REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA



Faculté de **T**echnologie

Mémoire de fin d'études de Master

Filière : Génie des procédés
Spécialité : génie chimique

Étude phytochimique et thérapeutique d'une plante médicinale *Carthamus caeruleus.L*

Présenté par :

BENALLEL Amina & ABBAS TURKI Lamia

Proposé et Dirigé par :

Mr. NEDJHIOUI Mohamed.

Melle HAMIDI Nadjia.

Promotion 2019

Remercîment

Nous remercions, du plus profond de notre cœur, Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nous remercions, très chaleureusement Mr NEDJHIOUI Mohamed notre promoteur, Merci pour votre encadrement efficace, votre disponibilité et pour votre confiance qui nous a suivi et guidé tout au long de ce travail.

Au terme de ce travail nous tenons à remercier notre Co-promotrice Madame HAMIDI Nadjia pour, son attention ses encouragements sa patience, ses conseils et son grand soutien qui ont contribué énormément à la réalisation de ce travail.

Nous avons également, l'honneur et le plaisir de présenter nos profonds remerciements à Mr TIR et à Mme FERGHANI pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner notre travail.

Plus particulièrement, nous présentons nos remerciements les plus sincères et notre gratitude à la direction de SAIDAL pour l'opportunité qu'ils nous ont offert en nous accueillant au sein de leurs laboratoires pour mener à bien ce travail. Nous remercions vivement tout le personnel de SAIDAL pour nous avoir aidés à réaliser ce travail.

Nos remerciements vont également à tous ceux qui m'ont aidé, à un titre ou un autre, qu'il s'agisse de la fourniture d'informations précieuses, ou du conseil Un grand merci à tous,

A tous Les collègues de la promotion GC 2018-2019 pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

Enfin un énorme Merci à tous ceux qui nous ont aidé, conseillé, et ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront certainement à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut…
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance…
Aussi, c'est tout simplement que
Je dédie cette thèse …

À Mes chers Parents
Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour eternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentie pour mon instruction et mon bien être.
Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.
Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous enacquitterai jamais assez.
Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À ma chère grand mères Aicha
À mes chères sœurs, Samia, Anissa, Hayet et Sara.
À mes chers frères M`hamed et Yacine.
À mes plus beaux neveux Alaa et Mohamed.
À mes beaux frères Adel et Faouzi.
À mes chères cousine Meriem et Neila.
À mes chères sœurs d'amour Saada et Lamia.
À mon cher amie Newfel.
À toutes les personnes *qui ont participé à l'élaboration de ce modeste travail.*

BENALLEL Amina

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que je Dédie ce travail à :

*A mon Dieu «**ALLAH**» avant tout et après tout.*

Aux êtres les plus chers a mon cœur, mon père Ismail et ma mère Nachida, qui ont consacré leur noble existence De ma vie, je ne saurai assez leur exprimer mon affection, ma reconnaissance et mon amour.

À mes sœurs Wafaa, Ichrak, Ibtissem et mon petit frère Mohamed.

A ma chère ma binôme et ma jumelle de coeur amina, avec qui je partage ce moment si précieux.

A toute ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand,

A mes chères amies et toute personne que je connais, a toute la promotion Master II génie chimique 2019.

Lamia

Liste des figure

Figure I.1	Différents partie de *Carthamus Caeruleus L* ……..	**08**
Figure II.1	Biosynthèse des composes phénoliques le plus largement distribues ……	**11**
Figure II.2	Classifications des polyphénols…….	**12**
Figure II.3	Structure des acides hydroxbenzoïques et hydroxycinnamiques……...	**13**
Figure II.4	Structure de base des flavonoïdes…….	**14**
Figure II.5	Structure des différentes classes de flavonoïdes…….....	**14**
Figure II.6	Fèves Tonka……	**16**
Figure II.7	Combinaison d`un benzène avec une pyranne en une coumarine……..	**17**
Figure II.8	Structure de base de la lignine ……	**18**
Figure II.9	Structure général des stilbènes…….....	**18**
Figure II.10	Structure d`alcaloide…….....	**19**
Figure II.11	Structure d`isoprène…….....	**19**
Figure II.12	Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau……...	**20**
Figure II.13	Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile……	**23**
Figure II.14	Montage d'hydro diffusion……..	**24**
Figure III.1	Réduction du radical DPPH…….	**30**
Figure III.2	Structure chimique du radical lire DPPH…….....	**31**
Figure III.3	photo représente Technique de diffusion sur discs…….	**32**
Figure III.4	Structure de la peau humaine…….....	**33**
Figure III.5	l'inflammation et la formation de caillot.…….	**35**
Figure III.6	Phase de profération ……..……	**35**
Figure III.7	Phase de remodelage……	**36**
Figure IV.1	Schéma de la méthodologie suivis……...	**37**
Figure IV.2	Fleure de *carthamus caeruleus*……..	**39**
Figure IV.3	Observation microscopique des coupes transversales ……	**39**
Figure IV.4	Préparation de l'infusé…….	**42**
Figure IV.5	Test spectrophotométrie infrarouge……..	**45**
Figure IV.6	Principe du spectrophotomètre UV-visible ……..	**48**

Figure IV.7 Schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau ……. **49**
Figure IV.8 Protocole de dosage des poly phénols…….. **50**
Figure IV.9 Les étapes de la préparation des milieux de culture…….. **53**
Figure IV.10 Application du test……... **53**
Figure IV.11 Préparation des lapins…….. **55**
Figure IV.12 Rasage…….. **55**
Figure IV.13 Application des scarifications…….. **55**
Figure IV.14 Application des brulures…….. **56**
Figure V.1 Vue microscopique de coupes transversales des rhizomes et des feuilles …... **57**
Figure V.2 Les étapes de détermination de la composition chimique de *Carthamus C* **58**
Figure V.3 Formation d'une mousse (saponosides) et l'apparition de la couleur noir …… **59**
Figure V.4 Les extraits aqueux (rhizomes et feuilles)…… **59**
Figure V.5 Graphe du rendement des extraits aqueux et de l'HE.…… **60**
Figure V.6 Spectre FTIR……... **61**
Figure V.7 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique…….. **63**
Figure V.8 Les résultats de l'activité antiradicalaire.……. **64**
Figure V.9 Résultats de l'activité antioxydant pour l'extrait aqueux des feuilles ……. **65**
Figure V.10 Résultats de l'activité antioxydant pour l'extrait aqueux des racines ……... **65**
Figure V.11 Résultats de l'activité antioxydant pour l'HE …….. **66**
Figure V.12 Test de l'activité bactérienne……... **67**
Figure V.13 Résultats du test de l'activité antibactérienne…….. **69**

Liste des tableaux

Tableau II.1	Structure des squelettes des polyphénols ……..	**13**
Tableau III.1	Principaux radicaux libres et leur structure chimique ……	**27**
Tableau III.2	Les espèces réactives de l'oxygène ……....	**29**
Tableau III.3	Profondeur, Caractéristique de la plaie …….....	**34**
Tableau IV.1	Les souches utilisées dans le test de l'activité antibactérienne……...	**52**
Tableau IV.2	Les Echantillon appliqué pour l'incision …….....	**54**
Tableau IV.3	Les doses de la crème 2……..	**54**
Tableau IV.4	Les Echantillon appliqué pour les brulures ……...	**56**
Tableau V.1	Composition chimique de *CarthmusCaeruleus*…….	**58**
Tableau V.2	Résultats de criblage phytochimique…….....	**59**
Tableau V.3	Résultats du rendement des extraits aqueux…….....	**60**
Tableau V.4	Résultats du rendement d'HE…….....	**60**
Tableau V.5	Résultats des propriétés physico-chimiques……...	**61**
Tableau V.6	Résultats de la courbe d'étalonnage d'acide gallique dans l'eau distillée…….	**62**
Tableau V.7	Teneur en polyphénols des extraits de macération dans L'eau …….	**63**
Tableau V.8	Résultats l'absorbance et l'activité antioxydant del'extrait de feuilles …….	**64**
Tableau V.9	Résultats l'absorbance et l'activité antioxydant de l'extrait de rhizomesen fonction de la concentration……...	**65**
TableauV.10	Résultatsl'absorbance et l'activité antioxydant de l'HE en fonction de la concentration... ……..	**66**
TableauV.11	Diamètre des zones d'inhibitions des souches bactérienne vis-à-vis avec l'HE	**67**
Tableau V.12	Diamètre des zones d'inhibitions des souches bactérienne vis-à-vis avec l'extrait de rhizomes…….....	**68**
Tableau V.13	Diamètre des zones d'inhibitions des souches bactérienne vis-à-vis avec l'extrait de feuilles …….	**69**
Tableau V.14	Résultats de l`activité cicatrisante pour l`incision …….....	**70**
Tableau V.15	Résultats de l`activité cicatrisante pour les brulures…….....	**71**

Liste des abréviations

AA : Activité antioxydant

Abs : absorbance

AMOXY : Amoxilline

ATCC : Américain Type Culture Collectif

C : Concentration

CCM : chromatographie sur couche mince

CLSI: Clinical and laboratory standards institue

Cm : Centimètre

CMI : la concentration minimale inhibitrice

CPG : La Chromatographie en Phase Gazeuse

°C : degré Celsius

d : la densité

DPPH : 1,1Diphényl 2 Pycril Hydrazil

ERO : espèce réactives de l`oxygène

$FeCl_3$: chlorure ferrique

FGF : Fibroblast growth factors

g : gramme

GENT : Gentamine

h : heure

HCl : Acide Chlorhydrique

H_2So_4 : acides sulfuriques

HE : Huile essentielle

I_A : Indice d'acide

I_E: Indice d'ester

I_S: Indice de saponification

IC50 : la concentration d'inhibition médiane

KOH : Hydroxyde de potassium

MH : Muller Hinton

min : minute

ml : Millilitre

mm: millimètre

MM : La matière Minérale

MO : Matière Organique

M : Molaire

MS : La matière sèche

N : Normalité

NaOH : hydroxyde de sodium

PA : Principe actif

R : le Rendement

ROS: Reactive oxygen species

S: secondes

SC : solution contrôle

T : temps

UV : ultra-violet

VGEF : Visicular endothietial growth factor (facteur de croissance endothetial vasiculaire)

µl: microlitre

ρ : La masse volumique

Sommaire

Résumé

Remercîment

Dédicaces

Abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale ……..... 01

Chapitre I : Les plantes médicinales et la phytothérapie

I.1	Introduction…….....	**03**
I.2	Généralités sur les plantes médicinales……...	**03**
I.3	Définition des plantes médicinales ……	**04**
I.4	Définition des principes actifs ……...	**04**
I.5	Phytothérapie……	**04**
I.5.1	Définition …….....	**04**
I.5.2	Effets secondaires de la phytothérapie……	**05**
I.5.3	Avantages de la phytothérapie……..	**05**
I.5.4	Inconvénients de la phytothérapie……	**06**
I.5.5	Méthodes d'utilisation et fabrication ……...	**06**
I.6	*Carthamus Caeruleus L* ……..	**07**
I.6.1	Genre Carthamus …….....	**07**
I.6.2	Description……	**07**
I.6.3	Distribution géographique …….....	**08**
I.6.4	Propriété pharmacologique ……..	**09**
I.6.5	Utilisations et propriétés thérapeutiques……...	**09**
I.7	Conclusion……	**09**

Chapitre II : Les métabolites secondaires

II.1	Introduction ……..	**10**
II.2	Définition……..	**10**
II.3	Classification des métabolites secondaire ……...	**10**
II.3.1	Les composes phénoliques …….	**11**
II.3.1.1	Définition……..……	**11**
II.3.1.2	Biosynthèse ……..	**11**
II.3.1.3	Classification……	**12**

Sommaire

	a- les acides phénoliques……..	**13**
	b- Les flavonoïdes……	**14**
	c- Les tanins……..	**15**
	d- Les coumarines……	**16**
	e- Les lignines……...	**17**
	f- Les stilbènes hydroxyles……	**18**
II.3.2	Les alcaloïdes …….....	**19**
II.3.2.1	Définition et structure……...	**19**
II.3.2.2	Classification……	**19**
	a- Les pseudo-alcaloïdes……	**19**
	b- Les proto-alcaloïdes……..	**19**
	c- Les alcaloïdes ……...	**19**
II.3.3	Les térpenoides……	**19**
II.3.3.1	Définition et structure……..	**19**
II.3.3.2	Les huiles essentielles et leur relation avec les terpenoïdes ……	**20**
II.3.3.2.1	Définition des huiles essentielles …….	**20**
II.3.3.2.2	Localisation des huiles essentielles……..	**20**
II.3.3.2.3	Propriétés physico-chimique des HE……	**21**
II.3.3.2.4	Propriétés biologique des HE……...	**21**
II.3.3.2.5	Propriétés médicinales des HE ……...	**22**
II.3.3.2.6	Obtention des carraghénanes et composition chimique ……...	**22**
	a- L'entraînement à la vapeur d'eau …….	**22**
	b- L'hydro distillation……	**23**
	c- La distillation à vapeur saturée…….	**23**
	d- L'hydro diffusion…….	**24**
	e- L'expression à froid …….	**24**
II. 3.3.2.7	Caractéristiques organoleptiques …….	**24**
	a- L'odeur……..	**24**
	b- La couleur……..	**24**
	c- L'aspect…….	**25**
II. 3.3.2.8	Domaines d'utilisation des huiles essentielles……..	**25**
	a- En pharmacie…….	**25**
	b- En cosmétologie……	**25**

Sommaire

	c- En industries agroalimentaires……..	**25**
II. 3.3.2.9	Conclusion……	**25**
	Chapitre III : Les activités biologiques	
III.1	Introduction ……...	**27**
III.2	Activité antioxydant…….....	**27**
III.2.1	Radicaux libres ……..	**27**
III.2.2	Formation des radicaux libres……...	**28**
	a- Réaction d'oxydoréduction……	**28**
	b- Rupture homolytique ……	**28**
III.2.3	Le stress oxydant ……...……...	**28**
III.2.4	Les antioxydants……	**29**
III.2.5	Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode du DPPH ……	**30**
III.2.5.1	Principe de la méthode…..……	**30**
III.2.5.2	Le radical stable DPPH …….....	**30**
III.3	Activité antibactérienne…….....	**31**
III.3.1	Technique de dilution sur milieu gélosé …….....	**31**
III.3.2	Technique de diffusion sur discs ……..	**32**
III.4.	Activité cicatrisante ……..	**32**
III.4.1	Profondeur de la plaie ……...	**33**
III.4.2	Les étapes de la cicatrisation ……	**35**
III.4.2.1	Phase inflammation et formation de caillot……...	**35**
III.4.2.2	Phase de profération ……	**35**
III.4.2.3	Phase de remodelage ……	**36**
III.5	Conclusion ……	**36**
	Chapitre IV : Matériels et méthodes	
IV.1	Introduction……...	**37**
IV.2	Méthodologie……	**37**
IV.3	Matériel utilisée……..	**38**
IV.4	Matière végétale ……	**38**
IV.5	Observation microscopique……	**39**
IV.6	Préparation du matériel végétal……..	**40**
IV.7	Méthodes d`analyse……	**40**
IV.7.1	Détermination de la matière sèche……	**40**

	a-Principe……..	**40**
	b- Protocole……	**40**
IV.7.2	Détermination de la matière minérale……	**40**
	a- Principe……..	**40**
	b-Protocole……	**41**
IV.7. 3	Cendres solubles et insolubles dans l'eau……..	**41**
	a- Principe……..	**41**
	b-Protocole……	**41**
IV.7.4	Détermination de la matière organique……..	**42**
IV.7.5	Screening phytochimique……...	**42**
	a-Détection de composés phénoliques et de tanins……	**43**
	b- Détection de flavonoïdes ……...	**43**
	c-Détection d'alcaloïdes……	**43**
	d- Saponosides……	**43**
IV.8	Extraction et préparation des extraits…….	**44**
IV.8.1	Extrait aqueux ……	**44**
IV.8.2	Extraction d'huile essentielle par hydrodistillation……	**44**
	a- Principe……...	**44**
	b- Protocole……	**44**
IV.8.3	Calcul du rendement……...	**44**
IV.9	Spectrophotométrie infrarouge (IR)……..	**45**
IV.10	Détermination des constantes physico chimiques……..	**45**
IV.10.1	Indice d'acide……....	**45**
IV.10.2	Indice de saponification……..	**46**
IV.10.3	Indice d'estérification……	**46**
IV.10.4	Indice de réfraction…….	**47**
IV.10.5	Densité……	**47**
IV.11	Détermination quantitative des métabolites secondaires……	**47**
IV.11.1	Spectrophotométrie…….	**47**
IV.11.2	Analyse quantitatives……..	**49**
IV.11.2.1	Dosage des polyphénols totaux……..	**49**
	a- Principe……...	**49**
	b- Mode opératoire ……	**50**

Sommaire

IV.12	Les activités biologiques……	**51**
IV.12.1	Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode au DPPH …….	**51**
	a- Principe……....	**51**
	b- Mode opératoire ……	**51**
	c- Calcul des IC50 ……	**52**
IV.12.2	Evaluation de l'activité antibactérienne ……	**52**
	a- Principe ……..	**52**
	b- Protocole……...	**52**
	1- Les souches du test ……	**52**
	2- Préparation des milieux de culture ……	**53**
	3- Application du test ……	**53**
IV.12.3	Evaluation de l'activité cicatrisante……..	**54**
	a- Pour l'incision ……...	**54**
	b- Pour les brulures ……	**56**

Chapitre V : Les activités biologiques

V.1	Introduction……	**57**
V.2	L`observation microscopique…….	**57**
V.3	Résultats de la composition chimique de *carthmus caeruleus L*……	**57**
V.4	Résultats des tests phytochimique …….	**58**
V.5	Résultat du rendement……...	**59**
V.5.1	Résultat du rendement des extraits aqueux ……...	**59**
V.5.2	Résultat du rendement de l'HE …….	**60**
V.6	Résultat de l'IR ……..	**61**
V.7	Résultats des propriétés physico-chimiques ……..	**61**
V.8	Résultats de l'analyse quantitative…….	**62**
V.9	Résultats des activités biologiques ……	**64**
V.9.1	Activité antioxydant ……..	**64**
V.9.2	Activité antibactérienne …….	**66**
V.9.3	Activité cicatrisante ……..	**70**
	a- pour l'incision ……	**70**
	b-Pour les brulures …….	**71**

Conclusion générale …… **72**

INTRODUCTION

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité **[1]**.

