par l'intermédiaire du puissant pouvoir antioxydant qu'il possède, l'acide férulique peut être utilisé contre diverses maladies, y compris le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives [182].

### 3.2.7.3. Identification des hétérosides flavoniques :

L'identification des hétérosides flavoniques est réalisée à une longueur d'onde de 370 nm, le profil chromatographique est représenté par la figure 3.17.

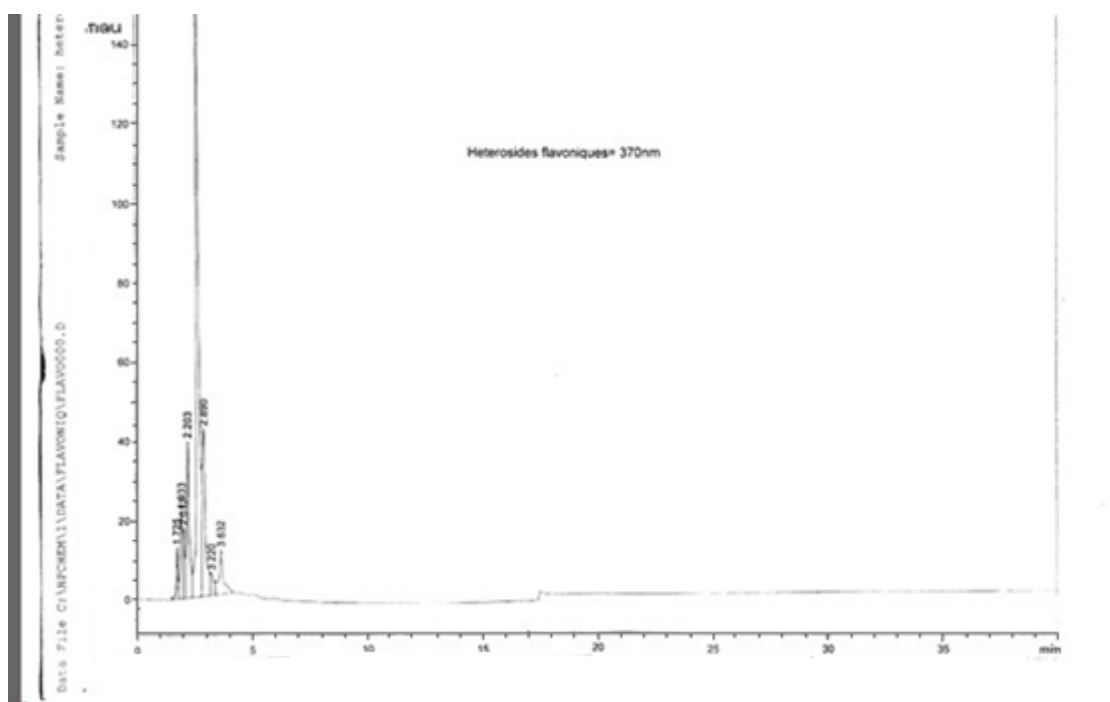


Figure 3.17 : Profil chromatographique des hétérosides flavoniques par HPLC à 370 nm en mode gradient d'élution

A cause de la mauvaise séparation des composés flavoniques au niveau de ce profil, le chromatogramme révèle la présence de huit pics, parmi lesquels un composé majoritaire non identifié, qui se distingue par un temps de rétention comparé avec ceux de Seeram et al., (2006). (Tableau 3.8).

Tableau 3.8 : Caractéristiques chromatographiques des hétérosides flavoniques

Pics	Temps de rétention (min)	Teneurs relatives (%)	Composés
05	2,612	51,071	Non identifiés
06	2,890	16,674	Monoglycoside-7 Lutéoline

L'interprétation du tableau 3.8 nous a permis l'identification d'un hétéroside flavonique : le monoglycoside-7 lutéoline avec une teneur de 16,67 %.

#### 3.2.7.4. Identification des C-Glycosides

L'identification des c-glycosides a été réalisée à une longueur d'onde de 360 nm, le profil chromatographique est représenté dans la figure 3.18.

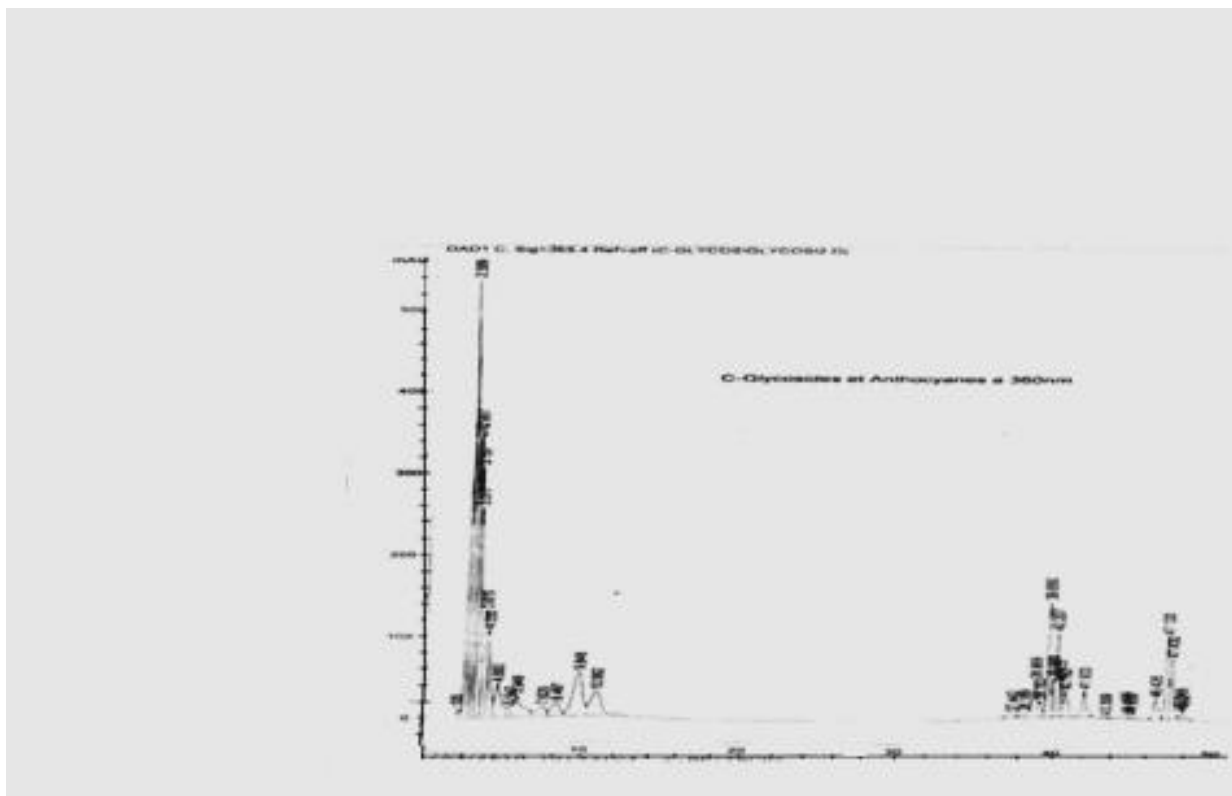


Figure 3.18 : Profil chromatographique des C-Glycosides détecté par HPLC à 360 nm en mode gradient d'élution

Le profil chromatographique fait ressortir un pic majoritaire au temps de rétention 2,589 min, il correspond à un composé flavonique non identifié. L'identification d'un autre pica été établie par comparaison de son temps de rétention avec celui observé par HOSSAIN et *al.*, (2010).

Les caractéristiques de ces composés sont regroupées dans le tableau 3.

Tableau 3.9 : Caractéristiques chromatographique des C-Glycosides

Pics	Temps de rétention (min)	Teneur relatives (%)	Composés
03	2,589	1,095	C-Glycoside de Quercétine (pentoside)
11	5,949	0,219	Non identifié

3.2.7.5. Identification des Anthocyanes

L'identification des anthocyanes a été réalisée à une longueur d'onde de 260 nm, le profil chromatographique est représenté dans la figure 3.19.

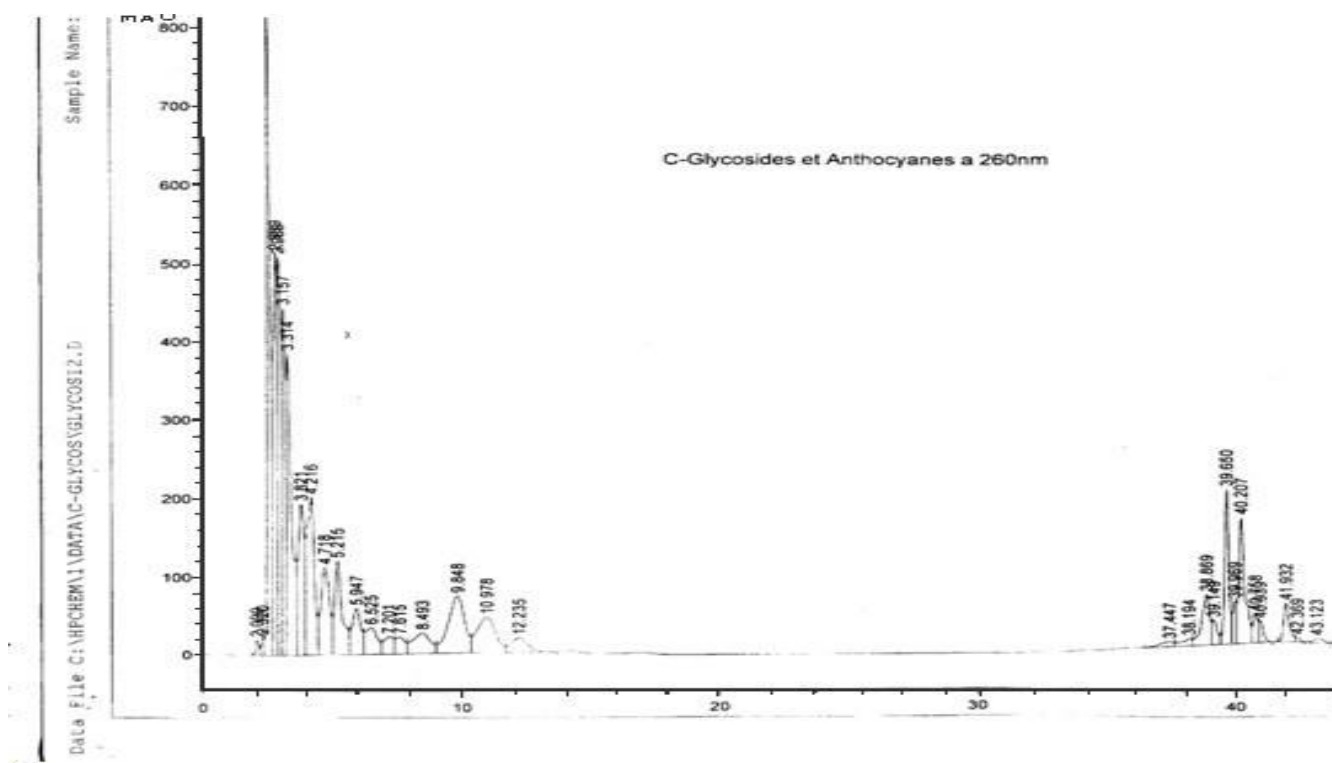


Figure 3.19 : Profil chromatographique des anthocyanes présents chez *Ajuga iva* L., détectés par HPLC à 260 nm en mode gradient d'élution

Nous avons obtenu un seul pic majoritaire. Il correspond à un composé flavonique non identifié. Il est obtenu à un temps de rétention de 2,585 min. Un deuxième composé est identifié après comparaison avec les temps de rétention obtenu par OUAFI, (2007) ; les caractéristiques sont regroupées dans le tableau 3.10.

Tableau 3.10 : Caractéristiques chromatographiques des anthocyanes détectés

Pics	Temps de rétention (min)	Teneur relative (%)	Composé
03	2,585	1,095	Non identifié
17	9,848	0,503	Cyanidine

A partir de ces résultats, nous avons pu confirmer la présence d'anthocyanes, notamment la cyanidine. Les anthocyanes sont caractérisés par leurs propriétés antioxydantes. Leur consommation est bénéfique pour la santé

et notamment contre le vieillissement cellulaire, la protection des veines et des capillaires. Ce sont des anti-inflammatoires puissants [86].

### 3.3. Résultat de l'étude biologique

#### 3.3.1. Activité antimicrobienne

##### 3.3.1.1. Mise en évidence de la zone d'inhibition

L'étude qualitative de l'activité anti microbienne au moyen de la méthode de diffusion sur gélose en utilisant des disques absorbants, a donné les résultats représentés dans le tableau 3.11 :

Cette activité est donnée par le diamètre en mm, de la zone d'inhibition des cultures microbiennes (appendice F).