Les plantes médicinales et aromatique demeurent une source inépuisable de substances biologiquement actives. Dans la majorité des régions du nord algérien, les plantes médicinales constituent une composante fondamentale du système de santé. Face à un cout de la santé galopant et insupportable aux budgets des pays développés ou en développement, on assiste depuis plus d'une décennie à une utilisation plus fréquente des plantes médicinales sous formes simples répondant à des normes de qualité :

- Plantes sèche pour préparer les tisanes.
- Huiles essentielles.
- Teinture officinales.
- Extraits fluides.
- Extrait secs **[2]**.

Dans le même contexte, Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires **[3]**.

Parmi les métabolites secondaires que les plantes produisent. Il y'a les huiles essentielles (HE). Les huiles essentielles ou simplement essences sont des produits aromatiques légers volatils ; généralement liquides à température ambiante et insolubles dans l'eau. Elles se caractérisent par leur odeur, spécifique des plantes ou des organes végétaux dont elles proviennent et qui leur donnent une valeur économique comme matière première pour l'industrie des parfums et des cosmétiques. L'huile essentielle est un mélange de produits ou un produit obtenu à partir d'une matière d'origine végétale, soit par expression de l'épicarpe des citrus soit par distillation à sec **[4]**.

Elles ont suscité beaucoup d'intérêt scientifique dû au fait qu'elles présentent une source d'antioxydants naturels et de molécules biologiquement actives. L'activité antioxydante des extraits de plantes a constitué la base de nombreuses applications incluant les procédés de conservation des aliments et les thérapies naturelles. En effet, plusieurs huiles essentielles extraites à partir de *carthamus caeruleus L* ont montré un bon pouvoir antioxydant et d'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives.

Pour ces raisons, l'étude des activités biologiques des substances issues des plantes en vue de leurs applications à la santé humaine demeure une tâche intéressante et utile **[5]**.

A côté des activités anti radicalaires des HE et des extraits aqueux des plantes, les métabolites secondaires ont un effet important sur les infections microbiennes.

Dans cette étude bibliographique, on a développé cinq chapitres. Le premier consiste à définir et présenté d'une manière générale la notion de phytothérapie et les plantes médicinales. Dans le deuxième on attribué le premier major classe des métabolites secondaires végétaux, les composé phénoliques et les huiles essentielles. Le troisième chapitre illustre les activités biologique (antioxydant, antibactérienne, et cicatrisante), alors que le quatrième chapitre révèle les tests phytochimiques et les expériences appliquées sur la plante concernée (carthamus caeruleus) pour la caractérisée ainsi que les protocoles suivis afin de clarifié son effet biologique. Nous achevons notre manuscrit par une conclusion générale qui résume tout notre travail.

CHAPITRE I :

Les plantes médicinales et la phytothérapie

I.1. introduction :

Après toutes les études, il était courant d'utiliser les plantes pour traiter ou prévenir les maux courants, mais il semble que nous soyons de plus en plus nombreux à nous en servir aussi dans le cadre de maladies plus graves. L'étude a également montré que la phytothérapie avait tendance à se substituer aux traitements conventionnels délivrés sans ordonnance et à venir s'ajouter, à titre complémentaire, aux traitements prescrits par le médecin **[6]**.

La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne **[7]**.

Cette pratique a engendré d'innombrables croyances sur ce qui sauve la vie et sur les forces qui lui sont néfastes **[8]**. Beaucoup de remèdes phytothérapiques sont nés des observations, de l'inspiration et de l'expérience des guérisseurs **[8]**.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse et l'importance de nos plantes, pour cela dans ce chapitre Nous avons choisi Carthamus Caeruleus pour connaître l'étendue du besoin humain pour elles et l'utilisation de la phytothérapie qui repose sur le savoir ancestral des plantes médicinales **[8]**.

I.2. Généralités sur les plantes médicinales :

Les plantes médicinales font partie de l'histoire de tous les continents à travers les siècles dont les traces de leur utilisation sont souvent révélées. Les premières pratiques de la médecine à base des plantes remontent. Les effets des plantes médicinales sont traditionnellement connus mais leurs vertus thérapeutiques peuvent varier en fonction de la partie utilisée de la plante. La pharmacopée s'oriente de plus en plus vers les traitements à base de plantes car la créativité et l'efficacité de la synthèse chimique a atteint ses limites.

Une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et qu'elle présente des propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales. Elles sont utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, leur action provient de leur composition Chimique (métabolites primaires ou secondaires) ou des synergies entre les différents composés présents **[9]**.

Une plante médicinale est généralisée si elle obéit à plusieurs critères à savoir si elle présente ou pas de phénomène de toxicité, son utilisation pour une indication donnée dans plusieurs pays et la posologie précise.

Elles ont joué un rôle essentiel dans le développement de la culture humaine dans le monde. Il est estimé que les ressources de nouveaux médicaments et de nombreux médicaments modernes sont produites indirectement à partir de plantes **[8]**.

I.3. Définition des plantes médicinales :

Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissant du système sanitaire moderne. Une plante médicinale s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux.

Ils sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains **[10]**.

I.4.Définition des principes actifs :

Le principe actif c'est une molécule contenu dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments. Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme Ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou séchées, nous pouvons citer comme des parties utilisées: les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être considérées comme des substances indirectement essentiels à la vie des plantes par contre aux métabolites primaires qu'ils sont les principales dans le développement et la croissance de la plante, les métabolites Secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température …)**.** Ces composés sont des composés phénoliques, des terpènes et stéroïdes et des composés azotés dont les alcaloïdes **[11]**.

I.5. Phytothérapie :

I.5.1. Définition :

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ». On entend par phytothérapie le traitement curatif ou préventif des maladies et des troubles subjectifs par l'utilisation de préparations obtenues à partir de plantes

entières ou d'organes de plantes - feuilles, fleurs, racines, fruits, gaines. Les plantes ainsi employées sont communément appelées plantes médicinales **[11]**.

Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers les soins les moins agressifs pour l'organisme **[11]**.

I.5.2. Effets secondaires de la phytothérapie :

Les phytomédicaments se distinguent des médicaments chimiques de synthèse par la fréquence et l'intensité, mais pas fondamentalement. Il ne fait en revanche aucun doute que les phytomédicaments sont mieux tolérés que les médicaments synthétiques, dont le potentiel d'effets secondaires est considérable. Les effets indésirables des phytomédicaments sont classés comme suivant :

- Phytomédicaments contenant des substances très actives et possédant un potentiel de risques proportionnel ; ont généralement disparu de l'arsenal thérapeutique moderne, sinon sous forme de substances pures isolées **[12]**.
- Phytomédicaments contenant des substances actives et dont l'usage excessif (Surdosage, utilisation prolongée) peut entraîner des effets indésirables.
- Phytomédicaments dont l'action thérapeutique n'a pas été clairement démontrée, mais pouvant néanmoins entraîner des effets indésirables.
- Phytomédicaments pouvant entraîner des effets secondaires dangereux du fait de la présence d'additifs non définis **[12]**.

I.5.3. Avantages de la phytothérapie :

- La phytothérapie est rentable et moins coûteux que les médicaments achetés dans une pharmacie allopathique **[11]**.
- Achat sans ordonnance. Ils sont disponibles dans n'importe quel magasin de la santé **[11]**.
- La phytothérapie et les remèdes sont plus efficaces que la médecine allopathique pour certains maux **[11]**.
- La médecine chimique prescrit par un pharmacien pourrait avoir certains effets secondaires négatifs. Cependant, la plupart des herbes médicinales et les remèdes

n'ont pas d'effets secondaires négatifs. Le cas échéant, ils sont plus doux que la médecine allopathique **[11]**.

- La phytothérapie peut être utilisée efficacement pour le processus de détoxication du corps naturel **[11]**.
- La phytothérapie, qui inclut des herbes telles que le gingembre, le poivron, l'ail et agripaume aider à contrôler les maladies liées à la circulation du sang telles que l'hypertension artérielle **[11]**.
- L'obésité est la cause de nombreux problèmes de santé. La phytothérapie peut aider à réduire l'excès de poids et de réguler l'appétit **[11]**.

I.5.4. Inconvénients de la phytothérapie :

- Cure utilisant phytothérapie et compléments prendrait un certain temps. Vous devez posséder une immense patience **[12]**.
- La phytothérapie contient divers ingrédients et vous devez être sûr que votre corps est d'accord avec les ingrédients et il n'est pas allergique **[11]**.
- Un point à noter ici est, la phytothérapie et la médecine pour certaines affections peuvent avoir des effets secondaires négatifs. Ces effets secondaires ne peut être révélé immédiatement, mais cela prendrait des mois voire des années. Dans les premières étapes, si la phytothérapie n'est pas d'accord avec vous, il est sage de cesser de l'utiliser **[12]**.
- Rappelez-vous, le gouvernement ne régalement pas l'industrie des herbes médicinales. Par conséquent, il n'y'a pas d'assurance qualité pour les produits à base d'herbes **[11]**.
- Il y'a très peu de bons praticiens de la médecine de fines herbes, et il serait sage de vous assurer que vous consultez un bon praticien avant de commencer sur la phytothérapie **[11]**.

I.5.5. Méthodes d'utilisation et fabrication :

Selon les traditions, les plantes peuvent être utilisées fraîches, ou séchées, entrant ensuite éventuellement dans des préparations diverses préservant leurs principes actifs **[12]**.On les Applique sous forme de teintures alcooliques, macérats, tisanes, compresses, baumes...

Il y'a des procédés plus récents permettent d'obtenir l'ensemble des principes actifs, la plus splendide consiste en un broyage fin (cryobroyage par exemple) de la plante après séchage et permet l'obtention d'une poudre totale de plante. Cette poudre peut être ensuite présentée sous forme de comprimés, gélules, sachets, etc.

Un autre procédé, l'extraction, optimisant le principe de la tisane avec une technologie de pointe, permet l'obtention d'une poudre purifiée et concentrée en PA. Après on plonge la poudre dans une solution naturelle, le solvant (eau ou alcool), adaptée aux propriétés physicochimiques des principes actifs recherchés. Cette phase cruciale permet d'isoler tous les actifs et de conserver leur synergie d'action. Le liquide ainsi obtenu va ensuite subir une phase de filtration afin d'éliminer les composés solides non assimilables tels que la cellulose. Puis une phase de séchage modéré sous vide qui éliminera progressivement le solvant et d'éventuels contaminants. L'extrait sec ainsi obtenu bénéficie des avantages suivants :

- Concentration en principes actifs
- Uniformité de la teneur en principes actifs (indépendamment des variations Naturelles, lieu, saison…)
- Biodisponibilité maximal par suppression des composés non assimilables
- Sécurité sanitaire : absence de contamination microbiologique et chimique **[12]**.

I.6. Carthamus Caeruleus L :

I.6.1. Genre Carthamus :

Le nom générique découle du mot arabe Kurthum, qui signifie "teinture". C'est une plante à fleurs qui à des rapports avec les chardons **[13]**. Carthamus est un membre de la tribu des cynarées, sous-famille tubuliflores, et de la famille des Astéracées. Il comprend 25 espèces **[14]**.

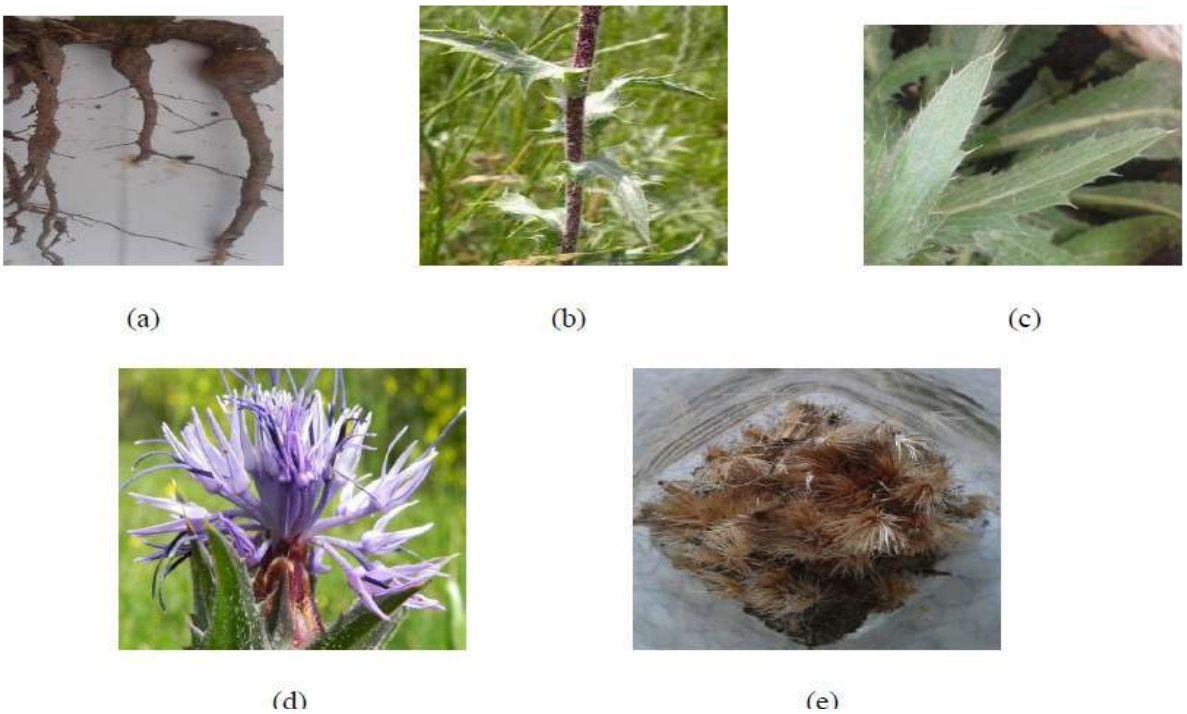
I.6.2. Description :

Carthamus Caeruleus est une herbe annuelle ou bisannuelle à tige ascendante simple ou très peu rameuse de 0,2m à 0,6m, glabre dressée et velue Son Rhizome est composé de racine principale qui évolue horizontalement et des racines secondaires sortent de racine principale évoluent verticalement. (Fig.I.1.a) **[13]**.

La tige est simple mesure environ 30 à 60cm, non ramifiées, et n'ont pas des ailes. (Fig.1.(b)) Les feuilles sont glabres ou pubescentes, fortement nervées, à contour ovale ou lancéolé. Les feuilles inférieures sont pétiolées, dentées ou lyrées – pennattifides. Alors que les supérieures sont sessiles amplexicaules ou dentées –épineuses. (Fig.I.1.c) **[13]**.

Les fleurs sont bleues, en capitules terminaux solitaires, ont une corolle tubuleuse que prolongent cinq dents à valeur de court de lobes sommitaux. (Fig.I.1.d) **[13]**.

Les fruits sont des akènesnettement plus courts que l'aigrette de 1cm de long. Les grains sont exalbuminées. (Fig.I.1.e) **[13]**.



(a) : Racine ; **(b) :** Tige ; **(c) :** Feuille ;
(d) : Fleur ; **(e) :** Fruits

Figure I.1: Différents partie de ***Carthamus Caeruleus*** L.