Tableau 3.11: Résultat de l'activité microbiologique des extraits de plante, diamètre de la zone d'inhibition (mm)

Bactéries	Ext. méthanol.	Ethanol	Décocté	Infusé	ATB1	ATB2
<i>M.luteus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	42,33±0,33	29,33±0,67
<i>S.aureus</i>	0,00	0,00	0,00	9,83±0,17	59,33±0,67	36,00±1,00
<i>B.cereus</i>	0,00	0,00	6,50±0,00	0,00	18,00±0,00	22,00±0,00
<i>E.coli</i>	0,00	0,00	6,50±0,00	10,17±0,17	33,33±2,40	30,00±0,00
<i>E.feacalis</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>P.aerogenosa</i>	0,00	0,00	8,50±0,29	0,00	7,67±0,33	23,67±0,67
<i>B.subtilus</i>	0,00	0,00	0,00	9,17±0,17	47,67±0,33	31,67±1,67
<i>C.albicans</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Selon l'échelle de LECLERC, (1975), on peut dire que *E. coli* et *Pseudomonas aerogenosa* et bacillus cereus sont peu sensibles au décocté de

la plante, alors que les autres souches lui sont résistantes. Les souches *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Bacillus subtilis* sont présentés une faible sensibilité vis-à-vis de l'infusé de la plante (Appendice F). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les concentrations utilisées lors de l'essai sont faibles car, selon JASSIM et NADJI., (2003) ; TAKAHASHI et al., (2004) ; YADAVA et TIWARI, (2005), les flavonoïdes glycosides ont un effet antibactérien certain

### 3.3.3. Activité antioxydante

#### 3.3.3.1. Résultat de l'activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique est exprimée en EC 50%. Ce paramètre a été introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs et a été ensuite utilisé par plusieurs chercheurs pour présenter leurs résultats. Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de radicaux libres.

#### 3.3.3.2. Analyse statistique

##### 3.3.3.2.1. Activité antioxydante au DPPH de l'extrait méthanolique d'Ajuga iva

La courbe polynomiale de la figure 3.20 d'équation  $y = -0,733x^3 + 1,021x^2 + 0,386x + 0,006$  a un coefficient de détermination  $r^2=0,998$ . Cette courbe représente en ordonnée le pourcentage d'inhibition des radicaux libres en fonction de la concentration, en abscisse, de l'extrait méthanolique de la plante. La valeur correspondant au pourcentage d'inhibition à 50% est  $c = 0,667 \text{ mg.ml}^{-1}$ .

Cette valeur est pratiquement égale à celle trouvée par régression linéaire avec un coefficient de corrélation  $r=1,000$  ; pratiquement idéal (appendice G1) et qui signifie une excellente corrélation linéaire positive. Cette corrélation est significative ( $p=0,020$ ).

La valeur prévue du pourcentage d'inhibition à 50% est  $c = 0,665 \pm 0,091 \text{ mg.ml}^{-1}$



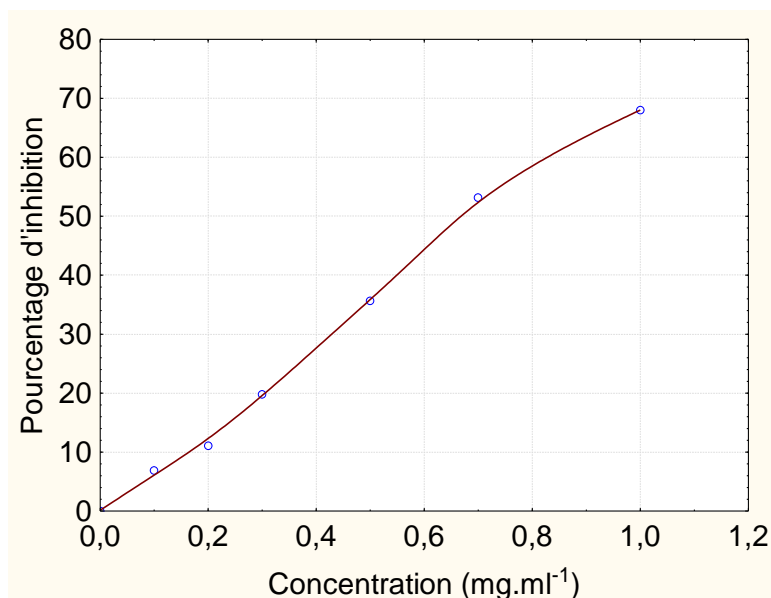


Figure 3.20 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique

### 3.3.3.3. Activité antioxydante au DPPH de l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E)

Nous avons une régression (Figure 3.21) avec un coefficient de corrélation  $r=1,000$ , donc une excellente corrélation linéaire positive, très significative  $p=0,004$ . La valeur prévue est  $c = 0,223 \pm 0,013 \text{ mg.ml}^{-1}$  (appendice G2)

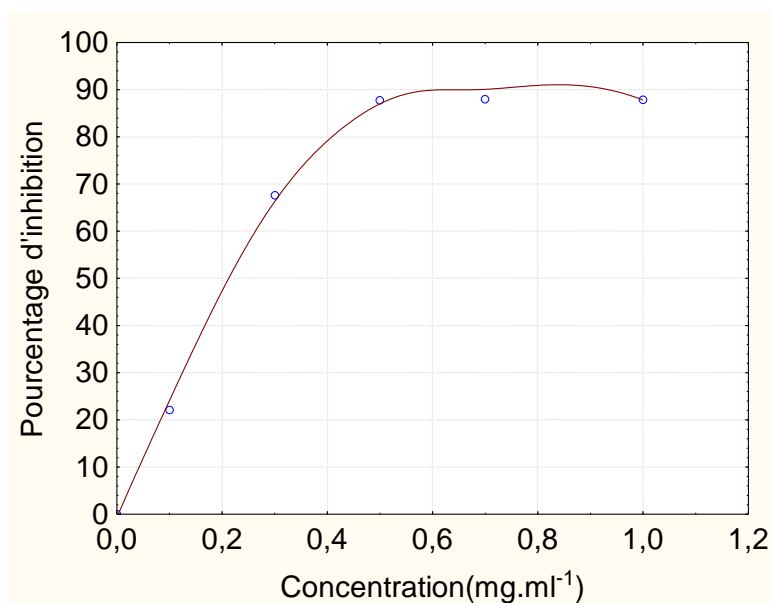


Figure 3.21: Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration  $\alpha$ -tocophérol

### 3.3.3.4. Activité antioxydante au DPPH de l'acide ascorbique

La régression (Figure 3.22) donne un coefficient de corrélation  $r=0,999$ , donc une très forte corrélation linéaire positive, très significative  $p=0,022$ .

La valeur prévue est  $c = 0,0210 \pm 0,0060 \text{ mg.ml}^{-1}$  (appendice G3)

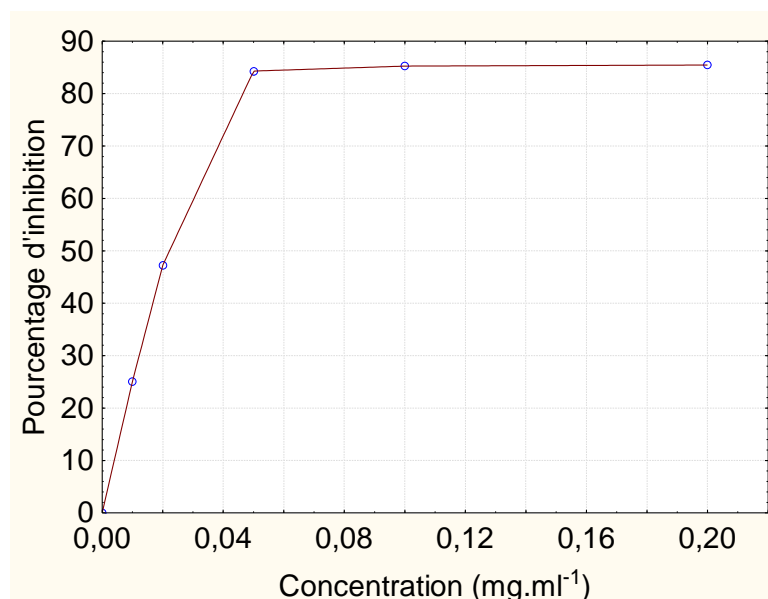


Figure 3.22 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en acide ascorbique

### 3.3.3.5. Activité antioxydante au DPPH de la rutine

La courbe polynomiale (Figure 3.23) d'équation  $y = 112,3x^3 - 20,45x^2 + 3,101x - 0,004$  avec un coefficient de détermination  $r^2=0,999$  nous permet de déduire la valeur correspondant au pourcentage d'inhibition à 50% :  $y=0,50=50,0\%$  ;  $c = 0,1727 \approx 0,173 \text{ mg.ml}^{-1}$ .

Cette valeur est pratiquement identique à celle obtenue par régression linéaire avec  $r=0,974$  signifiant une très forte corrélation linéaire positive, très significative ( $p=0,026$ ).

La valeur prévue est  $c = 0,173 \pm 0,066 \text{ mg.ml}^{-1}$  (appendice G4)

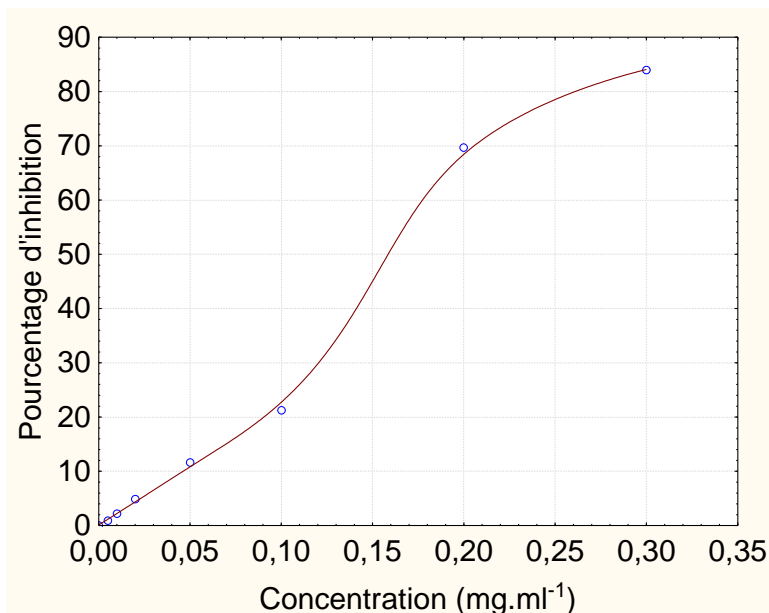


Figure 3.23 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en rutin

### 3.3.3.6. Activité antioxydante au DPPH de l'acide gallique

La régression (Figure 3.24) donne un coefficient de corrélation  $r=1,000$ , nous avons une excellente corrélation linéaire positive, très significative  $p=0,013$  (appendice G5). La valeur prévue est  $c = 0,0090 \pm 0,0015 \text{ mg.ml}^{-1}$

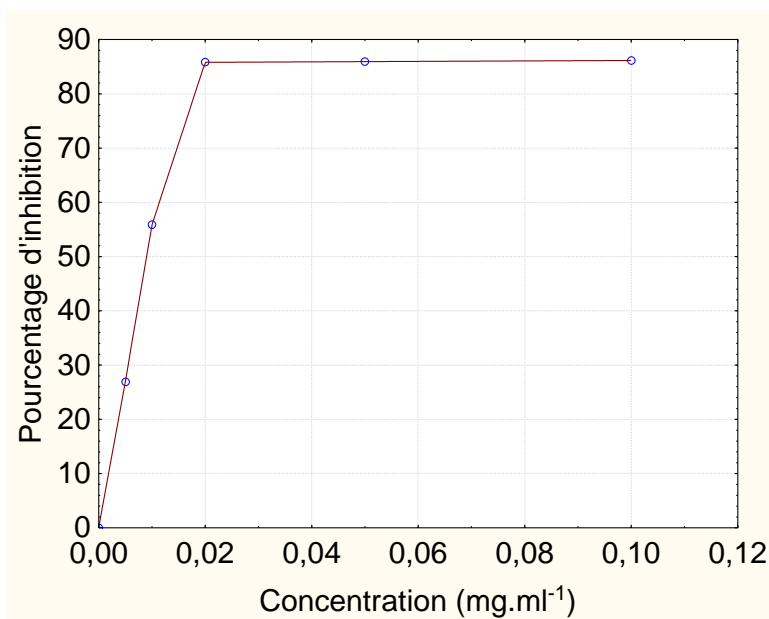


Figure 3.24 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en acide gallique

### 3.3.3.7. Activité antioxydante au DPPH de la quercétine

Nous avons une régression (Figure 3.25), avec  $r=0,999$ , donc une très forte corrélation linéaire positive, très significative  $p=0,024$  (appendiceG6).

La valeur prévue est  $c = 0,0107 \pm 0,0033 \text{ mg.ml}^{-1}$

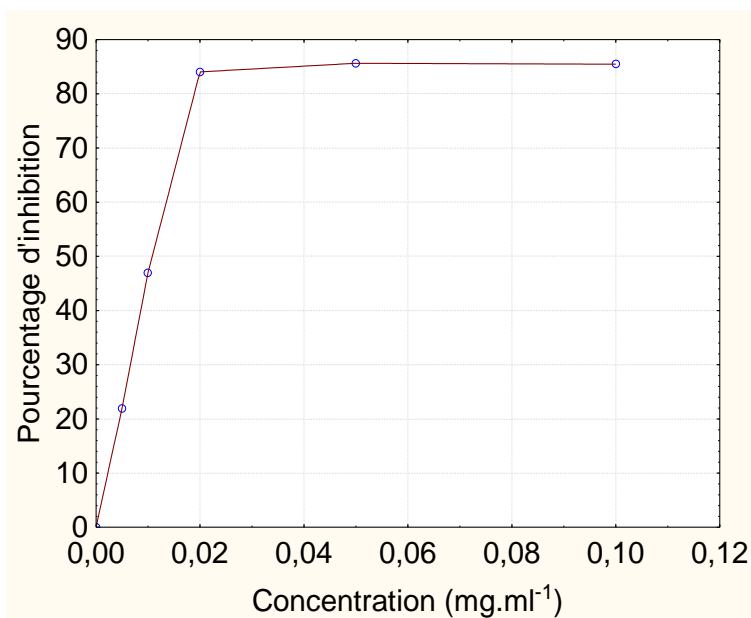


Figure 3.25 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en quercétine

### 3.3.3.8. Etude comparative des EC 50% des substances avec l'extrait méthanolique de la plante

Nous disposons maintenant des concentrations d'inhibition à 50% des différentes substances et des intervalles de confiance (donc des marges d'erreurs) correspondants selon le tableau suivant 3.12 (appendices G1 à G6).

Tableau 3.12 : les concentrations d'inhibition à 50%des différentes substances

	Concentration d'inhibition à 50% (mg.ml <sup>-1</sup> )	Intervalles de confiance à 95%
Acide Gallique	0,0090	{0,0075 ; 0,0105}
Quercétine	0,0107	{0,0074 ; 0,0140}
Acide Ascorbique	0,0210	{0,0149 ; 0,0270}
Rutine	0,173	{0,106 ; 0,239}
$\alpha$ -tocophérol	0,223	{0,210 ; 0,235}
Extrait Méthanolique	0,665	{0,574 ; 0,756}

Ces résultats sont illustrés dans la figure G7 (appendice G), qui montre le pourcentage d'inhibition des différents témoins en fonction de la concentration.

Nous avons comparé par ANOVA les concentrations d'inhibition à 50% de ces substances. Les échantillons de mesure étant petits, nous avons opté pour des erreurs standard maximales afin d'éviter toute interprétation trop optimiste.

La figure G8 (appendice G) regroupe les EC50% des diverses substances avec les marges d'erreur correspondantes.

Un test de Levène préliminaire (appendice G9) est établi pour vérifier l'homogénéité des variances. Il a donné  $p = 0,069 > 0,05$  ; les variances des six échantillons sont donc comparables.

L'ANOVA (appendice G10) met en évidence des différences très hautement significatives ( $F = 358,7$  ;  $p = 0,000000$ , même appendice). Un test post-hoc de Tukey (appendice G11) nous donne un déploiement des groupes ayant des concentrations d'inhibition à 50% comparables :

Groupe 1 (3 éléments) :Acide gallique, quercétine et acide ascorbique

Ces trois substances ont des concentrations d'inhibition à 50% comparables allant de 0,0090 à 0,0210 mg.ml<sup>-1</sup>.

Groupe 2 (2 éléments) : Rutine et  $\alpha$ -tocophérol

Ces deux substances ont des concentrations d'inhibition à 50% comparables mais significativement plus élevées que celles du groupe précédent, allant de 0,173 à 0,223 mg.ml<sup>-1</sup>.

Groupe 3 (1 seul élément) : Extrait méthanolique de *Ai*

Cette substance, qui est celle de notre étude, a une valeur significativement beaucoup plus élevée que celles de toutes les substances testées, avec une valeur égale à 0,665 mg.ml<sup>-1</sup>.

Tout ceci est parfaitement visualisé par le graphe déjà cité (annexe G8).

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant [145]; [187]; [188]. Quelques composés réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant [189]. L'activité antioxydante par ordre décroissant des extraits testés se présente comme suit : Acide gallique > Quercétine > Acide ascorbique > Rutine >  $\alpha$ -tocophérol > Extrait méthanolique.

### 3.3.4. Résultat de l'activité hypoglycémiant

#### 3.3.4.1. Analyse statistique

Nous avons 5 échantillons de 6 rats chacun (eau, Diabénil®, E1, E2 et E3) dont on mesure la glycémie à cinq temps (T<sub>0</sub> puis S<sub>0</sub> à S<sub>3</sub>).

Nous avons à T<sub>0</sub> les rats sains, puis vient le temps S<sub>0</sub> qui est celui du diabète correspondant à la glycémie provoquée. S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> correspondent respectivement à la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine après S<sub>0</sub>.

Notre étude a consisté en 3 étapes :

- Une comparaison par des tests de Student des glycémies des divers lots par rapport au témoin à S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub>.

- Une mise en évidence des pourcentages de réduction pour chaque lot dans le temps (de  $S_0$  à  $S_3$ ).
- Enfin, une comparaison des effets à la fin de l'expérimentation par rapport aux rats sains.

Nous constatons tout d'abord, grâce à un test ANOVA, que les glycémies initiales à  $T_0$  sont comparables et varient entre 1,03 et 1,10  $\text{g.l}^{-1}$  ( $F=0,419$  ;  $p=0,79 \gg 0,05$  ; tableau 3.13 ; appendice H1). Nous voyons ensuite qu'à  $S_0$  (même tableau, appendices H2 à H5), les glycémies moyennes des divers groupes sont comparables à celles du groupe témoin (eau). Les degrés de signification sont tous non significatifs : témoin-Diabénil® ( $p=0,071$ ), témoin- $E_1$  ( $p=0,085$ ), témoin- $E_2$  ( $p=0,127$ ) et témoin- $E_3$  ( $p=0,335$ ).

Tableau 3.13 : Tableaux des glycémies moyennes ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) des divers lots

	T <sub>0</sub>	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>		S <sub>2</sub>		S <sub>3</sub>	
	Glycémie (g.l <sup>-1</sup> )	Glycémie (g.l <sup>-1</sup> )	Glycémie (g.l <sup>-1</sup> )	% de réduction	Glycémie (g.l <sup>-1</sup> )	% de réduction	Glycémie (g.l <sup>-1</sup> )	% de réduction
Eau	1,07±0,05	2,58±0,03	2,37±0,02	8,20±2,17	2,22±0,01	14,20±1,81	1,80±0,04	30,15±3,24
Diabénil	1,10±0,04	2,78±0,09	2,54±0,10	8,52±6,75	2,22±0,07	20,28±6,12	1,45±0,02 <sup>***</sup>	47,81±5,42
E <sub>1</sub>	1,07±0,04	2,78±0,09	2,39±0,10	14,01±7,56	1,89±0,01 <sup>***</sup>	32,04±4,75	1,79±0,03	35,87±5,62
E <sub>2</sub>	1,03±0,02	2,76±0,09	2,51±0,13	8,77±8,48	1,74±0,06 <sup>***</sup>	36,72±6,67	1,57±0,04 <sup>**</sup>	43,19±6,12
E <sub>3</sub>	1,04±0,05	2,70±0,10	2,28±0,11	15,52±8,65	1,44±0,10 <sup>***</sup>	46,63±9,44	1,00±0,03 <sup>***</sup>	62,96±7,30

n=6 pour chaque groupe ; les étoiles en exposant (\*) dénotent une différence significative par rapport au témoin eau (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001)



Pour la 1<sup>ère</sup> semaine, les glycémies moyennes de tous les groupes restent comparables à celles du groupe témoin ; avec des valeurs comprises entre 2,28 et 2,54 g.l<sup>-1</sup>. Nous avons témoin-Diabénil® (p=0,134), témoin-E<sub>1</sub> (p=0,835), témoin-E<sub>2</sub> (p=0,332) et témoin-E<sub>3</sub> (p=0,454) (appendices H2 à H5).

Pour la 2<sup>ème</sup> semaine, la glycémie moyenne du groupe «Diabénil® » est comparable à celle du témoin (p=1,00 ; appendice H2) mais nous constatons une baisse de la glycémie avec des différences hautement significatives (p<0,001) entre les glycémies moyennes du témoin (glycémie 2,22±0,01 g.l<sup>-1</sup>) et des groupes :

- E<sub>1</sub> (p=0,0000, appendice H3), glycémie 1,89±0,01 g.l<sup>-1</sup>
- E<sub>2</sub> (p=0,00030, appendice H4), glycémie 1,74±0,06 g.l<sup>-1</sup>
- E<sub>3</sub> (p=0,00059, appendice H5), glycémie 1,47±0,10 g.l<sup>-1</sup>

Pour la 3<sup>ème</sup> semaine, la glycémie moyenne du groupe E<sub>1</sub> est comparable à celle du témoin (p=0,738 ; appendice H3) ; mais là aussi, nous constatons une baisse de la glycémie avec des différences très (à hautement) significatives entre les glycémies moyennes du témoin (glycémie 1,80±0,04 g.l<sup>-1</sup>) et des groupes :

:

- Diabénil® (p=0,000037, appendice H2), glycémie 1,45±0,02 g.l<sup>-1</sup>
- E<sub>2</sub> (0,0018, appendice H4), glycémie 1,57±0,04 g.l<sup>-1</sup>
- E<sub>3</sub> (p=0,00000, appendice H5), glycémie 1,00±0,03 g.l<sup>-1</sup>

La figure 3.26 montre l'évolution des pourcentages de réduction pour les divers lots (eau, Diabénil, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> et E<sub>3</sub>) dans le temps (de la 1<sup>ère</sup> à la 3<sup>ème</sup> semaine).

### Pourcentage de réduction de la glycémie

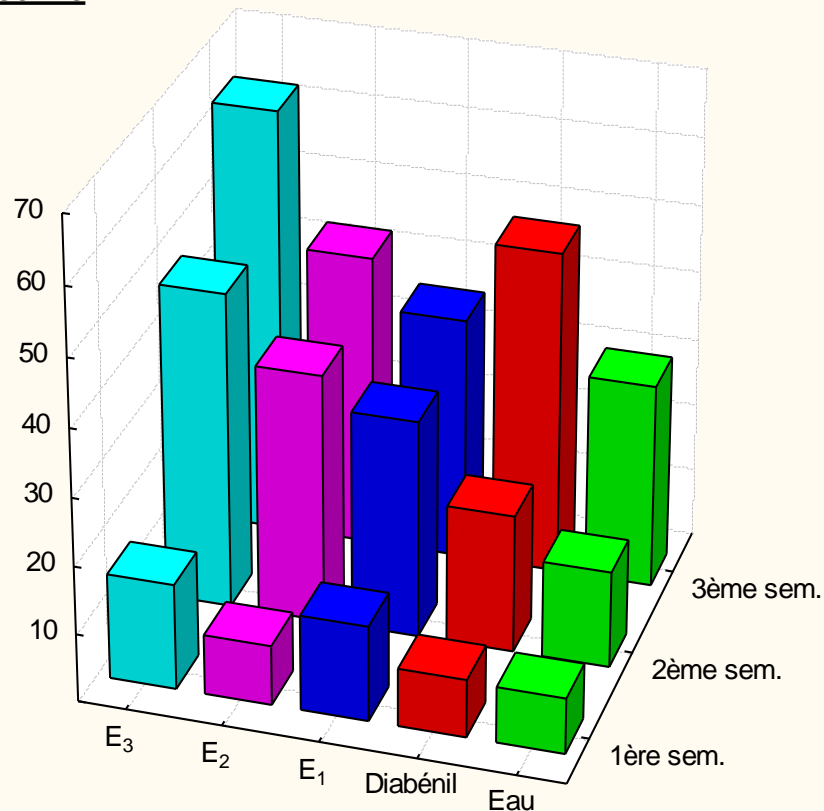


Figure 3.26 : Evolution du pourcentage de réduction de la glycémie des divers lots en fonction du temps

Un autre résultat digne d'intérêt apparaît lorsque nous comparons la glycémie à la fin de l'expérimentation ( $S_3$ ) à ce qu'elle était chez les rats sains ( $T_0$ , donc avant  $S_0$ ). Un test de Student (appendice H6) montre que malgré les diminutions significatives de  $S_0$  à  $S_3$ , dues au Diabénil® et aux concentrations faibles ( $E_1$ ) et moyenne ( $E_2$ ) de l'extrait, la glycémie finale reste significativement élevée par rapport à celle relevée à  $T_0$ . Seul l'extrait fort ( $E_3$ ) fait retomber celle-ci à un niveau comparable à celui des rats sains.