I.6.3. Distribution géographique :

C'est une espèce peu commune que l'on peut rencontrer dans les terrains maigres. Elle préfère les lieux secs et ensoleillés du bassin méditerranéen. Elle est originaire du Sud- Ouest de l'Asie elle est répandue dans le reste de l'Asie, en Afrique du nord (Algérie, Maroc, Tunisie, Libye), en Australie, les deux Amériques ainsi qu'en Europe (Grèce, Italie, France, Portugal, Espagne) **[15]**.

En Algérie, elle se trouve dans les régions côtières Méditerranéennes (Médea, Tipaza, Annaba, Bejaia, Boumerdes, Sidi bel- abbés et Bouira ainsi que dans les hauts plateaux Sétif) **[16]**.

I.6.4. Propriété pharmacologique :

En liaison avec leur usage traditionnel, deux études ont été menées afin de confirmer les effets pharmacologiques de *Carthamus caeruleus* L :

- La première menée en 2010 par **Baghiani** et collaborateurs qui ont démontré une forte activité antioxidant.
- La deuxième des études faites par **Benhamouet Fazouane 2013** indique que les racines de *Carthamus caeruleus* L active le phénomène de cicatrisation en cas de brulures à différents degrés **[13]**.

I.6.5.Utilisations et propriétés thérapeutiques :

Les rhizomes de *Carthamus caeruleus* L. sont utilisés en Algérie, en médicine traditionnelle comme cicatrisant soit sous forme de poudre ou une crème préparée dans le lait ou dans de l'eau. Cette plante contribue à soigner les brûlures (anti-brûlure). En outre, la richesse de cette plante en poly phénols lui confère une grande activité antioxydant. Les graines sont riches en amidon et en huile **[10]**.

I.7. Conclusion :

L'utilisation des quelques plantes médicinales ont quelques effets thérapeutiques bien faisant, sur l'organisme trouve donc son intérêt dans notre vie quotidienne.Une plante agit par l'ensemble de ses constituants, virifiés et dosés par le végétal lui-même dont c'est le rôle exclusif. Lorsque l'on en extrait une substance unique considérée comme le principe actif, il s'agit en général d'un poison dont l'usage être valable, et d'après notre travail on peut dire que la plante qu'on choisit (*Carthamus caeruleus* L) est riches en molécules bioactives à intérêts bénéfiques sur la santé des êtres vivants ce dernier est montré dans les chapitres suivants **[11]**.

CHAPITRE II :

Les métabolites secondaires

II.1. Introduction :

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques.

Les métabolites secondaires peuvent être des moyens de signalisation et d'interaction entre les plantes et les animaux disséminateurs ou pollinisateurs : certains métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes d'attraction des animaux (monoterpènes parfumées, anthocyanes de couleur ou de caroténoïdes dans les fleurs), nécessaires à la dispersion des graines et des insectes pollinisateurs par l'intermédiaire de couleurs et d'odeurs **[17]**.

II.2. Définition :

Les métabolites secondaires sont des substances spécifiques qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais sont synthétisés à partir de métabolites primaires **[18]**.Ils sont Caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide **[19]**. Ces composés diffèrent en fonction des espèces, on les trouve dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à une autre. Bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent **[20]**. Ils jouent un rôle important en fournissant une protection contre les animaux herbivores et contre les maladies, mais ne sont pas essentielles pour la croissance et le développement de base des plantes **[18]**.

II.3. Classification des métabolites secondaire :

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées.

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes :

Les composés phénoliques, les alcaloïdes et les térpenoîdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine **[21]**.

II.3.1. Les composes phénoliques :

II.3.1.1. Définition :

Les polyphénols sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire. Ce sont des groupes de molécules de structures variées, l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzoïque auquel est directement lié un groupe hydroxyle (OH), libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside **[22]**.

II.3.1.2. Biosynthèse :

La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux grandes voies :

- la voie la plus courante est celle qui, via le shikimate (l`acide shikimique), conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanines et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et a leurs très nombreux dérives. Acides benzéniques, acétophénones, coumarines, etc.…
- l`autre voie, par l`acétate et conduit a des poly-B-cetoeters de longueur variable.

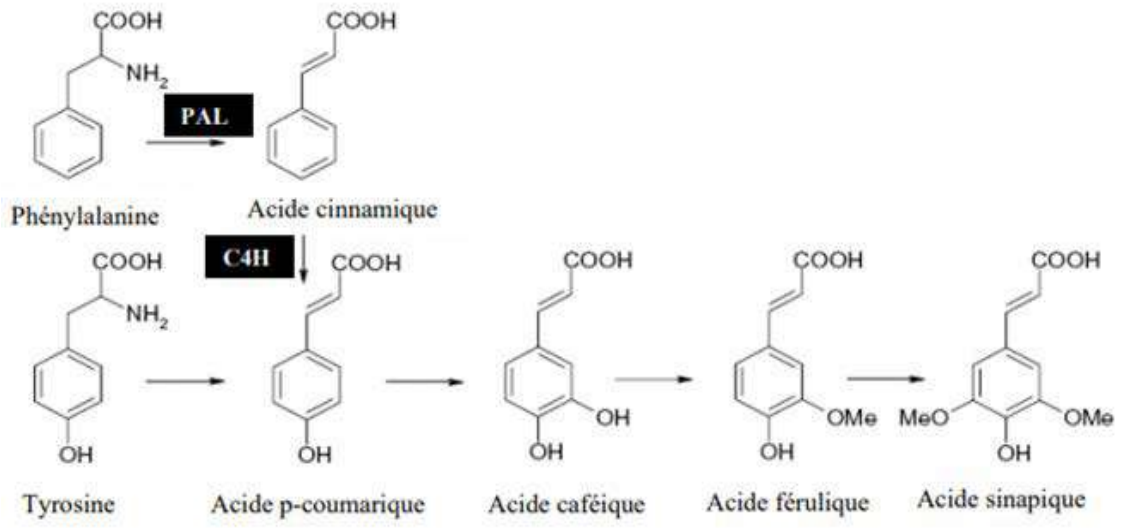


Figure II.1: Biosynthèse des composes phénoliques le plus largement distribues par la voie de shikmate. **PAL** : phénylalanine ammonia-lyase ; **C4H** : cinnmate 4- hydroxylase.

II.3.1.3. Classification :

Les composes phénoliques représentent un groupe de métabolites secondaires complexe comportant plusieurs familles : **[23]**

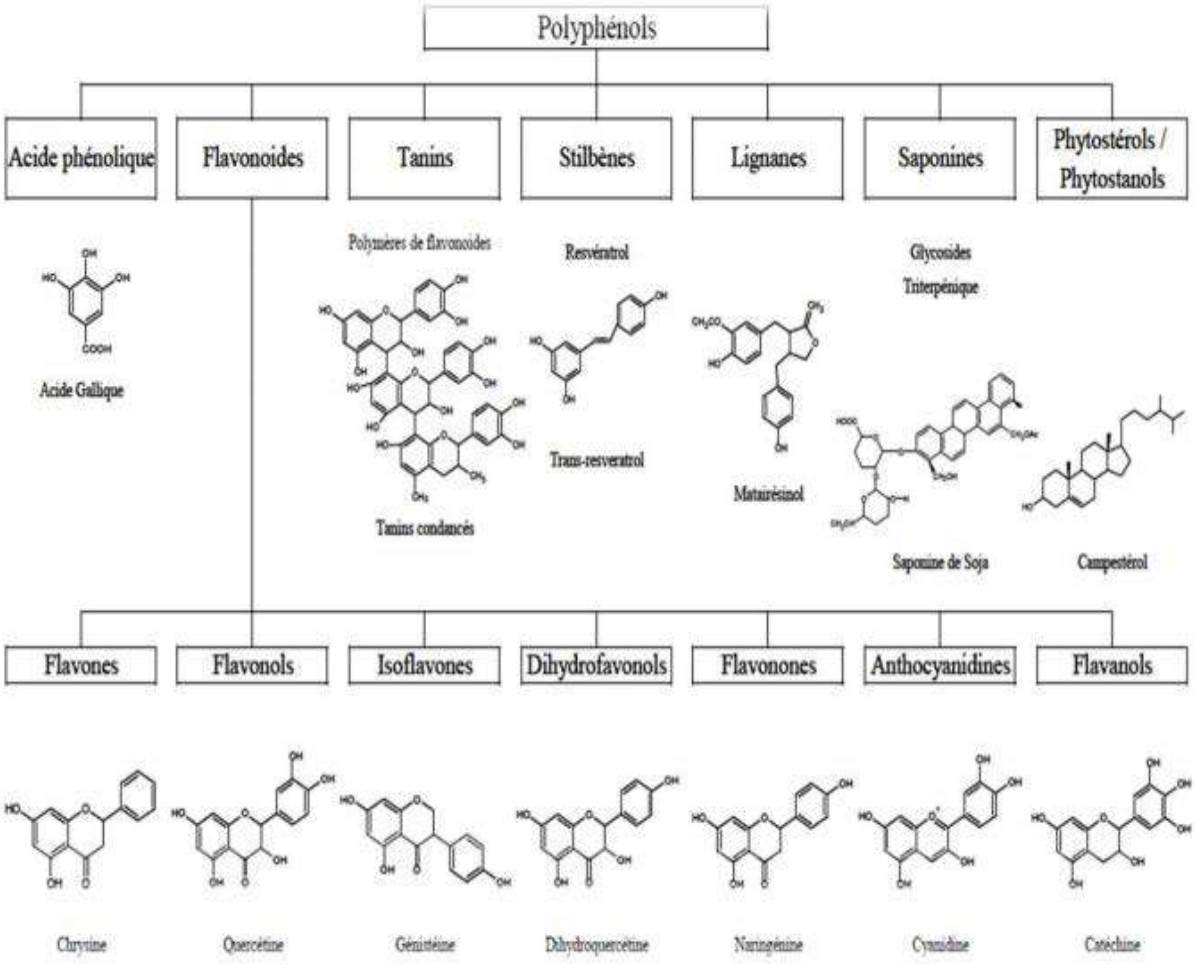
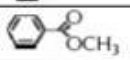
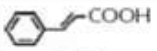
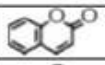
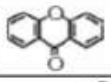
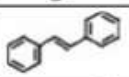
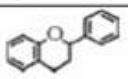


Figure II.2: Classifications des poly phénols **[23]**.

Ils forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau II.1). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques **[24]**.

Tableau II.1: structure des squelettes des polyphénols **[24]**.

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C_6-C_1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C_6-C_2	acétophénones	Gallacetophénone	
8	C_6-C_2	Acide phénylacétique	Acide ρ-hydroxyphényl-acétique	
9	C_6-C_3	Acides hydroxycinamiques	Acide ρ-coumarique	
9	C_6-C_3	Coumarines	Esculitine	
10	C_6-C_4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C_6-C_1-C_6	Xanthones	Mangiferine	
14	C_6-C_2-C_6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C_6-C_3-C_6	Flavonoïdes	Naringénine	

a- <u>les acides phénoliques :</u>

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques **[25]**. Ils sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales et sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. On distingue deux principales classes d'acide phénolique;**[26]** les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) et les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) :

- **les acides hydroxybenzoïque**s, dont les plus répandus sont l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique (figure 2), base de médicaments connus.
- **les acides hydroxycinnamiques**, dont les plus abondants sont l'acide ρ-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique **[25]**.

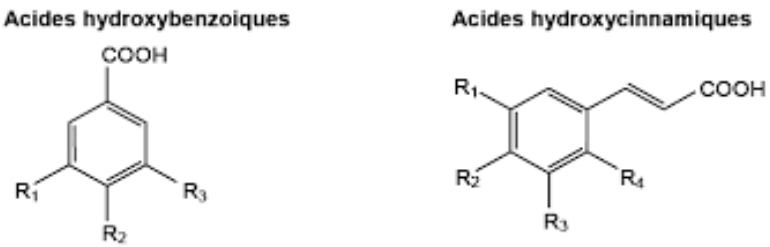


Figure II.3 : Structure des acides hydroxbenzoïques et hydroxycinnamiques **[25]**.

b- Les flavonoïdes :

Ce sont des pigments permettant la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments. Ce sont des polyphénols ayant une structure de base en C6-C3-C6, constituée de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Figure II.4).

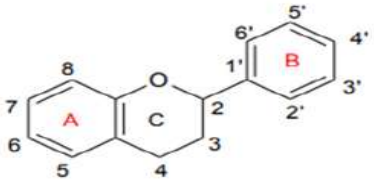


Figure II.4 : structure de base des flavonoïdes **[27]**.

On les classe en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central. On les distingue aussi par le nombre et la position des groupements hydroxyles, par l'existence ou non de substituants sur la génine. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2 ou 3 (Figure II.4). Ø Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé flavane. Ø Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme isoflavane. Ø Si la position 4 du flavane porte un groupement carbonyle, la molécule est appelée flavanone. Ø Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est en plus insaturée, le composé est nommé flavone. Ø Si le squelette précédent est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de flavonol.

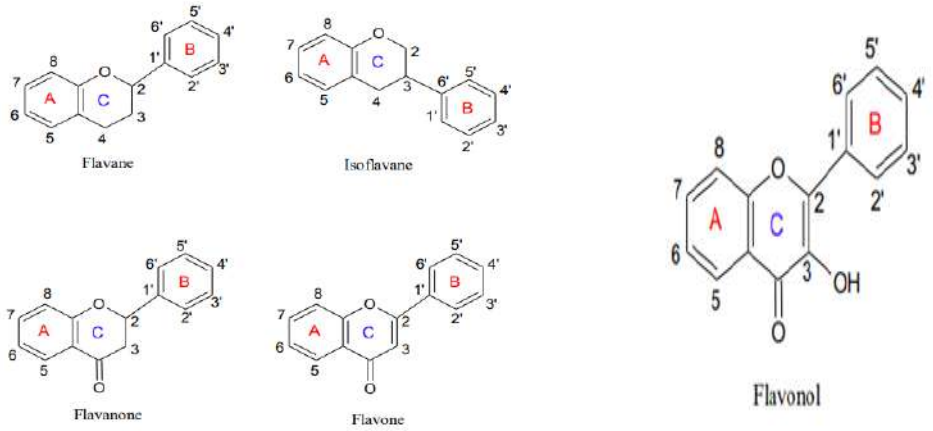


Figure II.5: structure des différentes classes de flavonoïdes **[27]**.

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquitaires des plantes. En chromatographie sur couche mince (CCM), les flavonoïdes sont visibles en lumière UV (à 254 et 365 nm) en raison de leurs doubles liaisons conjuguées. On peut, en outre, pulvériser sur la plaque une solution méthanolique de diphénylborate d'éthanolamine (réactif de Neu) afin d'exacerber les colorations observées en lumière visible et à 365 nm. Les hétérosides sont solubles dans l'eau et les alcools (éthanol, méthanol). Les génines sont généralement solubles dans les solvants organiques peu polaires (éther éthylique, chloroforme). La principale propriété biologique reconnue des flavonoïdes est d'être « veino-actifs » (veinotrope, vitaminique « P ») c'est-à-dire qu'ils permettent de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance. Par ailleurs, on attribue aux flavonoïdes de potentielles activités biologiques telles qu'anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anti-oxydantes et anti-cancérigènes. Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries **[27]**.

c- Les tanins :

Les tanins sont des polyphénols que nous trouvons dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, grenade, datte, café, cacao,..). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation. Les tanins sont divisés en deux groupes :

· Les tanins condensés, formés de pro-anthocyanidines (sous forme d'oligomères)
· Les tanins hydrolysables, esters des acides-phénols et de glucose **[27]**.

1. Tanins condensés (flavan-3-ols) :

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou pro-anthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légumes, thé, dattes,..).
Il a été rapporté par Haslam (1998) que les tanins jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits). Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique. Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides

minéraux dilués, mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanins **[26]**.

2. Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides-phénols, ou de dérivés d'acides-phénols. La molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides, ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones ; nous le rencontrons notamment chez les résides dans tous les organes : racines, tiges, feuilles ou fruits avant la maturité. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales.

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère (s) d'acide-phénol. Des liaisons carbones à carbone entre noyaux (liaisons biphényle réalisé par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus **[26]**.

d- Les coumarines :

Le nom coumarine vient de « cumaru », qui représente, en langue amazonienne, l'arbre de « Tonka » (cf. FigureII.6) **[28]**.



Figure II.6: Fèves Tonka **[28]**.

Ce sont des composés phénoliques qui dérivent des acides hydroxycinnamiques par simple cyclisation oxydative de la chaîne latérale à 3 carbones **[29]**. Les coumarines sont des composés chimiques hétérocycliques, produits par la combinaison d'un noyau benzène avec un pyranne, présentant une fonction cétone en position α par rapport à l'oxygène.