En effet, entre le temps initial ( $T_0$ ) et final ( $S_3$ ), les différences restent significatives pour :

- Le témoin (eau) ( $p=0,00000$ ), glycémie  $1,80 \text{ g.l}^{-1}$  contre  $1,07 \text{ g.l}^{-1}$
- Le Diabénil® ( $p=0,00004$ ), glycémie  $1,45 \text{ g.l}^{-1}$  contre  $1,10 \text{ g.l}^{-1}$

- E<sub>1</sub> (p=0,00000), glycémie 1,79 g.l<sup>-1</sup> contre 1,07 g.l<sup>-1</sup>
- E<sub>2</sub> (p=0,00000), glycémie 1,57 g.l<sup>-1</sup> contre 1,03 g.l<sup>-1</sup>

Seul l'extrait aqueux de la plante à forte concentration (E<sub>3</sub>) s'est avéré parfaitement efficace et a ramené la glycémie à une valeur comparable à celle du début de l'expérimentation (à T<sub>0</sub>); nous avons une glycémie de 1,00 g.l<sup>-1</sup> à S<sub>3</sub> contre 1,04 g.l<sup>-1</sup> à T<sub>0</sub> (p=0,5026>0,05 ; appendice H6).

L'effet hypoglycémiant de ce dernier dépasse celui du Diabénil® à la 3<sup>ème</sup> semaine du traitement avec un pourcentage de réduction de 62,96±7,30 contre seulement 47,81±5,42% pour le Diabénil®

A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'identifier le mécanisme exact de l'effet hypoglycémiant ; néanmoins, *Ajuga iva* L. n'a aucun effet sur la concentration de l'insuline plasmatique [190].

Des études sur l'effet hypoglycémiant d'autres espèces de la même famille ont démontré que cet effet est dû à un mécanisme extrapancréatique, à savoir sur une sensibilisation des tissus périphériques quant à l'utilisation du glucose [191] ; [192]; [193]. L'analyse phytochimique de la plante a révélé la présence de flavonoïdes qui pourraient être responsables de l'effet hypoglycémiant d'*Ajuga iva* [194]. Des recherches récentes ont démontré que les hétérosides flavoniques en sont responsables [195].

### 3.3.5. Activité antalgique

#### 3.3.5.1. Analyse statistique

Nous avons établi les statistiques descriptives du nombre de spasmes par souris, du pourcentage de réduction des spasmes (ou de protection) et du calcul d'erreurs correspondant (méthode appendice I).

$$\% \text{ de protection} = \frac{\text{Moy. des spasmes du lô t tém.} - \text{Moy. des spasmes du lô t essai}}{\text{Moy. des spasmes du lô t témoin}} \times 100$$

Les résultats concernant le nombre de spasmes et le pourcentage de protection après administration de l'eau physiologique et les différentes doses de l'extrait aqueux sont reportés dans le tableau 3.14 suivant (appendice I1 et figure I2)

Tableau3.14 : Comparaison des nombre de spasmes moyens ( $\bar{x} \pm SEM$ ) et pourcentages de protection

Lot	Nombre de spasmes moyen	Pourcentage de protection
Témoin	35,60±0,51 <sup>a</sup>	0,00
Contrôle+	8,00±0,45 <sup>b,c</sup>	77,53±3,80
Lot 1	10,00±0,71 <sup>c</sup>	71,91±4,45
Lot 2	8,60±0,40 <sup>b,c</sup>	75,84±3,64
Lot 3	7,20±0,73 <sup>b,d</sup>	79,78±4,64
Lot 4	5,20±0,58 <sup>d</sup>	85,39±4,29
Lot 5	1,20±0,80 <sup>e</sup>	96,63±5,06

n=5 pour chaque groupe

Les groupes avec des lettres identiques en exposant sont comparables.

Après injection de l'acide acétique au lot témoin de souris, on enregistre une moyenne de 35,6±0,51 crampes abdominales après 10 min. Après administration des différentes doses (0,025; 0,050; 0,130; 0,200 et 0,400 g/ml) de l'extrait aqueux de *Ajuga iva* L., le nombre de crampes abdominales diminue en passant de 10,00 à 1,20 spasmes en passant par les valeurs 8,60 ; 7,20 et 5,20. Le pourcentage d'inhibition des contractions, quant à lui, augmente de 71,91 % à 96,63 %.

Un test de Levene ayant montré des variances comparables pour les 7 lots (appendice I3 ;  $p=0,44 >> 0,05$ ), nous avons comparé par ANOVA les nombres moyen de spasmes de ces 7 lots et trouvé  $F=338,0$  et  $p=0,00000$  (appendice I4) ce qui dénote une différence très hautement significative.

Le test de Tukey HSD (appendice I5) montre que c'est dans le lot témoin qu'on retrouve le nombre de spasmes moyen significativement le plus élevé ( $35,60 \pm 0,51$ ) ; viennent ensuite lots contrôle+, 1 et 2 qui sont comparables (moyennes entre 10,00 et 8,00); puis les lots 3 et 4 qui sont comparables aussi (moyennes entre 7,20 et 5,20) ; enfin le lot 5 avec le nombre de spasmes moyen significativement le plus bas ( $1,20 \pm 0,80$ ).

Ces résultats indiquent qu'*Ajuga iva* L. a un effet analgésique plus efficace que celui de l'ibuprofène (lot contrôle+). En effet l'ibuprofène provoque une inhibition de la douleur de  $77,53 \pm 3,80$  % et celui de l'extrait aqueux de *Ajuga iva* L., est  $85,39 \pm 4,29$  % pour la même concentration (200 mg/kg, voir tableau 3.14). L'extrait aqueux d'*Ajuga iva* contient des flavonoïdes et des saponines qui sont des inhibiteurs des prostaglandines et des phénomènes inflammatoires. [198].

Deraedt et al., 1980 ont mis en évidence des proportions élevées de prostaglandines PGE $2\alpha$  et PGE $\alpha$  dans les exsudats péritonéaux des rats après l'injection de l'acide acétique. Durate et al. 1988 ; Hokanson et al., 1978 et Neo et al., 2005 ont observé dans les mêmes conditions, la libération des médiateurs du système nerveux sympathique.

### 3.3.6. Etude de la toxicité

Aucune mortalité ni signe de toxicité n'ont été observés suite à l'administration de l'extrait aqueux à une dose unique (14g/kg) d'*Ajuga iva* L. par voie orale. Selon El Hilaly et al., 2006, une seule prise d'un extrait aqueux d'*Ajuga iva* L. par voie orale, à des doses de 2 à 14 g/kg n'ont montré aucun changement des paramètres biochimiques tels que les transaminases (ALT, AST) et la créatinine. Ces paramètres sont de bons indicateurs des fonctions du foie et des reins. Nous pouvons donc dire qu'éventuellement, l'extrait aqueux n'a provoqué aucun dommage au niveau du foie et au niveau des reins.

Après injection par voie intrapéritonéale à une dose unique de 3,60 g/kg, un changement de comportement a été observé chez les souris et qui se résume comme suit :

- une hypoactivité et salivation sont observées immédiatement après l'injection

- elles sont suivies d'une anorexie et une perte de poids chez les souris
- ces changements de comportement persistent jusqu'à leur décès.

La DL50 est de 3,60 g/kg ; nos résultats concordent avec ceux de ALEEXEFF et *al.*,(2002 ) ; EL HILALY et *al.*,(2004). Ce taux de décès pourrait s'expliquer par une faible absorption de l'extrait aqueux de la plante par voie intrapéritonéale.

En conclusion à l'étude de la toxicité et en se référant à l'échelle de HODGE et STERNER, nous pouvons dire que la plante est légèrement toxique.

## CONCLUSION

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances naturelles biologiquement actives. La présente étude a eu pour objectif de déterminer la composition chimique d'*Ajuga iva L.* et d'en connaître le ou les principes actifs lui conférant des propriétés thérapeutiques.

L'HPLC a permis l'identifier de la composition chimique de la plante, à savoir les acides phénoliques, les flavones et flavonols, les hétérosides flavoniques ainsi que les anthocyanes.

Nous avons pu connaître aussi, grâce à l'utilisation de la chromatographie ionique, la composition en éléments minéraux tels que le sodium, calcium et magnésium ainsi que les ions chlorures et fluorures.

Le screening phytochimique a révélé la présence de flavonoïdes, de tanins et d'une faible concentration en saponines. Certains composés actifs ont été extraits séparément et ceci nous a permis d'en déduire leurs teneurs qui sont de  $33,12 \pm 0,37$  mg/EAG en polyphénols et 3.05 % en flavonoïdes/g d'extrait de plante sèche.

L'effet antimicrobien d'*Ajuga iva L.*, se révèle faible ou inexistant sur la totalité des souches testées.

L'étude biologique de la plante a montré un effet hypoglycémiant et antalgique remarquable qui dépasse celui des médicaments prescrits tels que le Diabénil, mais une étude plus approfondie sur un long terme reste envisageable pour confirmer les résultats.

La détermination de la DL50 (3,60 mg/kg) a été confirmée. Ainsi, *Ajuga iva L.*, est légèrement toxique.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, la plante a montré une faible activité in vitro par rapport aux standards utilisés.

En perspective, l'isolement des molécules bioactives responsables des effets thérapeutiques est nécessaire par l'utilisation de techniques plus performantes. Ces dernières s'articulent autour de l'HPLC/MS et la RMN qui restent indispensables, afin de déterminer la structure moléculaire des principes actifs pour mieux comprendre leur mode d'action.

Une étude *in vivo* quant à l'activité antioxydante est envisageable pour démontrer l'action inhibitrice des radicaux libres impliqués dans un grand nombre de pathologies connues de nos jours et font l'objet de nombreuses recherches.

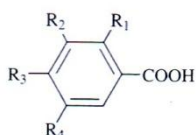
Une étude sur l'effet antibactérien est à envisager, avec l'utilisation de concentrations plus élevées afin de cerner la dose optimale d'inhibition.



## Appendice B

### Les acides phénoliques [79]

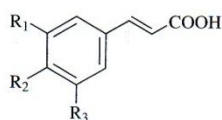
#### Acides hydroxybenzoïques



$R_1=R_2=R_3=R_4=H$   
 $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$   
 $R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$   
 $R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$   
 $R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$   
 $R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$   
 $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$   
 $R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$

acide benzoïque (non phénolique)  
 acide *p*-hydroxybenzoïque  
 acide protocatéchique  
 acide vanillique  
 acide gallique  
 acide syringique  
 acide salicylique  
 acide gentisique

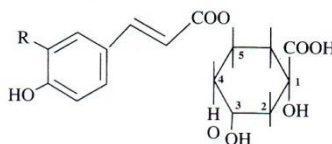
#### Acides hydroxycinnamiques (« phénylpropanoïdes »)



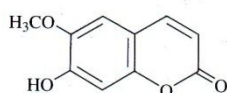
$R_1=R_2=R_3=H$   
 $R_1=R_3=H, R_2=OH$   
 $R_1=R_2=OH, R_3=H$   
 $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$   
 $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$

acide cinnamique (non phénolique)  
 acide *p*-coumarique  
 acide caféique  
 acide férulique  
 acide sinapique

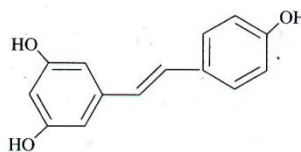
#### Principaux acides phénoliques



#### Acide chlorogénique (= 5-caféoylquinique)



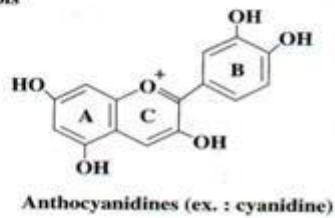
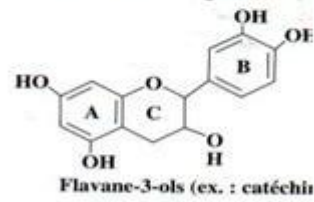
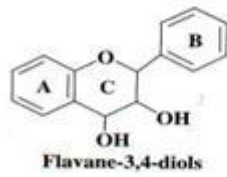
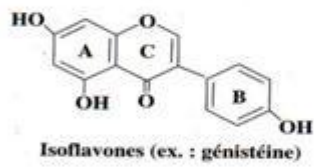
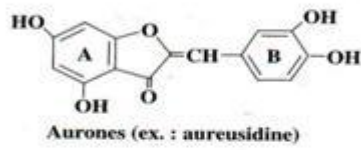
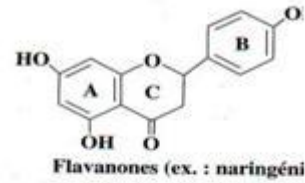
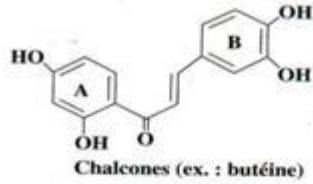
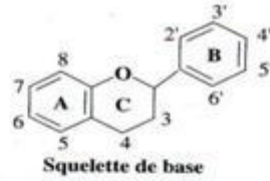
Un exemple de coumarine simple :  
la scopolétine