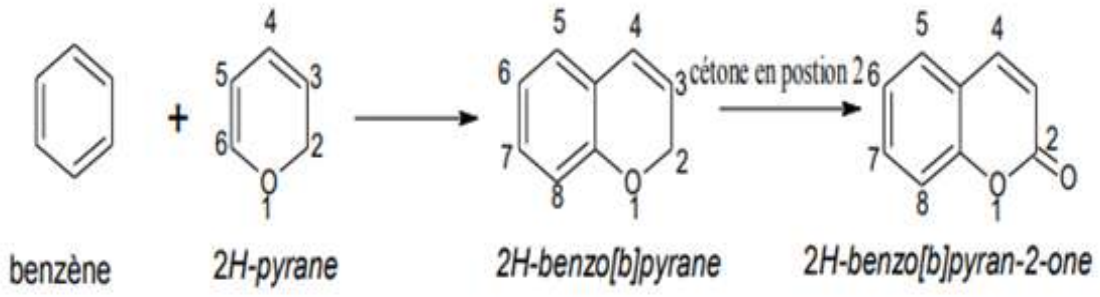


Figure II.7: Combinaison d`un benzène avec une pyranne en une coumarine.

Formule brute : $C_9H_6O_2$

Noms chimiques:

Nom IUPAC: 2H-chromen-2-one ou 2H-1-benzopyran-2-one

Autres: 1,2-benzopyrone (α-benzopyrone).

L'IUPAC considère la coumarine comme, étant, un dérivé de 2H-chromène (ou chrom-3- ène), un des deux isomères structuraux du produit d'insaturation de la chromane **[28]**.

e- <u>Les lignines :</u>

Les lignines sont des bio-polymères complexes à squelette aromatique dont la composition et la proportion varient avec l'espèce, l'âge et la taille du végétal. Elles sont parmi les principaux composants du bois avec les celluloses et les hémicelluloses. Les lignines sont particulièrement localisées dans la paroi secondaire et permettent le maintien de la rigidité végétale. Elles permettent aussi le transport de l'eau, des éléments minéraux et jouent le rôle de barrière physico-chimique contre les agents pathogènes **[30]**.

La biosynthèse des lignines débute dans le cytosol de la plante par la formation de trois unités, [31]qui se distinguent par leur degré de méthoxylation en position 3 et 5 :

L'unité para-hydroxylophényle (H), l'unité guaïacyle (G) et l'unité syringyle (S) provenant du couplage radicalaire et oxydant des alcools para-coumarylique, conifé rylique et sinapylique respectivement (Figure II.8) **[32]**.

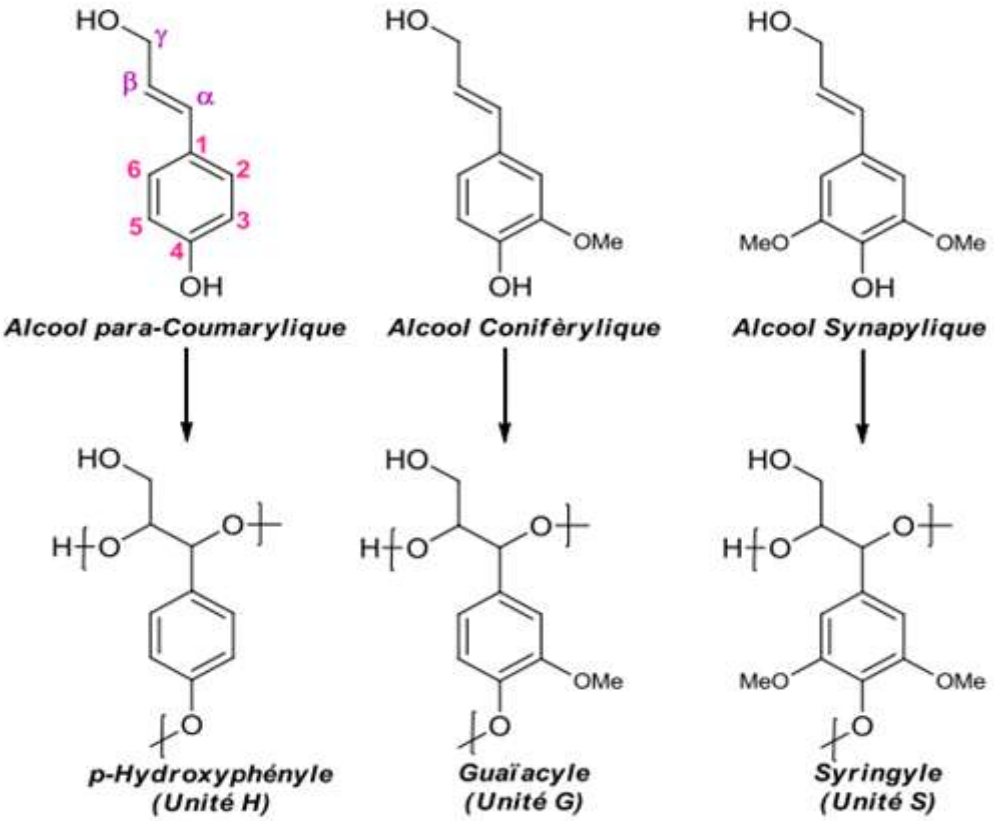


Figure II.8: Structure de base de la lignine **[32]**.

f- <u>Les stilbènes hydroxyles :</u>

Les stilbènes (1,2-diphényléthylène) sont des composés polyphénoliques formés de deux noyaux phényles reliés entre eux par un pont éthylène générant une structure en C6-C2-C6. Cette double liaison permet de générer des stilbènes pouvant exister sous deux formes : la forme trans (E) et la forme cis (Z) (Figure II.9). Les noyaux aromatiques sont généralement substitués par différentes fonctions tels que des groupes hydroxyles, méthyles, méthoxyles, prényles ou géranyles. Les unités monomériques peuvent également se coupler conduisant à la construction de dimères, de trimères, de tétramères et allant jusqu'aux octamères **[33]**.



Figure II.9: Structure général des stilbènes **[33]**.

II.3.2. Les alcaloïdes :

II.3.2.1. Définition et structure :

Un alcaloïde est un composé d'origine naturelle (le plus souvent végétal), azoté plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose. L'appartenance aux alcaloïdes est confirmée par les réactions communes de précipitations avec les réactifs généraux des alcaloïdes. Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine. L'intérêt qu'on leur porte reposait traditionnellement sur leur action physiologique et psychologique et particulièrement violente chez l'homme **[34]**.

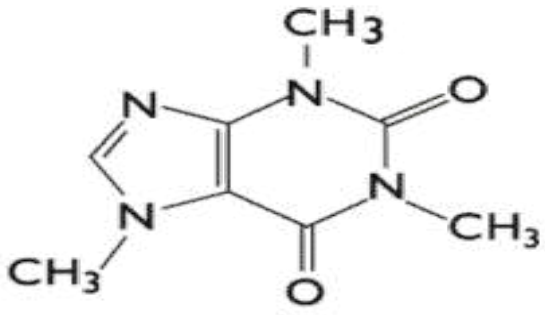


Figure II.10: structure d`alcaloide.

II.3.2.2. Classification :

On distingue :

- **a- Les pseudo-alcaloïdes**: Ne possèdent pas d'azote intra cyclique et l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale: exemple la conicine.
- **b- Les proto-alcaloïdes:** L'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils sont élaborés à partir d'acides aminés exemple : hordéines, colchicine.
- **c- Les alcaloïdes :** vrais que l'on classe suivant de leur cycle. L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle; bio-synthétiquement formés à partir d'acides aminés possèdent une activité pharmacologique marquée **[34]**.

II.3.3. les térpenoides :

II.3.3.1. Définition et structure :

Les terpènes forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, ce sont des dérivés de l'isoprène C5H8 (figure II.11) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci (C5H8)n.

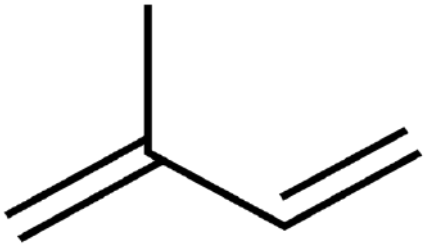


Figure II.11 : structure d`isoprène.

Leur squelette de carbone est constitué d'unités isoprèniques reliées entre eux. C'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles.

En fonction du nombre n (entier) d'unités, on peut distinguer pour; n = 2 : les monoterpènes (C10), n = 3: les sesquiterpènes (C15), n = 4: les diterpènes (C20), n = 5: les sesterpènes (C25), n = 6: les triterpènes (C30). Le carotène est un tétraterpène (C40H64). Il joue le rôle de pigment en photosynthèse végétale **[35]**.

II.3.3.2. Les huiles essentielles et leur relation avec les terpenoïdes :

II.3.3.2.1 Définition des huiles essentielles :

Ce sont des substances huileuses hautement volatiles des plantes, marqués par une forte et caractéristique odeur, les terpènes (principalement les monoterpènes) représentent la majeure partie (environ 90%) des ces composants La plupart des composants des HES sont inclus dans deux groupes : les terpenoïdes et les phénylpropanoïdes mais ces derniers sont moins fréquents par rapport aux terpenoïdes.

Les HES ne contiennent pas de corps gras (lipides) **[4]**.

Sont obtenus par distillation par la vapeur d'eau Ils sont plus ou moins modifiés au cours de la préparation **[4]**.

II.3.3.2.2 Localisation des huiles essentielles

Ces essences sont localisées dans différents organes de la plante. Elles sont présentes soit dans les organes végétatifs; soit dans les organes reproducteurs. Nous les trouvons dans les feuilles et les fleurs, mais également dans les graines (semences), les racines, les fruits et les écorces. les tiges, le bois, etc **[36]**. et sont également concentrées dans certains cellules ou

groupes spéciaux de cellules (glandes). Les huiles essentielles sont des produits naturels des plantes qui s'accumulent en structures spécialisées telles que des cellules d'huile, des trichomes glandulaires, et des conduits d'huile ou de résine **[37]**.

II.3.3.2.3.Propriétés physico-chimique des HE

Les principales caractéristiques physicochimiques communes des huiles essentielles sont :

- Elles sont solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;
- Elles sont dotées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité
- Liquides à température ambiante ;
- Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Elles sont volatiles et très rarement colorées ;
- Les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ont une densité faible
- Leur indice de réfraction vari essentiellement en fonction de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse **[38]**.

II.3.3.2.4Propriétés biologique des HE.

Les huiles essentielles agissent bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire sauf quelques exceptions **[39]**.

Les molécules aromatiques telles que les phénols suivis par les aldéhydes puis les cétones viennent ensuite les alcools puis les éthers possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé. En général l'action de l'essence se déroule en trois étapes distinctes : **[9]**

- Augmentation de la perméabilité suivie par la perte des constituants cellulaires par attaque de l'huile essentielle sur la paroi bactérienne **[40]**.

- Blocage de la production de l'énergie cellulaire et de la synthèse des composants

de structure par acidification de l'intérieur de la cellule **[41]**.

- Mort de la bactérie par destruction de son matériel génétique **[41]**.

II.3.3.2.5.Propriétés médicinales des HE:

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. La plupart des constituants des huiles essentielles ont un pouvoir antimicrobien d'où leur usage comme antiseptiques. D'autres possèdent des propriétés digestives ou des propriétés anti spasmodiques, sédatives, cicatrisantes, etc…Ces activistes sont dues surtout à leurs constituants terpéniques **[42]**.

En outre, de nombreuses HE présentent une activité contre tous les différents types de douleurs et sont très utilisées pour traiter les troubles articulaires inflammatoires. Elles ont la propriété de renforcer et de relancer les défenses immunitaires de l'individu C'est dans ce sense que l'on a pu dire que les essences aromatiques étaient cytophylactiques (protectrices des cellules vivantes) **[41]**.

II.3.3.2.6.Procèdes d`extraction des HE :

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles :

a- L'entraînement à la vapeur d'eau :

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînables par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation En fonction de sa densité, elle peut être recueillie à deux niveaux **[41]**.

- Au niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, ce qui est fréquent;
- Au niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau.

Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydrodistillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion **[41]**.

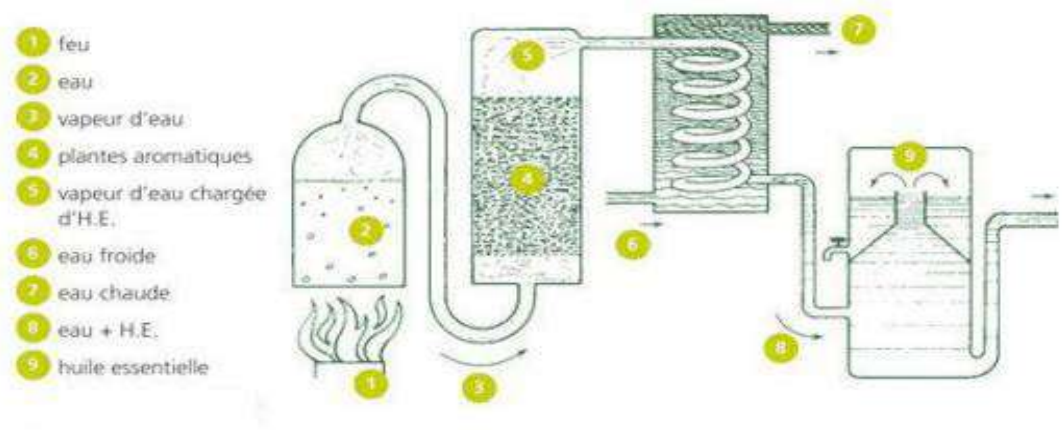


Figure II.12: Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.

b-L'hydrodistillation :

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux **[36]**.

Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation **[36]**.

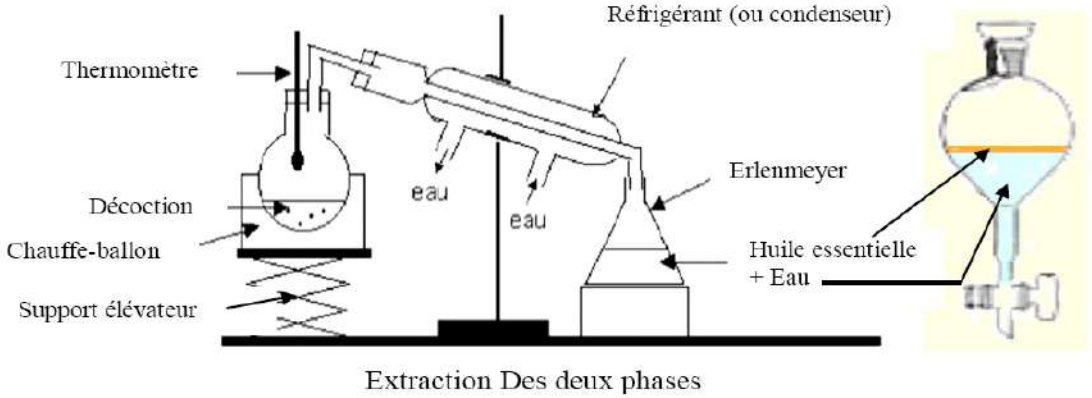


Figure II.13: Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile.

c- La distillation à vapeur saturée :

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation

à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées **[41]**.

d-L'hydrodiffusion :

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie **[36]**.

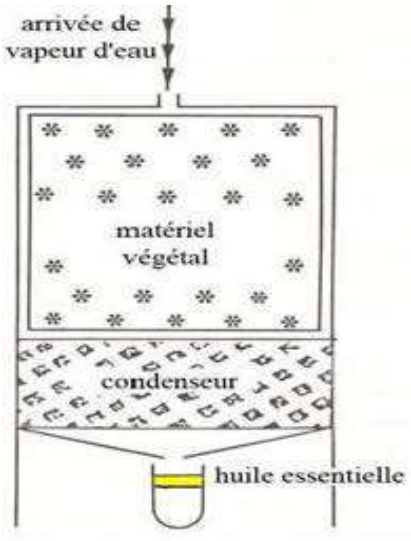


Figure II.14 : Montage d'hydro diffusion

e-L'expression à froid :

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'encore des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique **[37]**.

II.3.3.2.7.Caractéristiques organoleptiques :

Chaque extrait est caractérisé par ces propriétés organoleptiques telles que

a- L'odeur :

L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habilité des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parviennent à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'au dix millionièmes de grammes par litre d'air **[41]**.

b- La couleur :

La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile donnée **[41]**.

c-L'aspect :

L'aspect d'un extrait dépend des produits qui la constituent, qui peuvent nous apparaître sous forme solide, liquide ou bien solide-liquide **[41]**.

II.3.3.2.8.- Domaines d'utilisation des huiles essentielles :

a- En pharmacie :

Le contenu des plantes en essence et la nature chimique des constituants leurs confèrent de grandes perspectives d'application, ces substances sont d'un grand intérêt pour le domaine médicale et pharmaceutique.

En effet, les huiles essentielles ont un champ d'activité très large, elles inhibent la croissance des bactéries, et des levures et également des moisissures de plus elles sont très efficaces sur les microorganismes résistants aux antibiotiques **[41]**.

b- En cosmétologie :

Le secteur d'hygiène et l'industrie des cosmétiques sont également des consommateurs, la majorité des produits cosmétiques contiennent une quantité de l'huile essentielle comme élément parfumant et aussi élément assurant une odeur agréable.

c- En industries agroalimentaires :

Les huiles essentielles sont de plus en plus utilisées dans la conservation des denrées alimentaires et cela grâce à leur activité antimicrobienne à large spectre sans pour autant en dénaturer le gout car ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires **[41]**.

II.3.3.2.9. Conclusion :

Les différents aspects développés dans cette étude bibliographique sur les substances bioactives et notamment les HEs indiquent que ces essences végétales divers et multiples représentent un intérêt économique jouent un rôle important dans les industries agroalimentaire pharmaceutique et cosmétologique **[36]**. Ces substances de composition chimique complexent (composés terpéniques, aromatiques et autres…), peuvent être isolées à partir des différents organes de plantes (feuilles, fruits, fleurs, graines, etc.) par des techniques

traditionnelles ou des procédés innovants. Il a été montré que les nouvelles méthodes sont beaucoup plus rentables d'un point de vue coût, rendement et temps d'extraction **[43]**.

Une huile essentielle peut avoir des effets différents selon ces composantes, Elle peut être en même temps sédative et stimulante. Il faut donc connaître la composition chimique des huiles essentielles et leurs actions biologiques afin d'estimer au mieux leurs effets probables sur l'organisme **[44]**.

CHAPITRE III :

Les activités biologiques

III.1. Introduction :

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs.

Les huiles essentielles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales et antiparasitaires, dû à leurs vastes utilisations dans les domaines pharmaceutique, alimentaire, cosmétique. Néanmoins, une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois **[45]**.

III.2. Activité antioxydant :

III.2.1. Radicaux libres :

Les radicaux libres sont indispensables à la vie car ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense de l'organisme. En effet, ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes **[45]**.

Par définition, un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc. (Tableau.III.1) **[46]**.

Tableau III.1 : Principaux radicaux libres et leur structure chimique **[46]**.

Radicaux libre (nomenclature)	Structure chimique
Radical hydroxyle	**OH•**
Radical hydroperoxyde	**HOO•**
Radical peroxyde	**ROO•**
Radical alkoxyle	**RO•**
Peroxyde d'hydrogéne*	**H_2O_2**
Peroxynitrite	**ONOO•**
Anion superoxyde	**$O_2^{\bullet}$**

□ Espèce active de l'oxygène, non radicalaire.

III.2.2. Formation des radicaux libres :

a- Réaction d'oxydoréduction :

Les radicaux libres les plus courants possèdent un seul électron célibataire. Ils peuvent être formés depuis une espèce radicalaire qui subit une réaction d'oxydoréduction. Il y a alors perte ou gain d'électron **[47]**.

Oxydation: $R\text{-}X \longrightarrow R\text{-}X^{\bullet} \xrightarrow{\dot{e}} R^{\bullet} + X^{+} + e$ **Eq (1)**

Reduction : $R\text{-}X + e^{-} \longrightarrow R\text{-}X^{\bullet -} \longrightarrow R^{\bullet} + X^{-}$ **Eq (2)**

REMERQUE : Le signe « • » représente l'électron célibataire.

b- Rupture homolytique :

La production de radicaux libres peut se faire également par rupture homolytique d'une liaison covalente, ce qui entraîne la formation de deux entités ayant chacune un électron célibataire.

$$R\text{-}X \longrightarrow R^{\bullet} + X^{\bullet} \qquad \textbf{Eq (3)}$$

La rupture homolytique est le partage symétrique du doublet de valence commun, par opposition à la rupture hétérolytique qui donne naissance à des ions de charge opposée. Celle ci intervient le plus communément en phase gazeuse ou en phase liquide pour les molécules ayant des liaisons peu polarisées **[47]**.

La molécule de dioxygène est représentative de ce type de rupture. L'énergie de liaison qui relie les deux atomes d'oxygène (150 kJ mol-1) est relativement faible par rapport à la liaison carbone-carbone (346 kJ mol-1). Cette liaison étant fragile, elle est plus apte à subir une rupture homolytique **[47]**.

III.2.3. Le stress oxydant :

Au sein de l'organisme, il existe un équilibre entre d'une part les espèces réactives (ER) qui sont présentes à l'état basal en faible concentration et d'autre part le système antioxydant qui contient notamment des enzymes, des vitamines, des oligoéléments, le glutathion. Ce système est un moyen de défense en cas de production excessive d'ER.

La production de ROS, lorsqu'elle n'est plus contrôlée par les défenses antioxydantes, entraîne de nombreuses perturbations : c'est le stress oxydant.

Le stress oxydant se définit donc comme un déséquilibre entre les ER et les systèmes de défense. Cette régulation, appelée équilibre redox, se fait en permanence. Dans le cas d'une faible concentration d'ER, le système anti-oxydant la compense : le déséquilibre est de courte durée. L'équilibre redox est maintenu. A l'inverse, s'il est prolongé ou permanent comme dans certaines pathologies chroniques, la concentration en ER est augmentée de façon constante, et la réponse anti-oxydant n'est plus suffisante pour la contenir : une perte de l'homéostasie redox apparait conduisant à l'apparition d'un déséquilibre avec une production d'ER forte, c'est le stress oxydant **[48]**.

Tableau III.2 : les espèces réactives de l'oxygène.

Espèces Réactives de l'Oxygène		Réaction
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	$O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$
Radical hydroxyle	$HO^{\cdot}$	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^- + HO^{\cdot} + Fe^{3+}$ (1) $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \longrightarrow O_2 + HO^- + HO^{\cdot}$ (2) $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$ $H_2O_2 + 2\,GSH \longrightarrow 2\,H_2O + GSSG$
Radical Peroxyle	$RO_2^{\cdot}$	$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow RO_2^{\cdot}$
Hydroperoxyde	RO_2H	$RO_2^{\cdot} + RH \longrightarrow RO_2H + R^{\cdot}$

III.2.4. Les antioxydants :

Un antioxydant est par définition une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. Un antioxydant peut donc : (i) prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaines réactionnelles décrites ci-dessus ou (ii) désactiver directement les ROS. Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piégeurs de radicaux libres **[49]**.

Autrement dit, Un antioxydant est une molécule capable de ralentir ou d'empêcher l'oxydation d'autres substances chimiques. C'est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation dans notre corps et régule la formation des radicaux libres en protégeant nos

cellules contre le vieillissement accéléré. L'oxydation est une réaction d'oxydoréduction qui transfère les électrons d'une substance à un agent oxydant. Les réactions d'oxydation peuvent donner des radicaux libres qui entraînent des chaînes de réactions conduisant à la destruction des cellules. Les antioxydants sont capables de stopper ces chaînes de réaction en captant les radicaux libres intermédiaires et en devenant eux mêmes des oxydants. Les antioxydants sont souvent des agents réducteurs comme les thiols et les poly phénols **[50]**.

III.2.5. Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode du DPPH:

III.2.5.1. Principe de la méthode :

Réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant. La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits. Le DPPH est initialement violé, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm. Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu éthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non couteux (figure III.1) **[51]**.

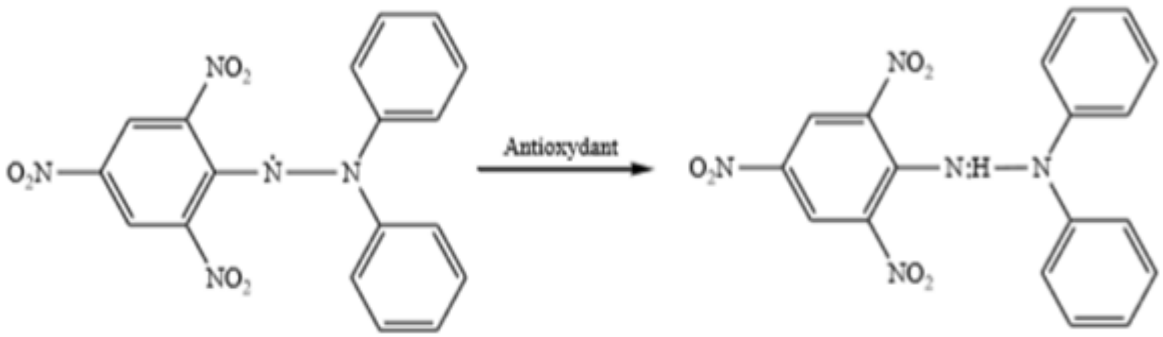


Figure III.1: Réduction du radical DPPH

III.2.5.2. Le radical stable DPPH :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517nm, L'intensité de la

couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons **[52]**.

Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (figure 3.2). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire **[51]**.

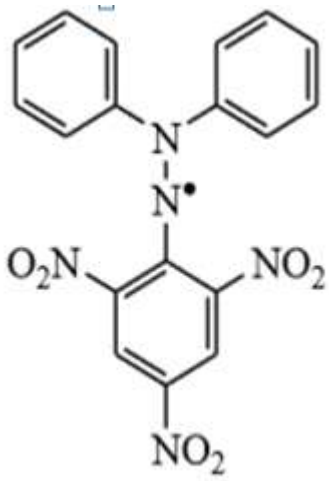


Figure III.2: Structure chimique du radical lire DPPH.

III.3. Activité antibactérienne :

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d`origine bactérienne.

Des études récentes ont prouve que les huiles essentielles ont un spectre d`action très large puissent qu`elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries **[53]**.

III.3.1. Technique de dilution sur milieu gélosé :

Cette technique consiste à déposer des suspensions bactériennes calibrées sur des milieux contenant des concentrations croissantes d'antibiotique **[54]**.

Elle a été effectuée par Baron et Bruckner 1984 pour déterminer susceptibilité des bactéries anaérobique à l'aide de la dilution d'agar. Dans cette méthode, la substance d'essai est incorporée à des concentrations connues dans la gélose et, une fois définies, des bactéries sont appliquées sur sa surface. De cette façon, un grand nombre de bactéries peuvent être

criblées dans une seule opération de dosage. Les boites sont incubés pendant 24 h ou plus et la croissance des bactéries sur le mélange extrait / agar est marquée soit présente ou absente. Les points finaux des CMI sont enregistrés comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance dans des conditions d'incubation appropriées **[55]**.

III.3.2. Technique de diffusion sur discs :

La diffusion sur disque par la méthode de Kirby-Bauer est une technique normalisée (figure III.3) de test des agents pathogènes à croissance rapide. En bref, un inoculum normalisé (c'est-à-dire qu'une suspension directe de colonies produisant un inoculum normalisé est acceptable) est essuyé à la surface de la gélose MH Diamètre de la plaque de 150 mm. Étant donné que la reproductibilité dépend de la phase de croissance du log des organismes, des sous-cultures fraîches sont utilisées. Des disques de papier filtre imprégnés d'une concentration normalisée d'agent antimicrobien sont placés à la surface et la taille de la zone d'inhibition autour du disque est mesurée après une incubation d'une nuit. Les plages de temps d'incubation spécifiques sont décrites dans les documents du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) **[56]**.

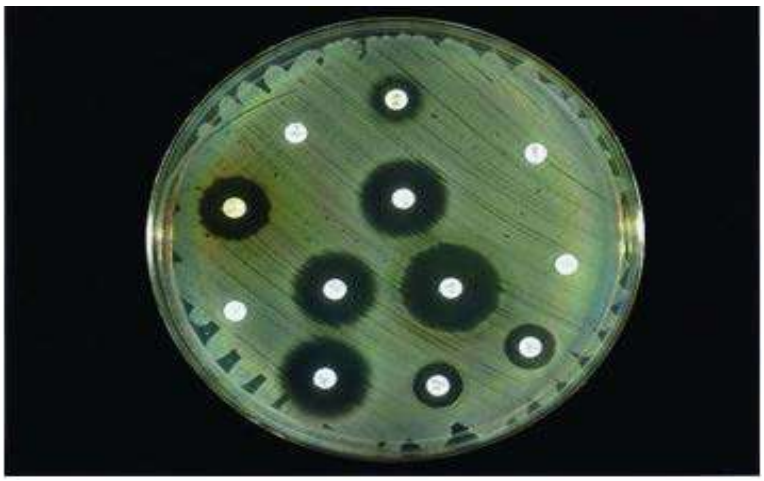


Figure III.3: photo représentant la technique de diffusion sur discs **[56]**.

III.4. Activité cicatrisante :

La peau est un organe complexe recouvrant le corps en entier, elle est constituée de trois couches principales dont les cellules interagissent ensemble afin d'assurer ses différentes fonctions **[57]**.

La partie superficielle, l'épiderme, est mince et composée d'un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé (Figure III.4). Elle est attachée à une couche interne plus épaisse, formée de tissu conjonctif, le derme. La dernière couche, l'hypoderme, est la couche sous-cutanée, composée de tissus conjonctifs auréolaires et adipeux. Les fibres du derme s'y rattachent et fixent ainsi la peau puisque l'hypoderme est lui-même fermement attaché aux tissus et organes sous-jacents **[57]**.

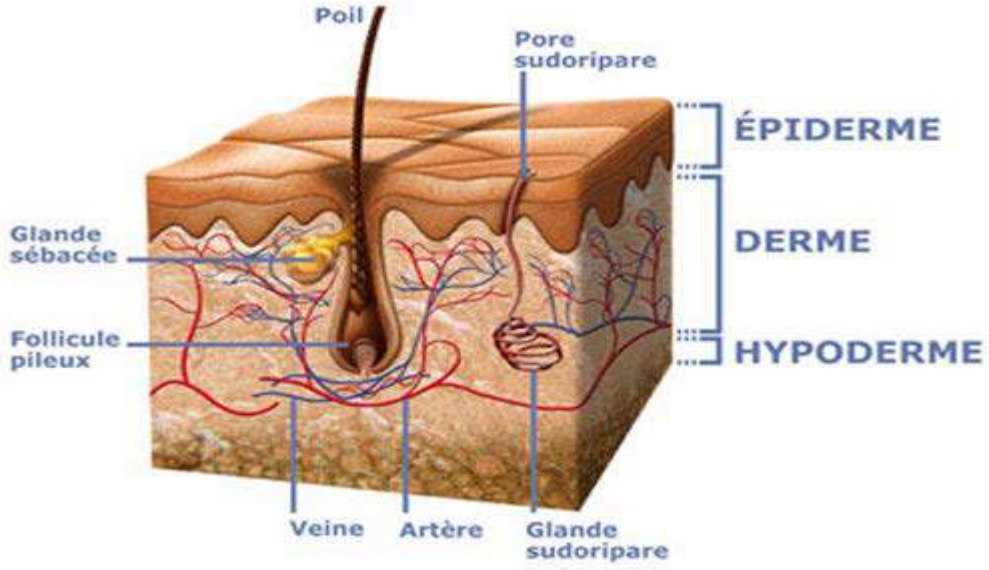


Figure III.4: Structure de la peau humaine.

Une perturbation de l'intégrité de la peau peut survenir dans plusieurs contextes. La peau peut subir des dommages lors de chirurgies, de brûlures, de radiations, de coupures, de déchirures…etc (tableau III.3). L'ampleur des dommages infligés à la peau à la suite d'une blessure dépend de la profondeur de celle-ci, qui est classifiée en trois degrés (plaie du premier, second et troisième degré), de son étendue (la superficie endommagée), et de la nature de l'agression. Ces trois paramètres influencent le choix du traitement puisque le déroulement de la guérison en est affecté **[57]**.

III.4.1. Profondeur de la plaie :

Tableau III.3: Profondeur, Caractéristique de la plaie **[58]**.

Profondeur	Caractéristiques
1ème degré	• Atteinte de l'épiderme seul. • Rougeur et douleur importante.

	• Exemple type «coup de soleil ».
2ème degré superficiel	• Atteinte de l'épiderme et du derme superficiel. • Vésicules ou phlyctènes plus au moins importantes, en général non rompues (du moins les premiers jours). • En cas de rupture de phlyctènes : fond de plaie rouge humide et très sensible au toucher. • Douleurs, les poils tiennent bien.
2ème degré profond	• Atteinte jusqu'au derme profond. • Phlyctène rompue. • Fond de la plaie sec, rosé ou blanc, les poils ne tiennent plus. • Peu ou pas de douleur. • Peu ou pas de saignement lors de piqûre avec une aiguille fine.
3ème degré	• Atteinte de toutes les couches de la peau et même parfois les structures sous jacentes. • Peau cartonnée, blanche, sèche et ou carbonisée. Pas de douleur ou de saignement.