Un exemple de stilbène :  
le resvératrol

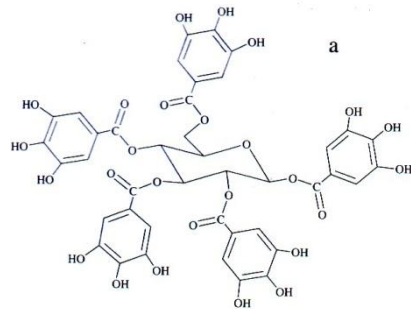
## Appendice C

### Les principales classes de flavonoïdes [79]

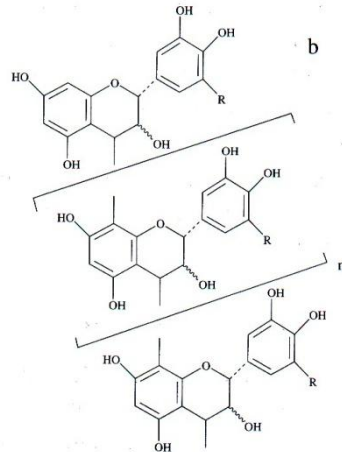


## Appendice D

### Les principaux groupes de tanins [79]

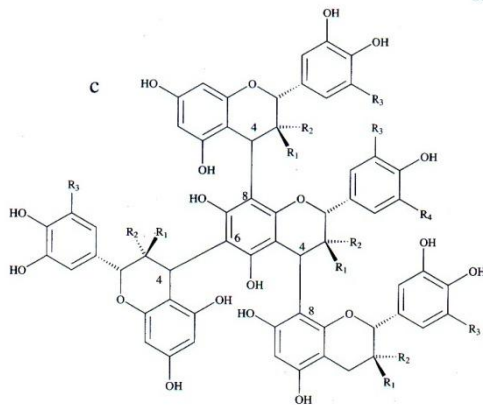


**Pentagalloylglucose** (l'une des structures de base des tanins hydrolysables)

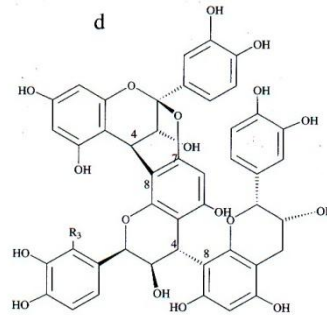


**Exemple de structure d'un tannin condensé**

R = H : unité procyanidine, dérivée de la catéchine  
 R = OH : unité prodelphinidine, dérivée de la gallocatéchine



**Exemple de structure d'un tétramère de type B**



**Exemple de structure d'un trimère de type A**

R<sub>1</sub>= H et R<sub>2</sub>=OH et R<sub>3</sub>=H : unité procyanidine, dérivée de l'épicatéchine  
 R<sub>1</sub>=OH et R<sub>2</sub>=H et R<sub>3</sub>=H : unité procyanidine, dérivée de la catéchine  
 R<sub>1</sub>= H et R<sub>2</sub>=OH et R<sub>3</sub>= OH : unité prodelphinidine, dérivée de l'épigallocatéchine  
 R<sub>1</sub>=OH et R<sub>2</sub>=H et R<sub>3</sub>=OH : unité prodelphinidine, dérivée de la gallocatéchine

## Appendice E

Définitions des paramètres statistiques utilisés :

**Moyenne d'un ensemble de valeurs :**

Considérons un échantillon de n mesures d'un paramètre donné  $(x_1, x_2, \dots, x_n)$ .

La moyenne est définie par :  $\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$

**Variance :**  $\sigma^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n}$

**Ecart type :** C'est la racine carrée de la variance

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i^2 - \bar{x}^2$$

**Ecart-type de la moyenne :** il est défini par  $\frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$

Une estimation de la variance d'une population à partir de laquelle a été tiré un échantillon

est donnée par  $s^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}$

Nous avons donc l'écart-type estimé :

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \text{ (SD, « standard deviation » en anglais)}$$

L'écart-type estimé de la moyenne (erreur standard moyenne) est donné par :

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} \text{ (« Standard error of mean » en anglais).}$$

### E1 : Teneur en eau d'Ajuga iva

	Poids frais (g)	Après 24 h	Après 48 h	Après 72 h	Teneur en eau (%)
1 <sup>er</sup> essai	1,07	0,39	0,38	0,38	64,49
2 <sup>ème</sup> essai	1,04	0,33	0,33	0,33	68,27
3 <sup>ème</sup> essai	1,06	0,39	0,38	0,38	64,15
4 <sup>ème</sup> essai	1,09	0,41	0,34	0,34	68,81
5 <sup>ème</sup> essai	1,06	0,34	0,34	0,34	67,92
$\bar{x}$	1,064	0,372	0,354	0,354	66,73
s	0,018	0,035	0,024	0,024	
$\frac{s}{\sqrt{n}}$	0,008	0,016	0,011	0,011	

### Poids frais et secs moyens

Variable	Descriptive Statistics			
	Valid N	Mean	Std.Dev.	Standard Error
Poids_frais	5	1,064000	0,018166	0,008124
Après_24h	5	0,372000	0,034928	0,015620
Après_48h	5	0,354000	0,024083	0,010770
Après_72h	5	0,354000	0,024083	0,010770

$$\text{Teneur en eau (X)} = \frac{(\text{Poids frais} - \text{Poids sec})}{\text{Poids frais}} \times 100 = \frac{(a - b)}{a} \times 100$$

Erreur sur le pourcentage :

$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{\Delta(a - b)}{(a - b)} + \frac{\Delta a}{a} = \frac{\Delta a + \Delta b}{(a - b)} + \frac{\Delta a}{a}$$

$$\Delta X = X * \left( \frac{\Delta a + \Delta b}{(a - b)} + \frac{\Delta a}{a} \right)$$

### Teneur en cendres d'Ajuga iva

	Masse de poudre (g)	Masse des cendres (g)	Teneur en cendres (%)
1 <sup>er</sup> essai	1,000	0,121	12,1
2 <sup>ème</sup> essai	1,000	0,131	13,1
3 <sup>ème</sup> essai	1,000	0,128	12,8
$\bar{x}$	1,0000	0,1267	12,67
s		0,00508	
$\frac{s}{\sqrt{n}}$		0,00293	

$$\% \text{ de cendres totales (X)} = \frac{\text{Masse des cendres}}{\text{Masse de poudre de la plante essai}} \times 100 = \frac{a}{b} \times 100$$

Erreur sur le pourcentage :

$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{\Delta(a-b)}{(a-b)} + \frac{\Delta a}{a} = \frac{\Delta a + \Delta b}{(a-b)} + \frac{\Delta a}{a}$$

$$\Delta X = X * \left( \frac{\Delta a + \Delta b}{(a-b)} + \frac{\Delta a}{a} \right)$$

Masses moyennes :

Variable	Descriptive Statistics			
	Valid N	Mean	Std.Dev.	Standard Error
Masse de poudre	3	1,000000		
Masse des cendres	3	0,126700	0,005076	0,002931

$$\% \text{ de cendres totales (X)} = \frac{\text{Masse des cendres}}{\text{Masse de poudre de la plante essai}} \times 100 = \frac{a}{b} \times 100$$

Erreur sur le pourcentage :

$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{\Delta a}{a} + \frac{\Delta b}{b}$$

- Gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification des flavones flavonols et les acides phénols.

Temps(min)	Solvant B %	Solvant %
0	5	95
30	70	30
40	70	30
44	5	95
A +44	5	95

- Gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification des C-glycosides et des hétérosides flavoniques.

Temps (min)	Solvant B%	Solvant A%
0	95	5
15	17	83
35	22	78
45	37	63
50	70	30
55	12	88
A+55	12	88

Gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification des anthocyanes

Temps (min)	Solvant B%	Solvant A%
0	50	50
15	40	60
25	30	70
35	60	40
45	70	30
à +50	70	30



## Appendice F

### Activité antimicrobienne

Diamètre de la zone d'inhibition pour les différentes souches testées

<i>Micrococcus luteus</i>						
	Extrait méthanolique	Ethanol	Décoction	Infusion	ATB 1	ATB 2
1 <sup>er</sup> essai	0	0	0	0	42	28
2 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	0	42	30
3 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	0	43	30

<i>Staphylococcus aureus</i>						
	Extrait méthanolique	Ethanol	Décoction	Infusion	ATB 1	ATB 2
1 <sup>er</sup> essai	0	0	0	9,5	60	
2 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	10	58	35
3 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	10	60	37

<i>Bacillus cereus</i>						
	Extrait méthanolique	Ethanol	Décoction	Infusion	ATB 1	ATB 2
1 <sup>er</sup> essai	0	0	6,5	0	18	22
2 <sup>eme</sup> essai	0	0	6,5	0	18	22
3 <sup>eme</sup> essai	0	0	6,5	0	18	22

<i>Escherichia coli</i>						
	Extrait méthanolique	Ethanol	Décoction	Infusion	ATB 1	ATB 2
1 <sup>er</sup> essai	0	0	6,5	10	38	30
2 <sup>eme</sup> essai	0	0	6,5	10,5	32	30
3 <sup>eme</sup> essai	0	0	6,5	10	30	30

<i>Enterococcus faecalis</i>						
	Extrait méthanolique	Ethanol	Décoction	Infusion	ATB 1	ATB 2
1 <sup>er</sup> essai	0	0	0	0	0	0
2 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	0	0	0
3 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	0	0	

<i>Pseudomonas aerogenosa</i>						
	Extrait méthanolique	Ethanol	Décoction	Infusion	ATB 1	ATB 2
1 <sup>er</sup> essai	0	0	9	0	8	25
2 <sup>eme</sup> essai	0	0	8	0	7	23
3 <sup>eme</sup> essai	0	0	8,5	0	8	23

<i>Bacillus subtilis</i>						
	Extrait méthanolique	Ethanol	Décoction	Infusion	ATB 1	ATB 2
1 <sup>er</sup> essai	0	0	0	9	47	30
2 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	9	48	35
3 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	9.5	48	30

<i>Candida albicans</i>						
	Extrait méthanolique	Ethanol	Décoction	Infusion	ATB 1	ATB 2
1 <sup>er</sup> essai	0	0	0	0	0	0
2 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	0	0	0
3 <sup>eme</sup> essai	0	0	0	0	0	0

## Appendice G

### Activité antioxydante

#### **Régressions linéaires pour déterminer les concentrations d'inhibition à 50% des diverses substances**

##### G 1 : Extrait méthanolique

Summary Statistics; DV: c (mg.ml <sup>-1</sup> )	
Statistic	Value
Multiple R	1,000
Multiple R <sup>2</sup>	0,999
Adjusted R <sup>2</sup>	0,998
F(1,1)	1045,125
p	0,020
Std.Err. of Estimate	0,009

Predicting Values variable: c (mg.ml <sup>-1</sup> )			
Variable	B-Weight	Value	B-Weight * Value
Pourcentage d'inhibition	0,011961	50,00000	0,598051
Intercept			0,067051
Predicted			0,665102
-95,0%CL			0,573853
+95,0%CL			0,756350

##### G2 : α-tocophérol

Summary Statistics; DV: c (mg.ml <sup>-1</sup> )	
Statistic	Value
Multiple R	1,000
Multiple R <sup>2</sup>	1,000
Adjusted R <sup>2</sup>	1,000
F(1,1)	23449,9
p	0,004
Std.Err. of Estimate	0,001

Variable	Predicting Values variable: c (mg.ml <sup>-1</sup> )		
	B-Weight	Value	B-Weight * Value
Pourcentage d'inhibition	0,004435	50,00000	0,221769
Intercept			0,000760
Predicted			0,222529
-95,0%CL			0,209806
+95,0%CL			0,235252

### G3 : acide ascorbique

Statistic	Summary Statistics; DV: c (mg.ml <sup>-1</sup> )	
	Value	
Multiple R	0,9994	
Multiple R <sup>2</sup>	0,9988	
Adjusted R <sup>2</sup>	0,9976	
F(1,1)	823,8866	
p	0,0222	
Std.Err. of Estimate	0,0005	

Variable	Predicting Values variable: c (mg.ml <sup>-1</sup> )		
	B-Weight	Value	B-Weight * Value
Pourcentage d'inhibition	0,000423	50,00000	0,021147
Intercept			-0,000189
Predicted			0,020959
-95,0%CL			0,014910
+95,0%CL			0,027007

### G4 : rutine

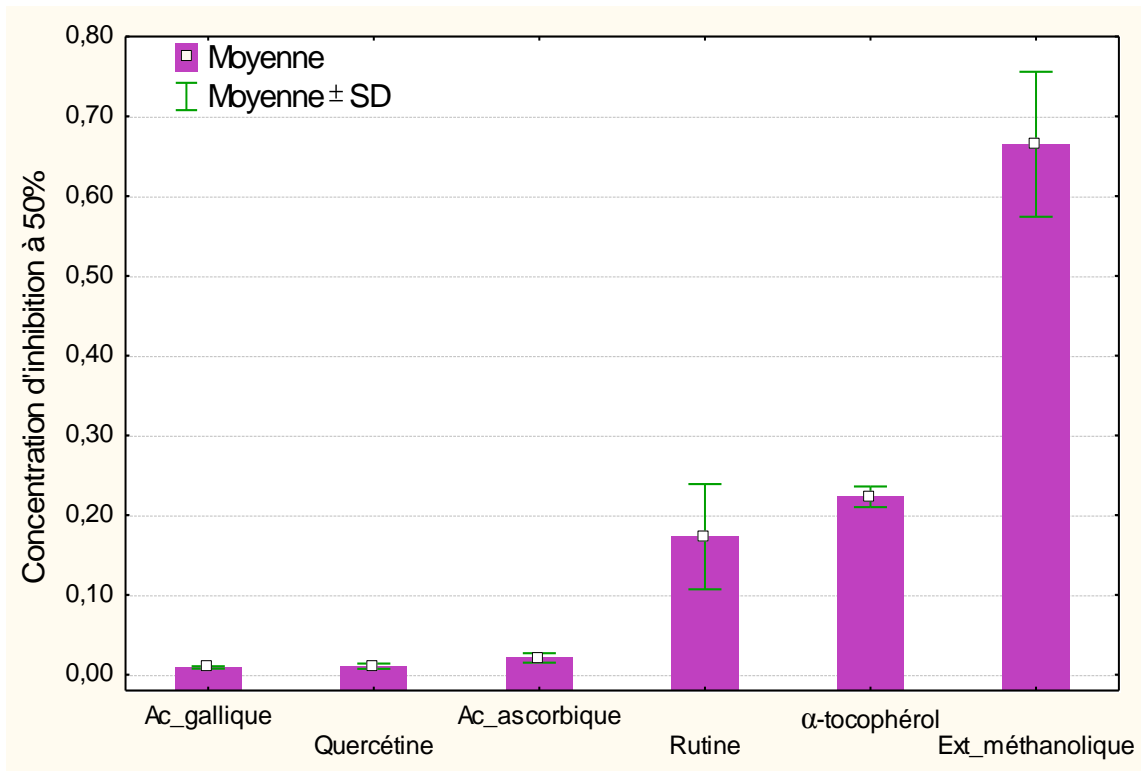
Statistic	Summary Statistics; DV: c (mg.ml <sup>-1</sup> )	
	Value	
Multiple R	0,97426	
Multiple R <sup>2</sup>	0,94917	
Adjusted R <sup>2</sup>	0,92376	
F(1,2)	37,34935	
p	0,02574	
Std.Err. of Estimate	0,03061	

Variable	Predicting Values variable: c (mg.ml <sup>-1</sup> )		
	B-Weight	Value	B-Weight * Value
Pourcentage d'inhibition	0,003038	50,00000	0,151905
Intercept			0,020750
Predicted			0,172655
-95,0%CL			0,106411
+95,0%CL			0,238899

G5 : acide gallique

Summary Statistics; DV: c (mg.ml <sup>-1</sup> )	
Statistic	Value
Multiple R	1,000
Multiple R <sup>2</sup>	1,000
Adjusted R <sup>2</sup>	0,999
F(1,1)	2340,255
p	0,013
Std.Err. of Estimate	0,000

Variable	Predicting Values variable: c (mg.ml <sup>-1</sup> )		
	B-Weight	Value	B-Weight * Value
Pourcentage d'inhibition	0,000213	50,00000	0,010626
Intercept			0,000113
Predicted			0,010739
-95,0%CL			0,007430
+95,0%CL			0,014048



## Appendice H

### Activité antidiabétique

Calcul d'erreur sur les pourcentages de réduction P :

$$P = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100$$

Si  $\Delta C_i$  et  $\Delta C_e$  sont les erreurs sur  $C_i$  et  $C_e$

$$\frac{\Delta P}{P} = \frac{\Delta(C_i - C_e)}{(C_i - C_e)} + \frac{\Delta C_i}{C_i} = \frac{\Delta C_i + \Delta C_e}{(C_i - C_e)} + \frac{\Delta C_i}{C_i}$$

$$\Delta P = P * \left( \frac{\Delta C_i + \Delta C_e}{C_i + C_e} + \frac{\Delta C_i}{C_i} \right)$$

H1 : Comparaison des glycémies à  $T_0$

Activité antalgique

Calcul d'erreur sur les pourcentages de protection :

$$\% \text{ de protection } (X) = \frac{\text{Moy. des spasmes du lô t tém.} - \text{Moy. des spasmes du lô t essai}}{\text{Moy. des spasmes du lô t témoin}} \times 100$$

Nous avons donc :

$$X = \frac{(a-b)}{a} * 100$$

Si  $\Delta a$  et  $\Delta b$  sont les erreurs sur  $a$  et  $b$ , alors :

$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{\Delta(a-b)}{(a-b)} + \frac{\Delta a}{a} = \frac{\Delta a + \Delta b}{(a-b)} + \frac{\Delta a}{a}$$

$$\Delta X = X * \left( \frac{\Delta a + \Delta b}{a-b} + \frac{\Delta a}{a} \right)$$

## REFERENCES

1. Boullard, B., "Dictionnaire : Plantes médicinales du monde, réalités et croyances", Estem, (2001), 660p
2. Shauenberg, P., Paris, F., "Guide des plantes médicinales, description et utilisation de plantes", (2005), 8p.
3. El- Hilaly, J., Tahraoui, A., Israili, Z.H., Lyoussi, B., "Hypocholesteremic effects of acute and subchronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whol plant in normal and diabetic rats", *Journal of Ethenopharmacology*. 105, (January 2006), 441-448.
4. Small, E., Catling, M., "Les cultures médicinales canadiennes ", (2000), 5p
5. Hostettsman, k., "Tout savoir sur les plantes médicinales des montagnes", Fabres, A, Lausanne, Suisse, (2001), 121p.
6. Grünwald, J., Janick, C., "Guide de la phytothérapie ", Marabout, (2006), 9p.
7. Verdrager, J., "Ces médicaments qui nous viennent des plantes ", Maloine S.A., (1978), 13p.
8. Wichtl, M., Anton, R., "Plantes thérapeutiques ", Tec et Doc, (1999), 689p.
9. Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto D. D., Guo, Z., "Places des plantes médicinales dans la thérapeutique", *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*.64(2),(1986), 159-164.
10. Nogart, A.S., Enhart, J., "La phytothérapie : Se soigner par les plantes", Eyrolles (2006), 12p.
11. Ramawat, K.G., Merillon, J-M., "Bioactive Molecule and Medicinal Plants", Springer-Verlag Berlin Helderberg, German, (2008), 379p.
12. Rubin, M., Messalin, J-P., "Guide pratique de phytothérapie et d'Homéopathie", Ellipsmarkrting, (1990).



13. Bruneton, J., “ Pharmacognosie, phytochimie : Plantes médicinales. Techniques et documentations”, Lavoisier, (2009). 402p.
14. Ghestem, A., Seguin, E., Paris,A., Orecchioni, A-M., “Les préparateurs en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-Homéopathie. Dossier 2”, Tec & Doc, Paris, (2004), 273p.
15. Künkel, U., Lobmeyer, T,R.,“ Plantes médicinales : identification, propriétés et emplois”, Parragon Books Ltd,(2007),31-32.
16. Thun, M., “Les plantes médicinales, leurs utilisations pour la santé de l’homme et des plantes”, Mouvement de culture biodynamique, France, (1998), 175p.
17. Whichtl, M., Anton, R., “Plantes thérapeutique, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique”, Lavoisier, technique et documentation, (Tec et Doc), & Médicales internationales (EM inter), Paris Cedex, (2003), 416p.
18. Debouigue, G., “Larousse des plantes qui guérissent”, Larousse, (1984),5-6.
19. Raynaud, J., “ Prescription et conseil en phytothérapie”, Tec & doc, (2002),5-7.
20. Lacost, S., “Les plantes qui guérissent, le secret de la phytothérapie”, Leduc, (2006), 14-16.
21. Delille, L., “Les plantes médicinales d’Algérie”, Berti,(2007), 13p.
22. Burnie, G., Forestier, S., Grieg, D., “Botanica : encyclopédie de botanique et l’horticulture. plus de 10000 plantes de monde entier”, (2006), 71p.
23. Coll, J., Tandron, Y.A., “Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga* : Structurale elucidation and biological activity”, *Phytochem. Rev.* 7, (2008), 25-49.
24. Vigneau, C., “Plantes médicinales : thérapeutique, toxicité”, Masson,(1985), 222-224.
25. Beloued, A., “Plantes médicinales d’Algérie”, Office des publications universitaires, (2005), 122p.

26. Bonnier, G., "La grande flore en couleurs", Paris, Belin.2, (1990), 729p.
27. Ait Youssef, M., "Plantes médicinales de Kabylie", Ibispress, (2006), 17-19.
28. Hermenn, T., Wunsh, V., "Encyclopédie, bordas nature : le règne végétale" SGED. Paris, (2004), 440p.
29. Shönfelder, I., Shönfelder, P., "Guide de la flore méditerranéenne", Hatie, (1988), 196p.
30. Spichiger, E., Savolaine, R., Jeammonod, D., "Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales", 3<sup>ème</sup> Ed revue et corrigée, (2004), 17p.
31. Quezel, R., Santa, S., "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales", Centre national de la recherche scientifique. Tome II, (1962), 786-787.
32. Boukef, M.K., "Les plantes dans la médecine traditionnelle Tunisienne", Agence de coopération culturelle et technique, (1986), 159-161.
33. Kuria, K.A., Muriuki, G., "A new cardiotoxic agent from *Ajuga remota* Benth (Labiatae)", East African Medicinal Journal.61, (1984), 1925-1927.
34. Belakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C., "Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopeia", J. Ethnopharmacol. 35, (1991), 123-143.
35. Alliotta, G., Pollio, A., "Useful plants in renal therapy according to pliny the elder ", Am. J. Nephrol. 14, (1994), 399-411.
36. Chen, H., TR.X., Liu, Z.L., Zhang, Y., Yang, L., "Antibacterial neoclerodane diterpenoids from *Ajuga lipulina*", Journal of Natural Products.59, (1996),668-670.
37. Takarezaki, M., Tokuda, H., Nishino, H., Konoshima, T., "Cancer chemo preventive agents (antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*", J. Nat. Pro. 62, (1999), 972-975
38. Bondi, M.L., AL-Hillo, M.R.Y., Lamara, K., Ladjel, M., Bruno, M., Piozzi, F., Simmonds, M. S. J., "Occurrence of the antifeedant 14,15dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria", Biochemical systematics and Ecology. 28, (2000),1023-1025.

39. Bouderbala, S., Lamri-Senhadji, M., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M., "Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*", *Phytomedicine* .15 ,(2008) ,453–461.
40. Taleb-Senouci, D., Ghomari, H., Krouf, D., Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M., "Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract instreptozotocin-induced diabetic rats", *Phytomedicine*, 16, (2009), 623-631.
41. El Hilaly, J., Lyoussi, B., Wibo, N., "extract of *Ajuga iva* in rat aorta", *Journal of Ethnopharmacology*.93,(2004), 69-74.
42. Jbilou, R., Ennabili, A., Sayah, F., "Insecticidal activity of four medicinal plant extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst) (ColeopteraTenebr)", *Afr. J. Biotechnol.*5, (2006), 936-940.
43. Jbilou, R., Amri, H., Bouayad, N., Ghailani, N., Ennabilli, S., Sayah, F., "Insecticidal effects of extract son larval development , $\alpha$ -amylase activity and offspring production of tribolium castaneum (Herbst) Insecta: *Coleoptera: Tenebrionidae*", *Bioresour. Technol.*, 9, (2008), 959-964.
44. Brown, D., "Encyclopedia of Herbs and Their Uses", Dorling Kindersly, London, (1995), 424p.
45. Gonzales –Terejo, M.R., Casares-Porcel, M., Sanchez-Rojas, C.P., Ramiro-Guitérrez, J.M., Molero-Meza, J., Pieroni, A., Giusti, M.E., Censorii, E., De Pasqual, C., Della, A., Parasheva-Hadjichambis, D., Hadjichambis, A., Houmani, Z., El Damerdash, M., El Zayat, M., Hmamouchi, M., El Johrig, M., "Medicinal plants in Mediterranean area", *Synthesis of the results of projet Rubia. J. Ethnopharmacol.* 116, (2008), 341-357.
46. Ikan, R., Ravid, U., "The isolation and identification of cyasterone from *Ajugaiva*", *Planta Med.* 20, (1971), 33-35.
47. Cantrell, C.L., Radjeb, M.S., Franzblau, S.G., Fronczek, F.R., Fisher, N.H., "Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from extracts *Ajuga remota*", *PlantaMedica*.65, (1999), 732-734.