La cicatrisation est l'ensemble des phénomènes physiologiques naturels aboutissant à partir d'une plaie à la restauration de la structure cutanée. De cette manière les tissus humains et animaux sont capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leurs sont propres **[59]**.

Lorsqu'elles ne sont ni trop profondes, ni trop étendues, la plupart des plaies ou brûlures cutanées cicatrisent rapidement en quelques semaines. On distingue 3 phases successives: la phase inflammatoire et formation du caillot (0 à 3 jours), la phase proliférative ou formation de tissu (3 à 12 jours) et la phase de remodelage tissulaire **[59]**.

III.4.2. Les étapes de la cicatrisation :

III.4.2.1. Phase inflammation et formation de caillot :

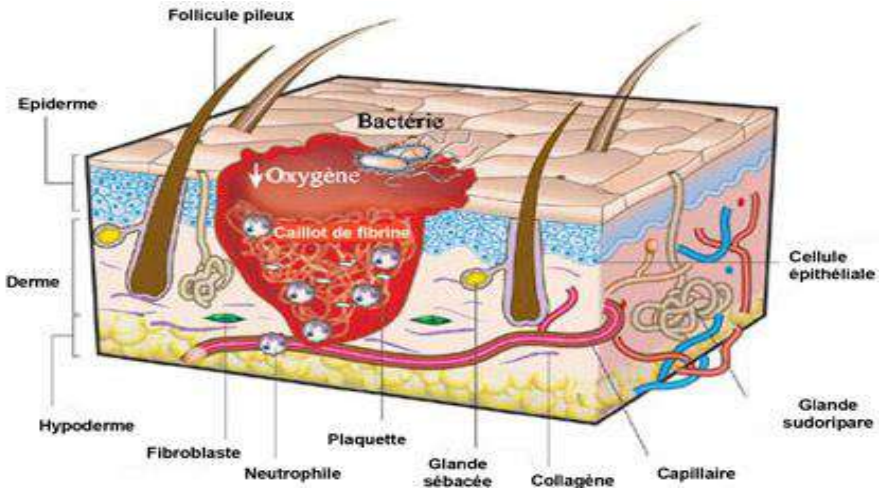


Figure III.5: l'inflammation et la formation de caillot.

Tout de suite après la constitution de la plaie, les vaisseaux sanguins locaux se dilatent provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire et une fuite de plasma (figure III.5). Cette vasodilatation est suivie peu après d'une vasoconstriction puis de la formation de caillots au fond de la plaie grâce notamment à l'action des plaquettes, ce qui limite la perte de sang. Plus tard, attirés par des substances chimiotactiques, des cellules pro-inflammatoires (leucocytes et macrophages) arrivent des tissus avoisinants pour nettoyer la plaie, éliminant tissus morts, germes et bactéries **[60]**.

III.4.2.2. Phase de proférations :

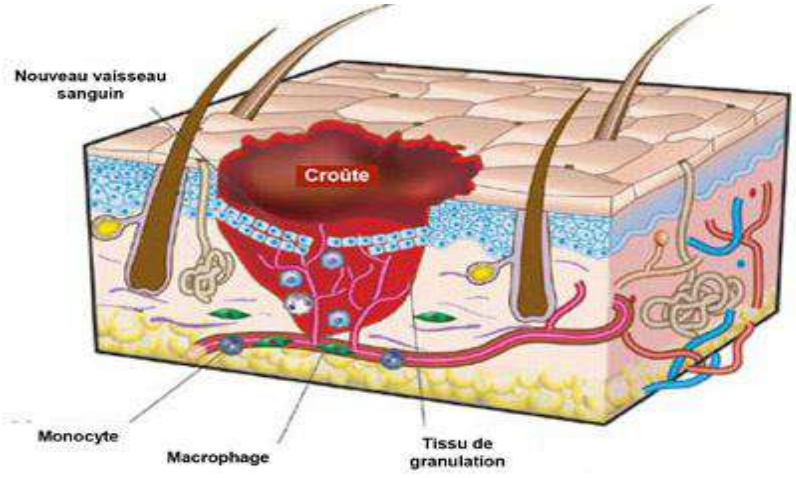


Figure III.6: Phase de proférations.

Au bout de trois jours, le caillot fibrino-plaquettaire se rétracte laissant apparaître le tissu conjonctif sous-jacent qui prend le nom de tissu de granulation, du fait de la présence des granulations roses qui apparaissent à la surface du nouveau derme et qui correspondent aux nombreux capillaires qui l'envahissent (figure III.6). Cette néo-vascularisation est due à l'angiogénèse, qui est déclenchée et entretenue principalement par le VEGF et le β-FGF, sécrétés par les cellules endothéliales lésées et les macrophages.

Outre les vaisseaux sanguins, le tissu de granulation contient principalement des macrophages et des fibroblastes qui sécrètent les constituantes de la MEC et en particulier le collagène **[60]**.

III.4.2.3. Phase de remodelage :

La phase de remodelage débute après fermeture de la plaie, par une régression du tissu granuleux qui peut persister pendant 2 ans. La contraction des plaies est achevée vers le 21ém jour associé à un contenu maximal en collagène (figure III.7). De même que la résistance de la cicatrice à l'étirement n'atteint qu'environ 15% de celle de la peau normale. Enfin cette résistance est augmentée de façon considérable jusqu'à 70%, grâce au remodelage. Initialement nécessaires à la migration et à la prolifération cellulaire, la fibronectine et l'acide hyaluronique sont progressivement lysés et remplacés par le collagène, les fibres élastiques et les glycoaminoglycanes constituant une matrice plus résistante aux forces de traction **[60]**.

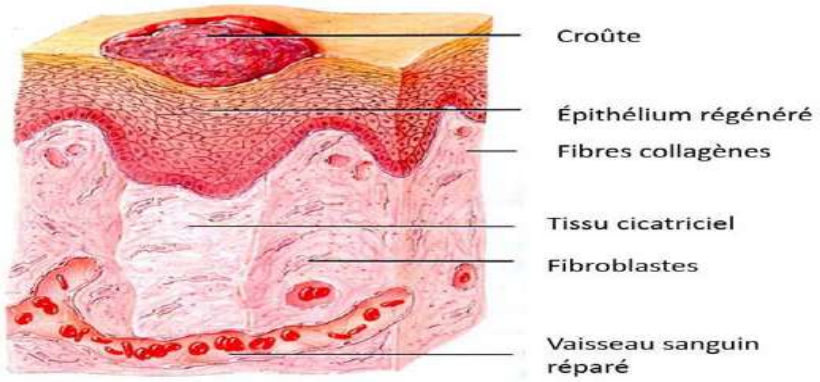


Figure III.7: Phase de remodelage**.**

III.5. Conclusion :

Dans ce chapitre, on s`est intéressé beaucoup plus à l'activité antioxydant, antibactérienne et cicatrisante des extraits aqueux et de l'huile essentielle de *carthamus caeruleus L*. Nous avons cité et expliqué quelques étapes pour chaque activité d'entre eux.

CHAPITRE IV :

Matériels et méthodes

IV. 1. Introduction :

Nous présentons dans cette partie l'enquête ethnobotanique réalisée au laboratoire de microbiologie dans le complexe antibiotical de l'entreprise de fabrication des produits pharmaceutiques SAIDAL (Médéa) et au laboratoire de recherche au sein de l'université de Yahia Farés (Pole) (Médéa). Ce chapitre consiste à présenter les différents procédés exécutés sur les divers organes de notre matériel végétal, afin de connaitre leurs activités biologique.

IV.2. Méthodologie :

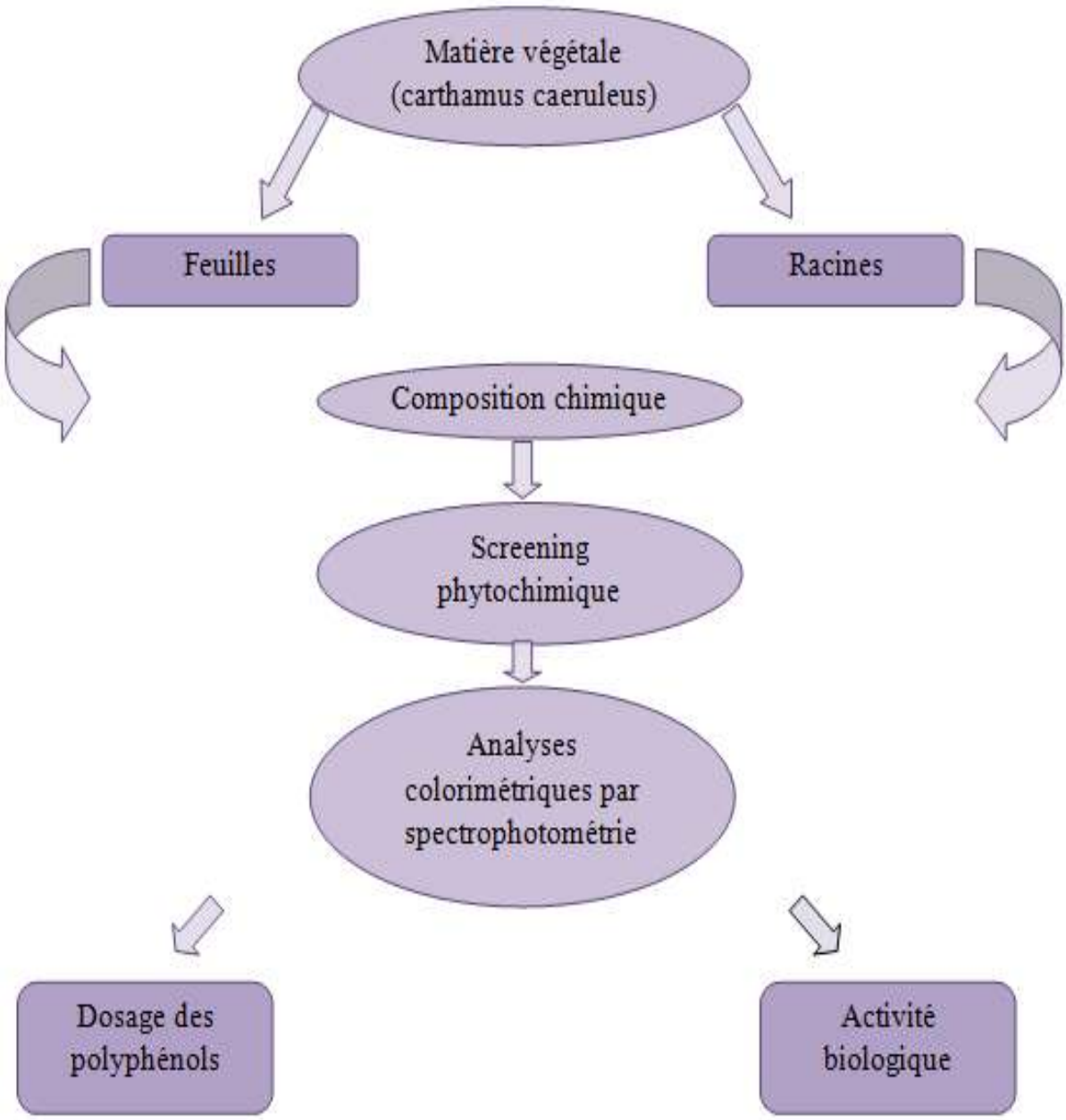
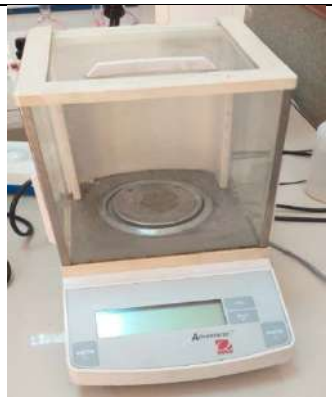


Figure IV.1 : Schéma de la méthodologie suivis.

IV.3. Matériel utilisée :

		
Balance	Vortex	Etuve
		
Spectrophotomètre UV	Microscope	Stérilisateur
		
Spectrophotomètre FTIR	Four	

IV.4. Matière végétale :

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est une plante, sous le nom de *carthamus caeruleus* de genre carthamus,récolté au mois d'Avril (2019), dans la régiond'El Omaria Médéa.



Figure IV.2 : Fleure de carthamus caeruleus.

IV.5. Observation microscopique :

Les feuilles et les racines de la plante étudiée ont été coupées transversalement (coupe histologique) pour les faire passer au microscope, pour obtenir une vue microscopique clair des vésicules d'HE contenues dans celles-ci.

Mode opératoire :

- Prendre une lame de verre très propre.
- Placer une goutte de l'eau distillée au centre de la lame.
- Déposer le matériel biologique dans l'eau distillée.
- Prendre une lamelle de verre, poser un coté de la lamelle contre la goutte, laisser descendre la lamelle lentement sur la lame en évitant la formation de bulles d'air.

La préparation est réussie s'il n'y a pas de liquide qui déborde de la lamelle et s'il n'y a pas de bulles d'air.



Figure IV. 3 : Observation microscopique des coupes transversales.

IV.6. Préparation du matériel végétal :

La plante étudiée et fraichement récoltée, est rincée ensuite séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant deux semaines. Après séchage, les racines et les feuilles de la plante ont été séparés pour ensuite les broyés à l'aide d'un mixer afin d'obtenir une poudre.

IV.7. méthodes d`analyse :

IV.7.1. Détermination de la matière sèche :

A. Principe :

La matière sèche s`agit d`un résidu sec résultant de la déshydratation (élimination de l`eau) d`un produit. Elle est déterminée par séchage à l`étuve de l`échantillon par l`application de la méthode décrite ci-après.

B. Protocole :

- Mettre une prise d`essai dans un creuset en porcelaine sèche et taré (tare t), peser la masse (m) de cet échantillon.
- Renfermer l`échantillon dans l`étuve à105°C, jusqu`à l`obtention d`une masse constante de celui-ci.
- Laisser l`échantillon se refroidir dans un dessiccateur et peser l`ensemble de masse (M_0).
- La teneur en MS est donnée par la relation suivante :

$$\%MS = \frac{100 \times (M_0 - mt)}{m} \qquad \textbf{Eq (4)}$$

Tel que :

- **m :** masse d`échantillon initiale.
- **M_0 :** masse de la matière sèche plus la tare.
- **mt :**la tare.
- **MS% :** pourcentage de la matière sèche **[11]**.

IV.7.2. Détermination de la matière minérale :

A. Principe :

Tous matériaux ne contient pas des matières organiques est dit minéral. Donc, afin d'obtenir la matière minérale il faut éliminer la matière organique complètement de

l'échantillon concerné et ça se fait par calcination de cet échantillon dans un four, en suivant le protocole ci-dessous.

B. Protocole :

- Faire entrer l'échantillon sec obtenu dans le four à 550°C pendant 6 heures.
- Mettre l'échantillon dans un dessiccateur pour se refroidir et peser l'ensemble de masse (M_M).
- Le pourcentage de la matière minérale correspond au rapport du poids entre la matière minérale (M_M) et la matière sèche (M_0) en appliquant la formule :

$$\%MM = \frac{100 \times (M_M - t)}{(M_0 - t)} \qquad \text{Eq (5)}$$

Tel que:

- **M_M :**masse de la matière minérale plus la tare.
- **M_0:** masse de la matière sèche plus la tare.
- **t :** la tare.
- **MM%:** pourcentage de la matière minérale **[11]**.

IV.7.3. Cendres solubles et insolubles dans l'eau :

A. Principe :

Les cendres sont des résidus de la combustion, de l'incinération de diverses matières organiques et minérales. Elles peuvent être utiles dans certains aliments, comme par exemple ; l'évaluation du contenu en fruits des confitures.

B. Protocole :

- Dissoudre la partie soluble des cendres totales dans un erlemeyer contenant de l'eau chaude.
- Filtrer le contenu sur un papier filtre.
- Incinérer les résidus insolubles sur le papier filtre, afin de bruler le papier.
- Peser les cendres insolubles.
- Le pourcentage des cendres solubles est déterminé en utilisant la formule :

$$\%\text{Cendres soluble} = \frac{M_{MS} - M_{Mi}}{M_{MS}} \times 100 \qquad \text{Eq (6)}$$

Tel que :

- **M_{MS}:** masse des cendres solubles.
- **M_{Mi}:**masse des cendres insolubles.
- **%Cendres soluble :** pourcentage des cendres solubles **[11]**.

IV.7.4. Détermination de la matière organique :

La matière organique correspond à la différence entre la matière sèche et la masse des cendres (matière minérale). Elle est déterminée par la formule **[11]**.

$$\%MO = 100 - \%M_M \qquad \text{Eq (7)}$$

Tel que :

- **%MO :** pourcentage de la matière organique.

IV.7.5. Screening phytochimique :

L'objectif de la réalisation des tests phytochimiques est de détecter les différentes familles des métabolites secondaires existant dans les divers organes de la plante, par des réactions quantitatives, caractérisé par la formation d'une coloration correspondante à la réaction.