48. Khafagy, S.M., Sabri, M.N., El-Sebakhy, N., Blessington, B., Assad, A., "A 28 carbon ecdysone-Like substance from *Ajuga iva*", *Planta Med.*35,(1978), 184-185.
49. Khafagy, S.M., Sabri, M.N., El-Sebakhy, N., Blessington, B., Assad, A., "A C- 20 carbon ecdysone-Like substance from *Ajuga iva*", *Planta Med.*35,(1979), 184-185.
50. Wessner, M., Champion, B., Giraut, J.P., Kaouadji, N., Lafont, R., "Ecdysteroids from *Ajuga iva*", *Phytochemistry.*31, (1992), 3785-3788.
51. Sabri M.N., Assad, A., Khafagy, S.M., "Isolation of four ecdysone from *Ajuga iva* root and rapid semi quantitative method for ecdysone determination", *Planta Med.*42, (1981), 293-295.
52. Camps, F., Coll, J., Cortel, A.A., "29-norcyasterone, new C-28 phytoecdysteroides from *Ajuga reptans* (Labiatae)", *Chem. Lett.*7, (1982), 1313-1316.
53. Nothis, A., Paris, R., "Sur quelques plantes de la nouvelle Calédonie", *Plantes et Phytothérapie.*4, (1969),274-287.
54. Ghedira, K., Chemli, R., Richard, B., Zeches, M., Le Men-Olivier, L., "Contribution to the study of the traditional Tunisian pharmacopeia: study of aerial part of *Ajuga iva* (L.) Schreb", *Plantes Med.Phytother.*25, (1991), 100-111.
55. Ben Jannet, H., Mighri, Z., Serani, L., Laprevote, O., Jullian, J., "Elucidation of three new diglyceride compounds from *Ajuga iva* leaves", *Nat Pro Lett.*10, (1997), 157-164.
56. Duart, J., Perez Vizcaino, F., Utrilla, P., Jimenez, J., Tamargo, J., Zarzuelo, A., "Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships", *General Pharmacology.*24, (1993),857-862.
57. Ramazanov, Nish., "Phytoecdysteroids and other biologically active compounds from plants of genus *Ajuga*", *Chem. Nat. Compd.* 41, (2005), 361-369.
58. Chenni, A., Yahia, D.A., Boukortt, F.O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M., "Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue

- antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet", *J. Ethnopharmacol.* 109, (2007), 207-213.
59. Ben jannet, H., Mourabit, A.A., Gateau-Olesket, A., Mara, A., "Enanthio selective synthesis of natural biologically active ivaide A: 1, 3-di-R-beta-hydroxy-glyceride glycerol", *Tetrahedron. Asymm.*10, (1999), 2381-2386
60. Israili, Z.H., Badiia Lyoussi., "Ethnopharmacology of plants of genus *Ajuga*", *J. Pharm. Sci.*, V.22 (4),(2009), 425-462.
61. Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie : plante médicinales", Technique et documentation, Lavoisier, (1999), 1120p.
62. Paris, R.R., Moyse, H., "Matière médicale", Masson et Cie, Paris. Tome I, (1976), 447p.
63. Fouché, J.G., Marquet, A., Hambuckers, A., "Les plantes médicinales de la plante au médicament conception et réalisation", Exposition à l'Observatoire du Monde des plantes Sart-Liège, (Septembre 2000).
64. Lugaci,A., Hovar, J.,Sagi, K.V., Biro, L., "The role of antioxidant nutriments in the prevention of deseases", *Acta Biologica Szegediensis.*47, (2003), 119-125.
65. Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D., "Phenolic content and antioxydant. Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions", *Cereal Chim.*82, (2005), 390-393.
66. Didry, N., Pinkas, M., Torck, M., " Sur la composition chimique et activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *Grindelia*. P1", *Med. Phyto.* XVI, 7-18.
67. Ravn, H., Andary, C., Kovacs,G., Molgard, P., "Cafeic acid esters as in vitro inhibitor of plant pathogenic bacteria and fungi", *Biochem.Syst.Ecol.*17, (1984), 175-184.
68. Hayas, F., Kato, M., "Antioxidant compounds of sweet potatoes", *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* 30, (1984), 37-46.
69. Mabry, T.G., Ulubelen, A., "Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoides, coumarins and lignans", *J. Agric. Food Chem.*28, (1984), 188-196.

70. Stavric, B., Matula, T.L., "Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health", 274-294. In: ONG ASH et Packeer L eds. Lipid Soluble and antioxydants: Biochemistry and clinical application. Basel: Birkhauser Verlag.
71. Das, H.C., Wang, J.H., Hein, E.J., "Carcinogenicity and cancer preventing activities of Flavonoids: A structure system-activity relationships (SSAR) analysis", 133-139 .In: Jukers E .Progression Drug Research. Basel: Birkhauser Verlag. Das H.C et Weaver G.M,(1972)
72. Bidet, D., Gagnault, J.C., Gerard, P., Trotin, F., "Inflammation, allergie, douleurs et acide arachidonique : du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes", L'actualité chimique, (1987), 89-97.
73. Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Butler, J., Halliwell, B., "Commentary reaction of plant derived and synthetic antioxydants with trichlorométhyl peroxy radicals" Free Rad. Res. 22, (1995), 187-190.
74. Masquelier, J., Dumon, M.C., Duma, J., "Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques", Acta thérapeutique.1, (1979), 101-104.
75. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur., Cazin, M., Cazin, J.C., Pinkas, M., "Oxygen species scavenging activity of phénolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations", Forshung. Drug Research.46II, (1996), 1086-1089.
76. De Olivera, M.M., Sampaio, M.R.P., Simon, F., Gibert, B., Mors, W.B., "Antitumor activity of condensed flavonols", An.Acad.Brazil.44, (1972), 41-44.
77. Brownlee, H.E., Hedger, J., Scot, I.M., "Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinillis perniciososa*". Phs. Mol. Plant Pathol, 40, (1992), 227-232.
78. Kreofsky, T., Shlager, J.K., Vuk-Pavlovic, Z., Abraham, R.T., Rohrbach, M.S., "Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophage", Am. J. Resir. Cell. Mol. Biol.7,(1992), 172-181.
79. Sarni-Manchado, P., Cheynier, v., "Les polyphénols en agroalimentaire", Tec &Doc, Paris, (2006), 1-11p.

80. Hadi, M., "La quercétine et ses dérivés : Molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques", Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. Pharmacochimie, (2004) ,144p.
81. Wang, J., Mazza, G., "Effects of Anthocyanins and other phenolic acid compounds on the production of tumor necrosis factor  $\alpha$  in LPS/IFN-  $\gamma$  -Activated RAW 264.7 Macrophages", J. Agric Food Chem.50, (2002), 4183-4189.
82. Nagendran B., Kalyana S., Samir S., "Phenolic compounds in plants and Agri-industrial by-products: Antioxydant activity, occurrence, and potential uses", Chemistry. 99, (2006), 191-203.
83. Bruneton, J., "Les tanins", Editions médicales,(1999),369-404.
84. Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., "Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique", Press polytechniques et universitaire Romande. Lausanne.192p.
85. Guignard, J.L., "Biochimie végétale", Dunod, Paris, (2000), 276p.
86. Iserin, P., "Larousse des plantes médicinales", Larousse, (2001), 291p
87. Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie : plantes médicinales", Technique et documentation, Lavoisier, (1993), 1120p.
88. Murphy Cowan, M., "Plant products as microbial agent", Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology, V. 12, n°4, (October1999), 564-582.
89. Hopkins, W.G., "Physiologie végétale : Molécules et métabolisme", De Boeck, Paris, (2003), 273-513.
90. Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., "Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet", Blackwell Publishing ltd, USA, (2006), 372p.
91. Amaral, J.A., Ekins, A., Richards, S.R., Knowles, R., "Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification and aerobic metabolism by bacteria in pure culture", Applied Environmental Microbiology, V.64, (1998), 520-525.

92. Uematsu, Y., Hirata, K., Saito, K., "Spectrophotométric determination of saponin in yucca extract used as food additive", *Journal of AOAC Int*, (2000),83p.
93. Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., Yoshikawa, M., "Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants", *Biology Chemistry*,(2000),67-74.
94. Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., "Biological activities and distribution of plant saponins", *J. Ethnopharmacol.*94, (2004), 219-243.
95. Oleszek, W., Bialy, Z., "Chromatographic determination of plant saponins-An update(2002-2005)", *Journal of chromatography A*, (2006),78-91.
96. Orscov, F.,and Genus, I., "Escherichia" in Kreig, N.R and Hold, J.G., *Bergy's manual of systematic bacteriology*, V1, The Williams and wilkins Co. Baltimor, 5, (1986).
97. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C.M., Dusart, J., "Microbiologie", De Boeck University, (2007),1164p.
98. Joly, J.G., Ishii, H., Teschke, R., Hasamura, Y., Lieber, C.S., " Effect of chronic alcohol feeding on the activities and submicrosomal distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase and demethylase for aminopyrine and ethylmorphine", *Biochem. Pharmacol*, (1973), 22: 1532-1535.
99. Delarras, C., "Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire", (2007),248p.
100. Carbonelle, B., "Microbiologie, bactériologie", Les cahiers d'internat, Indigo, (1985).
101. Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., "Introduction à la microbiologie", Renouveau pédagogique, (2001), 87-183.
102. Servais, S., "Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3", Thèse de doctorat de l'université de Claude Bernard, (2002).



103. Lahoual, M., Fillastre, J-P., "Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents", *Haema*. 7(3), (2004), 313-320.
104. Boyd, B., Ford, C., Koepke Michael, C., Gary, K., Horn, F., Mc Anelley, S., Mc Anelly, B., "Etude pilote ouverte de effet antioxydant d'ambrotose AOTM sur les personne en bonne santé", *Glycoscience & Nutrition*, 4(6), (2003), 7p.
105. Vansant, G., "Radicaux libres et antioxydants : Principe de base. Symposium Antioxydants et alimentation", Institut Danone, (2004).
106. Duclos, A.O., "Les alicaments 100% santé", Dauphin, (2007), 27p.
107. Serrie, A., Thurel, C., "Douleur et sida", Ellips, (1997), 5p.
108. Cohen, V., Jaquot, C., "Pharmacologie", Paris.5,(2001), 19-20.
109. Pieri, F., "Pharmacologie et thérapeutique", Ellips, (1992), 298p.
110. Organisation mondiale de la santé : Centre des medias. Aide mémoire n° 312, (Novembre, 2009).
111. Jiang, G., Zhang, B.B., "Glucagon and regulation of glucose metabolism", *American Journal of Physiology*. 284, (2003), E617-E678.
112. Baulieu, E.E., Kelly, P.A., "Hormone from molecule to disease", Hermann, Publishers in Art and Science, Paris, (1990).
113. Gasengel, J.M., Orecchioni, A.M., "Le préparateur en pharmacie: guide théorique et pratique", Tec & Doc, (1999), p1087
114. Viala, A., "Elément de toxicologie", Techniques et documentations, Tec &Doc, (1998), 3-12.
115. Frank, C., Lorgue, G., Lhuguenot, J., Rivière, J., "Toxicologie", Masson,(1992),3-76p.
116. Chaveron, H., "Introduction à la toxicologie nutritionnelle", Technique Et documentation, Paris, (1999), 214p.

117. Lechat, p., Cremaux, C., Giroudj, p., "pharmacologie médicinale", Masson, (1990), 710-716.
118. Charpentier, B., "Guide du préparateur en pharmacie", Masson, (2004), 1060-1061p.
119. Hodge, H.C., Sterner, J.H., "Determination of substance acute toxicity by DL50", American industrial Hygiene Association, V.10, (1949).93p.
120. Bensalem, M., Bendjelloul, D., " Technique histologique: théorie et pratique", Office des publications Universitaire(OPU), Alger, (1998), 56-57.
121. Zerrad, W., Hillali. S., Mataoui, M., El antris, B.S., Et hmeyen, A., "Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur", Laboratoire de Biochimie, d'environnement, Maroc, (2006), 1p.
122. Martin, P.P., Gagnard, J., Gautier, P., Drouineau, G., "L'analyse végétale de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales", Lavoisier, Paris, (1984).
123. .Pinta, M., "Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux ", Oléagineux. n°2, France, (1973), 1p.
124. Pinta, M., "Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux ", Ji coloquio europeo y mediterraneo sobre el control de la alimentacion de plantas cultivadas, Sevilla, (Septiembre 1968).
125. Rouessac, F., Rouessac, A., "Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes", Donod, Paris, (2004), 36-89.
126. Négué Diarra, M., "Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *Spilanthes oleracea* Jacq (Asteraceae)", Université de Bamako, (2003),
127. Houghton, P.J., Raman, A., "Laboratory hand book for fractionation of natural extracts", Chapman and hall, Londre, (1998), 29-31.

128. Amrani, O., "Valeur nutritive du chardon marie (*Silybummarianum*)", Mémoire de magistère agronomie université de Batna, (2000).
129. Chebaki, R., "Etude phytochimique de *Scrophularia sarahae* (deserticoss)", Mémoire de magister en chimie, université de Batna, (2006), 46p.
130. Buess-Herman,C., Dauchot-weymeers, J., Dumont, F., "Chimie analytique", De Boek & Larcier S.A, (1997).204p.
131. Singleton, V.L., Rossi, J.A., "Colorimetric of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent" Am J Enol Vitic.16, (1965), 144-158.
132. Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A., "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract", Food Chemistry. 85,(2004), 231-237.
133. Benhamou, N., Atik-Bekkara, F., Tadjiflova –Panovska., "Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*"., C.R.Chimie,12, (2009), 1259-1266.
134. Abdel-Hameed, E.S., "Total phenolic contents and radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples", Food chemistry.114, (2008),1271-127.
135. Salgorolo, P., "Pratique des manipulation de chimie à l'usage des biologistes" Tec&Doc, Paris, (2003), 363p.
136. Pietta, F., Gardana, C., Pietta, A., "Flavonoides in herbs in: Flavonoids in health and disease", Marceldekker, New York, 43-69.
137. Lauranson, J., "Exploration de la diversité biochimique chez les conifères : Contribution à l'étude de l'hybridation *pinus uncinata ram X pinus sylvestris L.*" et à la croissance du complexe spécifique *pinus nigra Am*", Thèse d'état, université C Bernard, Lyon, 207p.
138. Kamoun, P., "Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, médecine-science", Flammon, Paris, pp 96-417.
139. Lebreton, p., Jay, M., Voirin, B., "L'analyse quantitative et qualitative des flavonoides", Chimie analytique, (1967), 375-383.
140. Bate smith, E.C., Ostone, I., Lerùoiglu, F., "Leucoanthocyanidins II: The natural and distribution in leaves", Plantamedica, (1954), 34-37.