Préparation d'infusé :

L'infusé est préparé à partir de 5g de poudre (feuilles ou racines) dans 100 ml d'eau bouillant dans un erlenmeyer. Après 15 min, le contenu est filtré pour avoir 100 ml d'infusé à 5% **[11]**.



Figure IV.4 : Préparation de l'infusé.

a- Détection de composés phénoliques et de tanins :

Quelques gouttes de chlorure de fer (III) (FeCl 3) ont été ajoutées à 2 ml de l'infusé préparé auparavant. L'apparition d'une coloration bleu-vert ou noir indique la présence de phénols et de tanins dans l'échantillon étudié **[11]**

b- Détection de flavonoïdes :

Dans un tube à essai contenant une quantité d'infusé, quelques gouttes de solution de l'hydroxyde de sodium (NaOH). La formation d'une coloration jaune intense, qui devient incolore après l'addition d'un acide dilué, révèle la présence de flavonoïdes **[11]**.

c- Détection d'alcaloïdes :

Solution à analyser :

1g de poudre (racines ou feuilles) est ajoutée à 100 ml d'éthanol, agitée ensuite filtrée pour avoir 100 ml de solution à analyser **[11]**.

Protocole :

La détection des alcaloïdes consiste à traiter la solution à analyser par une autre solution formée par 0.16 g d'iodure de potassium (KI) et 0.015 g de diiode (I_2) dans 10 ml d'eau. Une coloration rouge-brune indique que les alcaloïdes sont présents dans l'échantillon à tester.

d- Saponosides :

Solution à analyser :

Elle est composée d' 1 g de poudre (racines ou feuilles) dans 100 ml d'eau bouillon. Après 15 min, la solution est filtrée pour donner un décocté de 1% **[11]**.

Protocole :

- 1,2,…. ,10 ml du décocté à 1% ont été déversés successivement dans 10 tubes à essais.
- Le volume des 9 premiers tubes a été ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée.
- Les tubes à essai sont agités dans le sens de la longueur pendant 15 secondes, puis laissés au repos pendant 15 min.
- La hauteur de la mousse dans chaque tube est mesurée.

Remarque : le tube à essai dans lequel la hauteur de la mousse est de 1cm indique la valeur de l'indice de mousse :

$$\textbf{Indice de mousse} = 1000/N \qquad \textbf{Eq (8)}$$

N : numéro du tube dans lequel la hauteur de la mousse atteint 1cm **[11]**.

IV.8. Extraction et préparation des extraits :

IV.8.1. Extrait aqueux :

L'extrait aqueux de *Carthamus caeruleus L* est obtenu à partir de 10 g de poudre (racines ou feuilles) que nous chauffons à 45°C dans 100 ml d'eau distillée, sous agitation pendant 24 heures. La solution est ensuite filtrée sur un papier filtre, puis séchée à l'étuve à 40°C, jusqu'à l'obtention d'un extrait qui sera conservé jusqu'à l'utilisation ultérieur. (L'extraction est faite deux fois).

IV.8.2. extraction d'huile essentielle par hydrodistillation:

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, et précieuses. Parmi les différents techniques d'extraction des huiles essentielles on site : l'hydrodistillation **[61]**.

A- Principe :

La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité **[61]**.

B- Protocole :

- 60g de poudre (racines) est Immergée dans un ballon contenant 600ml d'eau distillée.
- Le ballon est placé sur une source de chaleur.
- Le tout est porté à ébullition pendant 4 heures.
- Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité**.**

IV.8.3. Calcul du rendement :

Le rendement est le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la plante à traiter. Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\%R = \frac{m}{M} \times 100 \qquad \text{Eq (9)}$$

Tels que :

R:le rendement en %.

m: la masse après séchage.

M: la masse de la plante initiale.

IV.9. Caractérisation physico-chimique de l'HE :

IV.9. 1. Spectrophotométrie infrarouge (IR) :

La spectroscopie infrarouge (FTIR) est une méthode d'analyse physico-chimique qui sonde les liaisons entre les noyaux atomiques et leurs arrangements. Elle permet d'accéder directement à l'information moléculaire et à la nature chimique du matériau analysé.

Pour le but de révéler les groupements fonctionnels qui compose l'HE extraite précédemment, une goutte de celui-cia été déposée sur la zone de test de l'appareil de l'IR.

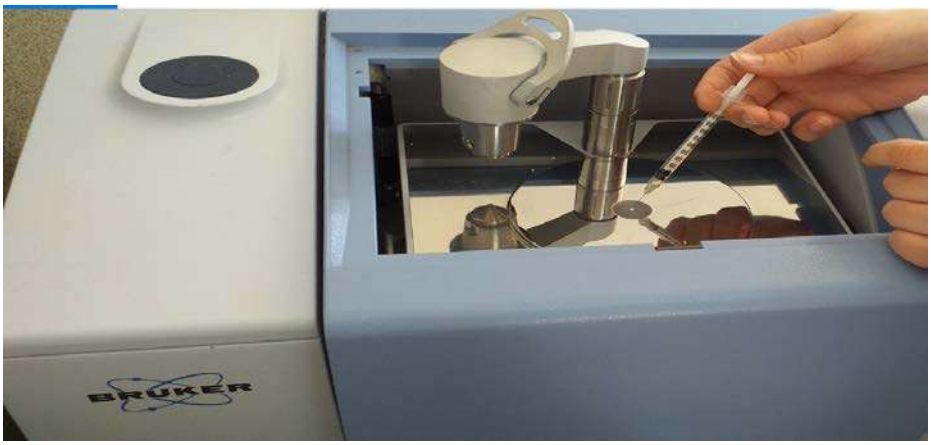


Figure IV.5 : Test spectrophotométrie infrarouge.

IV.9. 2. Détermination des constantes physico chimiques :

IV.9. 2.1. Indice d'acide :

L'indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse en mg nécessaire pour neutraliser son acidité libre. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps **[62]**.

Mode opératoire :

L'indice d'acide des huiles essentielles revient à neutraliser les acides libres de celles-ci par l'hydroxyde de potassium (KOH), en appliquant le protocole suivant :

- Dans un erlenmeyer, une masse de 0.4g d'HE a été introduite avec 40 ml d'éthanol (96%), 40 ml de cyclohexane et2 gouttes de phénolphtaléine ont été successivement versés.
- La solution a été agitée avec un agitateur magnétique jusqu'à dissolution.
- Ensuite, elle a été dosée avec une solution de potasse alcoolique à 0.01 M jusqu'à l'apparition d'une coloration rose persistante.

Le calcul de la valeur de l'indice d'acide est comme suit :

$$I_A = (m_b / m_h) \quad \text{avec :} \quad m_b = CVM \qquad \text{Eq (10,11)}$$

Tel que :

- **mh :** masse de l'huile ; **mb :** masse du potasse ; **C :** concentration du KOH ;
- **V :** volume de KOH au point équivalent ; **M :** masse molaire du KOH. **[62]**

IV.9. 2.2. Indice de saponification :

Il correspond à la masse de potasse en mg nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras combinés dans un gramme de corps gras **[62]**.

Mode opératoire :

Comme corps gras étant insolubles dans l'eau, il faut les dissoudre dans un solvant organique approprié.

- Préparer une solution de 200 mg d'HE et 20 ml d'un solvant composé par 10 ml d'éthanol et 10 ml de cyclohexane, puis Agiter pour dissoudre le corps gras
- dans un bécher, 10 ml de la solution préparée précédemment a été introduite avec 25ml de potasse alcoolique de concentration (0.5 M). ensuite, le bécher a été mis dans au bain marie bouillant pendant 45 à 60 minutes.
- 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine ont été ajoutées au bécher, avant de doser la solution par l'acide chlorhydrique à une concentration de 0.025 M en agitant jusqu'à la disparition de la coloration de la phénolphtaléine. Effectuer dans les mêmes conditions un essai à blanc **[62]**.

$$I = \frac{(V_T - V_E) \times C_{HCl} \times M_{KOH}}{m_h} \qquad \text{Eq (12)}$$

Tel que:

- V_T : volume à blanc **;** V_E **:** volume de l'échantillon **;** C_{HCl} **:** concentration d' HCl.
- M_{KOH} **:** masse molaire du KOH ; m_h **:** masse de l'huile.

IV.9. 2.3. Indice d'estérification :

Il correspond à la quantité en mg de KOH nécessaire pour saponifier 1g d'huile dépourvue d'acide gras. Il est calculé par la formule suivante **[62]** :

$$I_E = I_S - I_A \qquad \text{Eq (13)}$$

Avec :

I_E : indice d'estérification ; **I_S :** indice de saponification ; **I_A :** indice d'acide.

IV.9. 2.4. Indice de réfraction :

La mesure de l'indice de réfraction des huiles essentielles a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre par lecture directe.

Mode opératoire :

- Après faire nettoyer le refractomètre et le diriger vers la lumière, 2 ou 3 gouttes d'huile essentielle ont été placées au milieu du prisme.
- En regardant dans l'oculaire, le réglage a été ajusté en tournant les boutons de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule.
- Et enfin la valeur de l'indice de réfraction a été prise par lecture directe.

IV.9. 2.5. La densité relative :

La densité relative d'une substance est une grandeur physique qui correspond au rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau à la même température. On la mesure à l'aide d'une balance analytique.

$$d = \frac{\rho huile}{\rho eau} \qquad \text{Eq (14)}$$

Avec :

- $\rho eau = \frac{m_e}{V_e}$ et $huile = \frac{m}{V}$
- **m_e :** Masse de l'eau; **V_e :** Volume d'eau ; **ρ_{eau} :** Masse volumique de l'eau ;
- **m_h :** Masse de l'huile; **V_h** : Volume d'huile ; **ρ_{huile} :** Masse volumique de l'huile. **[62].**

IV.10. Détermination quantitative des métabolites secondaires :

IV.10.1. spectrophotométrie :

La spectrophotométrie UV-visible est une technique analytique quantitative fondée sur l'étude du changement de l'intensité de la lumière traversant une solution colorée, dans un domaine d'application comprise entre 200 et 800 nm, en effet, pour pouvoir déterminer les concentrations des substances absorbantes **[63]**. Autrement dit, elle repose sur la transition d'électrons de valence qui passent d'un état fondamental à un état excité après absorption d'un photon dans l'UV-visible. Cette transition s'accompagne de changements de niveaux

rotationnels et vibrationnels. Elle requiert une énergie assez forte qui correspond aux longueurs d'onde UV-visible.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier **[64]**.

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité (I) delà lumière transmise est donc inférieure à I_0. L'absorbance (A) de la solution est définie comme suit :

$$A = \log_{10}\left(\frac{I0}{I}\right) \quad \text{ou} \quad A = -\log_{10} T \qquad \textbf{Eq (15)}$$

Avec : $T = \frac{I}{I_0}$ **Eq (16)**

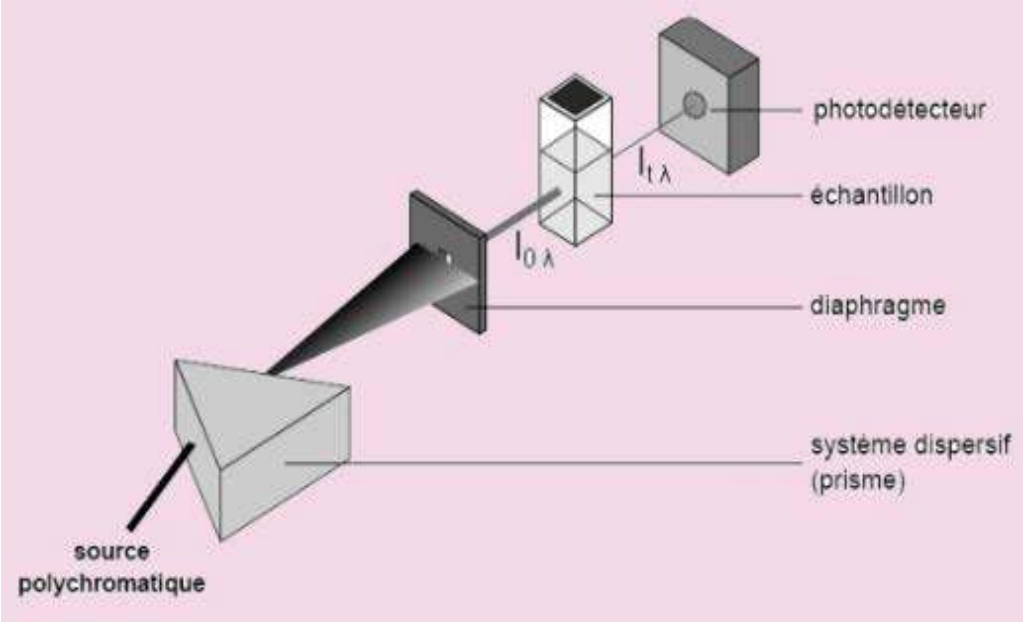


Figure IV.6 : Principe du spectrophotomètre UV-visible.

IV.10.2. Analyse quantitatives :

IV.10.2.1.Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols ont été déterminés spectrophotométriquement par la méthode de Folin-Ciocalteu.

A- Principe :

Le dosage des polyphénols est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait **[65]**, en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux **[66]**.

Ce dosagea été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux de type (Cintra 303), La technique à double faisceaux nous a aidé à éliminer l'absorbance du blanc et donner directement la densité optique de l'échantillon **[66]**.

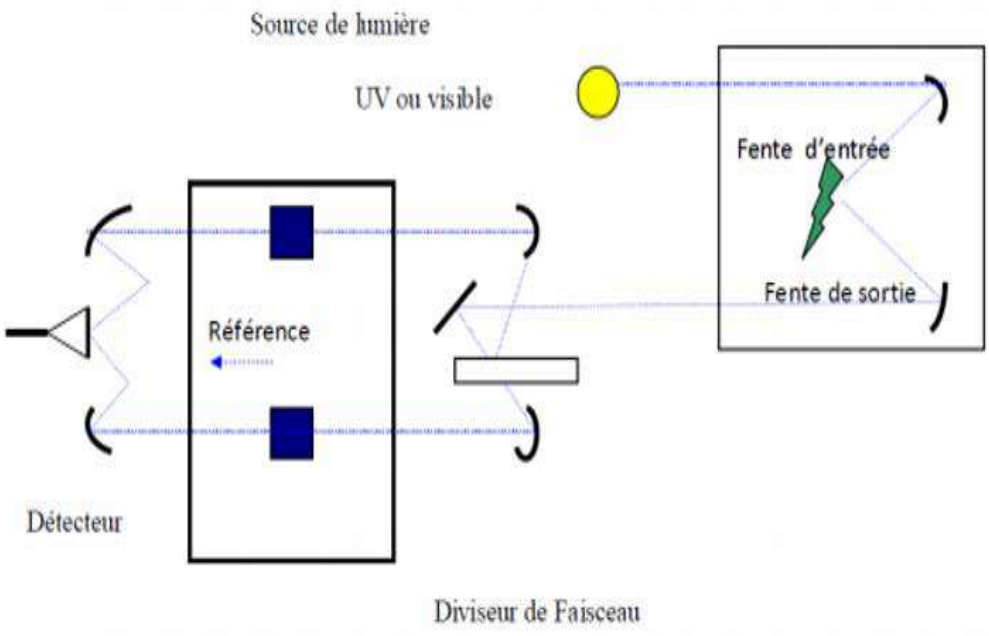


Figure IV.7 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau.