141. Harborne, J.B., Marete, E., Jaqueier, J.C., O'riordan, D., "Effect of dring methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*)", School of agriculture. Food science and veterinary Medicine. University College. Dublin. vol.42, N° 9, (2009), 1468-1473.
142. Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet., "Précis de bactériologie clinique", ESKA, Paris, (2002), 565p.
143. Guérin-Faublée, V., Carret, G., "L'antibiogramme : Principe, méthodologie , interet et limites", Journée nationale, GIV-INRA, (1999), 5-12.
144. Al-Reza, S. M.Ahman, A., Lee, J., ChulKang, S., "Potentiel roles of essential oil and organic extracts of *Zizyfus jujuba*", Food Chemistry, 119, (2010), 981-986.
145. Leclerc, H., " Précis de phytothérapie ", Masson, (1975), 170p.
146. Zhi Biao ,Y., Yan, Y., Yi Zeng, L., Bao, Z., "In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *PericarpiumCitriReticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids", LWT. 41, (2008), 597–603.
147. Chen, G.N, Wang, M.S., Wu, C.L., Lin, J.K., "Composition of radical scavenging activity. Cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanespropolis from different sources", eCAM,1(2), (2004), 175-185.
148. Molyneux, P., "The use of the stable free radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity", Songklanakarín. J. Sci.Technol.26 (2), (2004), 211-219.
149. Panichayupakaranant, P., Kaewsuwan, S., "Bioassy-guided isolation of the antioxidant constituents from *cassia alata* L. leaves", Songklanakarín J. Sci. Tec, 26(1), (2004), 103-107.
150. Wang, G., Mazza, G., "Effect of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production Of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  LPS/IFN- $\gamma$ -Activated RAW 264.7 Macrophage", J. Agric. Food Chem. 50, (2002), 4381-4383.

151. Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S., Leitão, S.G., "Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method". *Phy. Ther. Res* 15,(2001),127-130.
152. Novoes-Panda, A., "Preliminary of the hypoglycemic of some Brazilian medicinal plants", *Therapy* 56, (2001), 427-430.
153. Koster, R., Anderson, M., De Beer, J., "Acetic acid for analgesic screening", *Federal Proceeding*.8, (1959), 412-417.
154. Collier, H.O.J., Dinneen, L.C., Johnson, C., Sheider, C., "The abdominal contraction response and its suppression by antinociceptive drugs in the mouse", *British J. Pharmacol. Chemother.* 32, (1968), 295-310.
155. Soro, T.Y., Traore, F., Sakande, J., "Activité analgesique de l'extrait aqueux de *Ximenia Americana* (Linné) (Olacaceae)", *C.R.Biologies.* 332, (2009), 371-377.
156. Vogel, H., Vogel, W.H., "Drug discovery and evaluation pharmacological assays", (1997), 332p.
157. El Hillaly, J., Izraili, Z., Badiia Lyoussi., "Acute and chronic toxicological studies of *Ajugasterone* L. in experimental animals, *Journal of Ethnopharmacology.* 91, (2004), 43-50.
158. Pharmacopée européenne, (1999).
159. Paris, R.R., Moyses, H., "Matière médicale", MASSON et Cie, Paris, (1976), 447p.
160. Pharmacopée européenne (2002).
161. Baba Aissa, F., "Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb, substance végétale d'Afrique, d'Orient et d'Occident)", EDAS-Librairie Moderne-Rouïba, (2000).
162. Imai, Murata, E., Fujioka, S., Koreeda, M., Nakanishi, K., "Structure of *Ajugasterone* C, a phytoecdysone with an 11 hydroxy-group", *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, (1969), 546-547.

163. Koreeda, M., Nakanishi, K., Goto, M., "Ajugalactone and insect moulting inhibitor as tested by the chilo dipping method", *J. Amer. Soc.* 92, (1970), 7512-5713.
164. Shung, B-S., Lee, H-K., Kim, J-W., "Iridoid glycoside (I): Studies of the iridoid glycoside of *Ajuga spectabilis*", *Nakai. Kor. J. Pharmacog.* 11, (1980), 15-23.
165. Takeda, Y., Tsushida, S., Fujita, T., "Four new iridoid glycosides, p-coumaroylestere from *Ajuga decumbens*", *Phytochemistry.* 29, (1987), 2303-2306.
166. Min, Z.D., Wang, S-Q., Zheng, Q.T., Wu, B., Mizuno, M., Tanaka, T., Inuma, M., "Four new insectantifeedant *neo-clerodane* diterpenoids, *Ajuga cumbins* A, B, C and D, from *Ajuga decumbens*", *Chem. Phar. Bull.* 37, (1989), 2505-2508.
167. Muhammad, P., Ahmed, S., Nawas, H.R., Ullah, N., Malik, A., "New acetylated quinols from *Ajuga parviflora*", *Fitoterapia*, 70, (1999), 229-232.
168. Cosio, M.S., Buratti, S., Mannino, S., Benedetti, S., "Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family", *Food chemistry.* 97, (2006), 725-731.
169. Adjadj, M., "Propriété antioxydante et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *Ajuga iva* (L.) Schreber", *Mémoire de magister, Université Mentouri Constantine*, (2009), 72p.
170. Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., Yousefzadi, M., "Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages", *Food chemistry.* 110, (2008), 927-931.
171. Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y., "Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine", *Food Chemistry.* 51, (2003), 7292-7295.
172. Ouafi, S., "Contribution à l'étude biochimique du palmier dattier: analyse de polyphénols des folioles de palme de cultivar du *Phoenix dactylifera* L. dans un but chimiotaxonomique" *Thèse de doctorat en science de la nature, physiologie végétale, U.S.H.B*, (2007), 140p.

173. Zhao, H., Dong, H., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Fan, W., Gu, G., "Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation capacity and there extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*hordeumvulgare*), J. Agric.Food.Chem.54,(2006), 7277-7286.
174. Tsai, P.J., wu, S.C., Chen, Y.K., "Role of polyphenols in antioxydant capacity of napier grass from different growing seasons", Food Chem .106, (2008), , 27-32.
175. Park, H.H., Lee, S., Son, H.Y., Park, S.B., Kim, M.S., Choi, E.J., Singh, T.S., Ha JH Lee, M.J., Hyun, T.K., Kim, Y.H., Kim, S.H., "Flavonoids anantiulcerogenic activity from *brysonima crassa* leaves extract", Journal of ethnopharmacology. 97, (2005), 1-6.
176. Gérotti Chanu, C., "Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microteadébilis*" Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquée de Lyon, (2006).
177. Chen, H.Q., Jin, Z.Y., Wang, X.J., Xu, X.M., Deng, L., Zhao, J.W., "Luteolin protect dopaminergic neurons from inflammation –induced injury through inhibition of microglial activation", Neuroscience letters. 448(2), (2008), 175-179.
178. Hossain, M., Dilip, K., Brunton, Nigel, Martin-Diana, A., Barry-Rayan, C., "Characterization of phenolic composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS", (2010), 10576-10581.
179. Block, G., "A role for antioxidant in reducing cancer risk", Nutr. Rev.50, (1990), 207-213. "
180. Block, G., Langseth, L., "Antioxidant vitamins and disease prevention", food .Technol.48, (1994), 80-84.
181. Frankel, E.N. Meyer, A.S, J. Sci. Food Agric., 80 (13), (2000), 1925-1941.
182. Shirou, I., Toshimitsu, K., Chie, N., Yoshitaka, S., Setsu, O., Masaki, K., Tashiki, H., Ken, I., Laboratoire de pharmacie Cliniques et de pharmacie et thérapeutique, Département de sciences biopharmaceutique et pharmacie. Université de Hokkaido, Japon, (2008).

183. Seeram, N.P., Rupol, E.E., Shuller, H.S., Heber, D., "Identification of phenolic compounds in strawberries by light chromatography electrospray ionization masse spectroscopy", food chemistry, (2006), 1-11.
184. Jassim, S.A., Nadji, M.A., "Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective, Appl. Microbial. 95(3), (2003), 412-27.
185. Takahashi, T., Kokubo, R., Sakaino, M., "Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *eucalyptus maculata*", Lett. Appl. Microbiol. 39(1), (2004), 66-4.
186. Yadava, R.N, Tiwari, L., "Apotential antiviral flavone glycoside from the seeds of *butea monosperma*. O.Kunte", J. Asian. Nat Pro. Res.(7(2), (2005), 185-188.
187. Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V., "Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7, 3', 4'-hydroxy-substituted flavonoids", Innovative Food Science and Emerging Technologies5, (2004), 523-528.
188. Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., Oreopoulou, V., "Extraction and analysisof antioxidant components from *Origanum dictamnus*", Innovative Food Science and Emerging Technologies8, (2007), 155-162.
189. Bondet, V., Williams, W.B., Berset C., "Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method", Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie. 30, (1997). 609-615.
190. Sari Mostepha, F., "Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires d'une plante à caractère thérapeutique *thymus vulgaris* et étude de quelques activités pharmacologique", Mémoire de magister, Université de Blida, (2010).
191. Buerova, K.,Bezek, A., "Role of reactif oxygen and rheumatoid arhritis", General Physiology and Biophysics,(1999), 15-20.



192. Rahman, I., "Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets", *Current drug target-inflammation & Allergy*, Vol1,( 2002), 291-315.
193. Horton, J.W., "Free radicals and lipid peroxydation mediated in burn trauma: the role of antioxidant therapy", *Toxicology*. Vol. 189, (2003), 75-88.
194. El Hilaly, J., Lyoussi, B., "Hypoglycemic effect of the lyophilized aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats", *Journal of Ethnopharmacology*.80, (2002), 109-113.
195. Jimens, J., Risco, S., Ruiz, t., Zareulo, A., "Hypoglycemic activity of *Salvia lavandula lalifolia*", *Planta Med* .4,(1986), 260-262.
196. Eddouks, M., Lemhadri, A., Zegghwagh, N.A., Michel, J.B., "Potent hypoglycemic activity of the aqueous extract of *Chamaemelum nobile* in normal in normal and streptozotocin-induced diabetic rats", *Diabetes Res. Clin. Pract.* 67, (2005), 189-195.
197. Maghrani, M., Michel, J.B, Eddouks ., "Hypoglycaemic activity of *Retama raetamin* rats", *Phytother . Res.*19, (2005), 125-128.
198. Alaoui, j. F., Lagorce, Y., Cherrah, M., Amarouch, H., Roquehert, M., "Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'*argania spinosa*, in : Annales pharmaceutiques Françaises", 1998, 220-228.
199. Deraedt, R., Journey, S., Benzouni, J.; Peterfalvi, M, "Release of prostaglandins E and F in algogenic reaction and inhibition", *Eur. J.* 61 (1980), 17-24.
200. Durate, T.D.G., Nakamura, M., Ferreira, S.H., "Participation of the sympatithec of system in acetic acid induced writhing in mice", *Brazil. J. Med. Biol. Res.*21, (1988), 341-343.
201. Hokanson, G.C., "Acetic acid for analgesic screening", *J. Nat. Prod.* 41, (1978), 497-498.
202. Neo, A.G., Costa, G.M.L.C., Belati, A.H.C., Vinholis, A.H.C., Possebon, L.S., Da Silva Filho, A.A., Cunha, W.R., Carvalho, J.C.T., Bastos, J.K., "Silva, Angalgescic anti-inflammatory activity of a crude root extract of *pfaffia glomerata* (Spreng)" Pedersen, J. *Ethnopharmacol.* 96, (2005) 87-91.

203. Chenni, A., Aityahia., Boukott, F.O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M., "Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma liquid profile and tissue antioxydant status in rats fed a high-cholesterol diet ", J. Ethenopharmacol. 109, (2007), 207-213.
204. Rauter, A.P., Martins, A., Borges, C., Mota-Filipe, H, Pinto, R., Sepodes B., Justino, J., "Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats", *Phytother Res*24(2), ( jun, 2010), 133-138.
205. Aleexeff, G.V., Broadwin, R., Liaw., Dawson, S.V., "Characterization of the LOAEL-to-NOAEL uncertainty factor for mild adverse effect from acute inhalation exposures , *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 36, 96-105.