B- Mode opératoire :

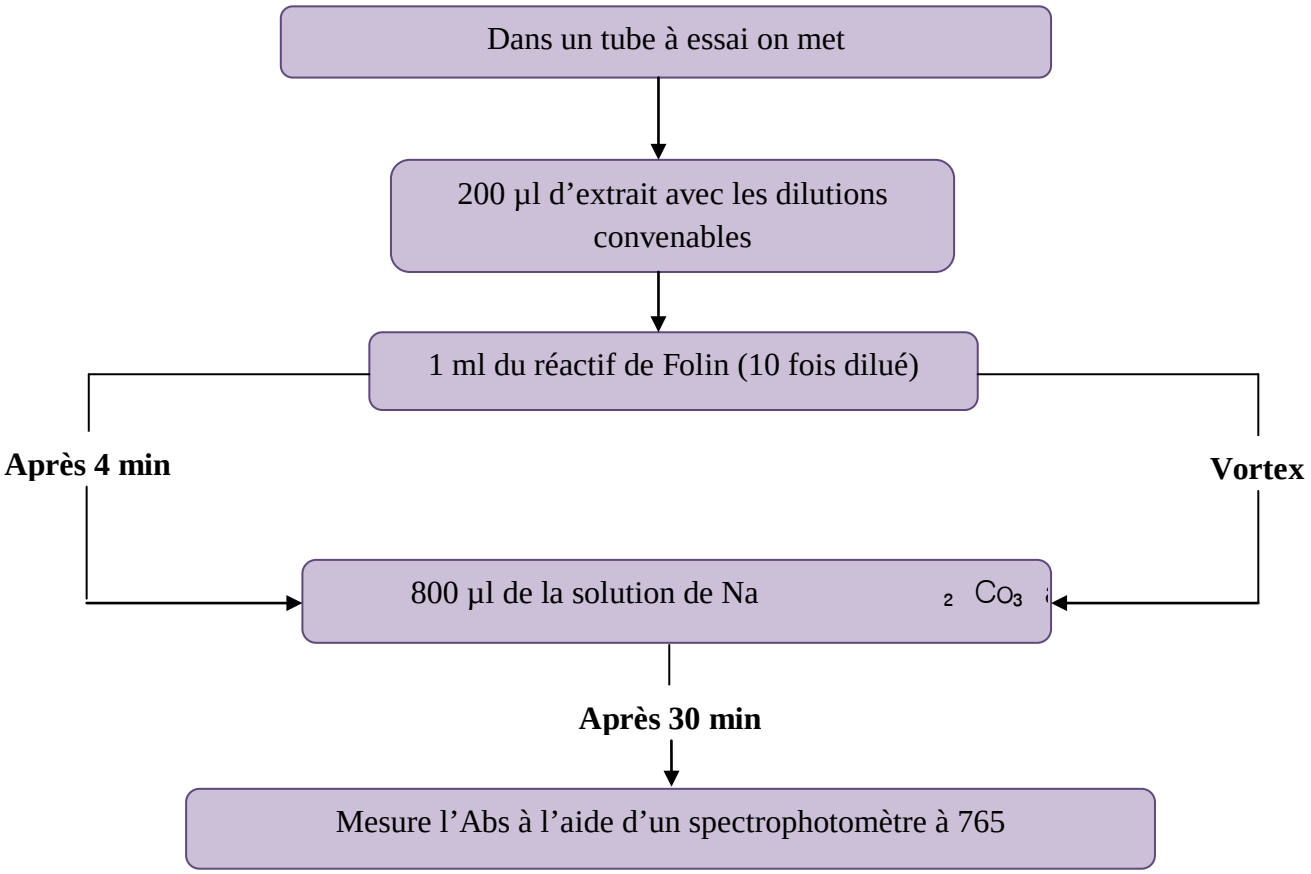


Figure IV.8 : Protocole de dosage des polyphénols **[11]**.

IV.11. Les activités biologique :

IV.11.1. Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode au DPPH :

L'activité antioxydant des différents extraits de la plante vis-à-vis du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryhydrozyl)a été évaluée spéctrophotométriquement.

A- Principe :

La méthode de DPPH utilisée pour mesurer le pouvoir antioxydant consiste à piéger les radicaux libres (DPPH-) de couleur violette foncée d'une absorbance de 517 nm qui devient incolore ou jaune pâle à la neutralisation.

B- Mode opératoire :

❖ **Préparation de la solution de DPPH :**

La solution éthanolique de DPPH a été préparée en mettant 3mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol.

❖ **Préparation de solution à tester à différentes concentration :**

Un volume de 50µl de chacune des solutions éthanoliques des extraits testées (HE, racines, feuilles) à différentes concentrations a été ajouté à 1,95 ml de la solution éthanolique du DPPH fraichement préparée. En ce qui concerne le témoin négatif, ce dernier a été préparé en parallèle en mélangeant 50 µl d'éthanol avec 1,95 ml d'une solution éthanolique de DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante la lecture des absorbances a été effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le pourcentage de l'activité antioxydant (**AA%)** est donnée par la formule suivante :

$$\mathbf{AA\%} = \frac{AbsSC - AbsEssai}{AbsSC} \times 100 \qquad \mathbf{Eq\ (17)}$$

Tel que :

- **AA :** l'activité antioxydant.
- **Abs :** absorbance à longueur d'onde de 517nm **[62]**.

C- Calcul des IC50:

Pour chaque extrait ou standard de référence, une courbe de régression linéaire (y = ax+b) est établie afin de calculer l'IC50 qui permettra la caractérisation du pouvoir antioxydant des extraits. L'IC50 étant la concentration de l'extrait ou du standard qui permet la réduction de 50% de DPPH. Une faible valeur de l'IC50 indique une forte activité antioxydant **[25]**.

IV.11.2. Evaluation de l'activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode des disques de diffusion sur différentes souches bactériennes. Elle a pour but l'étude qualitative de l'effet antimicrobien de la plante et ses organes, et comparaison entre son effet antibactérien et celui des autres antibiotiques fournis par l'entreprise de fabrication des produits pharmaceutiques SAIDAL

(Médéa), la solution injectable de l'antibiotique Gentamine (GENT) et Amoxicilline (AMOXY).

A- Principe :

Cette méthode consiste à distribuer dans des boites pétries contenant un milieu de culture mélangé une quantité de germes, des disques absorbants stériles émergés dans l'échantillon à tester. Après l'incubation pendant 16 à 24 heures, la lecture des résultats est faite par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenus pour chaque souche.

B- Protocole :

1- Les souches du test :

Tableau IV.1 : Les souches utilisées dans le test de l'activité antibactérienne.

Souche	Code	Genre	Coloration de gram	Milieu de culture
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	Bactérie	-	CAB
Candidas albicans	ATCC 10231	levure		SAB
Eschirichia coli	ATCC 8739	Bactérie	-	SA
Bacillus subtilis	ATCC 6633	Bactérie	+	SA
Salmonella typhimuium	ATCC 14028	Bactérie	-	SA
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	Bactérie	+	SA
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	Bactérie	+	SA
Saccharomyces cerevisaie	ATCC 9763	levure		SAB

2- Préparation des milieu de culture :

40 g de poudre de la gélose a été introduite dans 1 L d'eau distillée, la solution est posé sur une source de chaleur jusqu'à bouillir. La solution ensuite a été coulée dans des flacons stériles, puis ces derniers ont été déposés dans un stérilisateur pendant 1 heure et demi.



Figure IV.9 : Les étapes de la préparation des milieux de culture.

3- Application du test :

- Couler 1 ml de la suspension bactérie dans des boites de pétri tout près d'une flamme.
- Ajouter une quantité de gélose nutritive équivalente à 11 ml, puis agiter prudemment jusqu'à que le mélange devient homogène.
- Laisser les boites entrouvertes devant la flamme jusqu'à complète solidification.
- S'assurer que la surface de la gélose est bien séchée.
- Déposer à l'aide d'une pince stérile les disques (quatre disques par boite), imprégnés d'extrait végétal, sur la surface de la gélose.
- Placer les boites à l'étuve, à la température optimale de croissance du germe à étudier (35°C) pendent 16 à 24 h. Les boites doivent être placées couvercle en bas.
- Après l'incubation, la lecture des résultats est faite par mesure des diamètres des zones d'inhibition (la zone clair autour du disque) obtenus pour chaque souche en (mm).plus le diamètre de la zone est grand plus la souche est résistante à reproduction de bactéries.



Figure IV.10 : Application du test.

IV.11.3. Evaluation de l'activité cicatrisante :

Cette évaluation est réalisée in vitro au sein de laboratoire du groupe SAIDAL (Médéa), dans le but de vérifier le pouvoir cicatrisant de *carthamus caeruleus L* et comparer son effet avec un autre produit (vaseline), sur des lapins albinos.

A- Pour l'incision :

Nous avons utilisé 5 lapins répartis en 5 lots (un lapin par lots).

Tableau IV.2 : Les Echantillons appliqué pour l'incision.

Lapin	Echantillon appliqué
Lapin (01)	Crème (1) à base de *carthamus caeruleus L*
Lapin(02)	Crème (2)
Lapin(03)	Pommade pharmaceutique (madécassol)
Lapin(04)	Vaseline
Lapin(05)	Témoin

Préparation de crèmes :

Crèmes (1) : la crème a été préparée en dissolvant 30g de poudre de rhizomes dans 150ml d'eau distillée, puis chauffée à reflux pendant 2 heures. Ensuite le contenu a été laissé se refroidir pour qu'il se solidifie (Formation d'une crème).

Crèmes (2) : la 2ème crème a été réalisée en mélangeant :

Tableau IV.3 : Les doses de la crème 2.

Produit	Dose (ml)
Vaseline	3
Huile de vaseline	3
HE	0.4

Note : les deux crèmes ont été réservées dans des boites de pétri stériles afin d'éviter tout contamination extérieure.

1. Préparation des lapins :

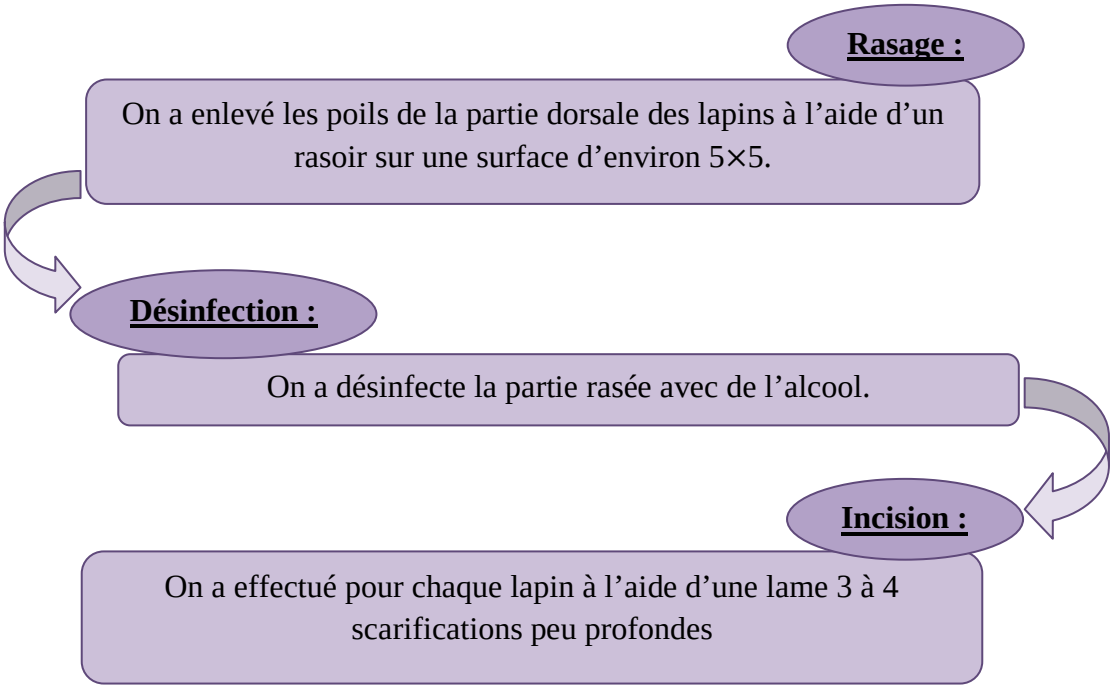


Figure IV.11 : Préparation des lapins.



Figure IV.12 : Rasage.



Figure IV.13 : Application des scarifications.

B- <u>Pour les brulure :</u>

5 lapins répartis ont comme suit :

Tableau IV.4 : Les Echantillon appliqué pour les brulures.

Lapin	Echantillon appliqué
Lapin (01)	Crème (1) à base de *carthamus caeruleus L*
Lapin(02)	HE de *carthamus caeruleus L* seulement
Lapin(03)	Vaseline
Lapin(04)	Biafine
Lapin(05)	Témoin

Après désinfecter les zones rasées. Des brulures ont été effectuées sur la peau des lapins avec une cuillère chauffée jusqu'à incandescence sur une flamme.



Figure IV.14 : Application des brulures.

CHAPITRE V :

Résultats et discutions

V.1. Introduction :

Ce chapitre présente les résultats des tests et des expériences effectuées sur notre matériel végétal (*carthamus caeruleus L*) ainsi leurs interprétations et leurs discussions.

V.2. L`observation microscopique :

Le microscope optique permet d'observer l'organisation d'un objet et de visualiser des objets ou des détails invisibles pour nos yeux, dont la résolution est trop faible. Il permet des grossissements allant des matériels biologiques mise en test.

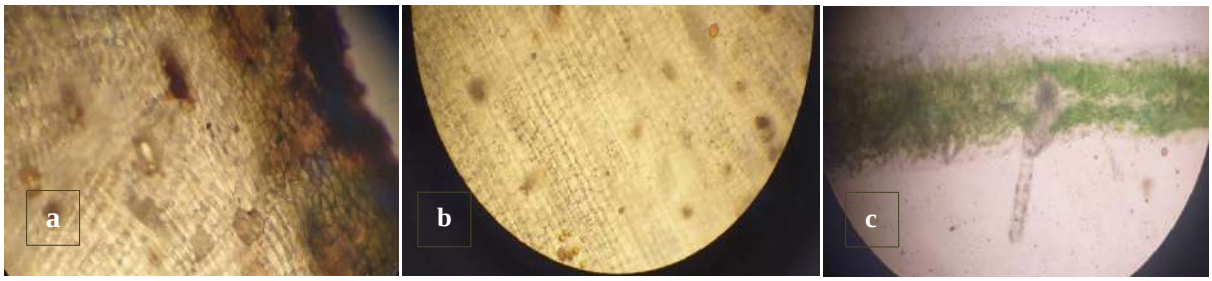


Figure V.1: vue microscopique des coupes transversaux des rhizomes et des feuilles de *carthamus caeruleus* (**a** et **b** : rhizomes ; **c** : feuilles).

L'illustration **a** et **b** qui représente la coupe transversal du rhizome, montre une paroi plus au moins rigide aux extrémités de celle-ci et des arrangements des cellules végétales ainsi qu'un nombre réduit des vésicules et des glandes productrices d'HE, ce qui résume le faible rendement qu'on a obtenu lors de l'extraction des huiles essentielles de cartamus caeruleus.

Tant que la figure **c** montre que la coupe transversal de la feuille de la plante est recouvré de poils constitués par une tête unicellulaire portée par une cellule unique. Au contraire au rhizome, la figure révèle l'absence des HE chez les feuilles de carthamus caeruleus.

V.3. Résultats de la composition chimique de *carthmus caeruleus L* :

Les protocoles effectués sur *carthamus caeruleus L* afin de déterminer sa composition en matière sèche, minérale et organique ainsi en cendres solubles et insolubles ont donné des résultats regroupés dans le tableau ci-dessous :



Figure V.2 : Les étapes de la détermination de la composition chimique de *carthamus caeruleus.*

Tableau V.1: Composition chimique de *carthmus caeruleus.*

composition chimique	**Echantillon**	**Lois**	**Résultats**
Matière sèche %	Feuilles	**%MS=** $\frac{100\times(M_0-mt)}{m}$	**82.56 %**
	Racines		**79.68 %**
Matière minérale %	Feuilles	**%MM=** $\frac{100\times(M_M-t)}{(M_0-t)}$	**8.742 %**
	Racines		**1.46 %**
Cendres solubles %	Feuilles	**%Cendres soluble =** $\frac{M_{MS}-M_{Mi}}{M_{MS}}\times 100$	**54.47 %**
	Racines		**47.12%**
Cendres insolubles %	Feuilles	/	**45.53 %**
	Racines		**52.88 %**
Matière organique%	Feuilles	**%MO = 100 - %MM**	**91.258 %**
	Racines		**98.54 %**

D'après le tableau (V.1), on observe que la composition chimique en matière sèche est intéressante dans les deux partie racines et feuilles (82.56% et 79.68%, respectivement) et que la matière minérale se trouve aussi en quantité considérable dans les feuilles (8.742 %).

V.4. Résultats des tests phytochimique :

Les tests de détection des groupes chimiques responsables des effets thérapeutiques basés sur l'apparition des couleurs spécifiques pour chaque groupe ont fournis les résultats représentés dans le tableau (V.2) :



Figure V.3 : Formation d'une mousse (saponosides) et l'apparition de la couleur noir (composés phénolique ou tanins).

Tableau V.2: Résultats de criblage phytochimique.

groupes chimiques	Extrait	Résultats
Composés phénoliques et tanins	Feuilles	+
	racines	+
Flavonoïdes	Feuilles	+
	racines	-
Alcaloïdes	Feuilles	-
	racines	-
saponosides	Feuilles	+++
	racines	+

D'un test à l'autre, nous notons que les composés phénoliques et les tanins sont présents dans les deux extraits (feuilles et racines), alors que les flavonoïdes apparaissent seulement dans l'extrait des feuilles. Les tests de détection des alcaloïdes sont négatifs pour les deux essais, et enfin la présence des saponosides est importante chez les feuilles que les racines. Cela indique que les résultats varient d'un extrait à l'autre et d'un échantillon à l'autre.

V.5. Résultat du rendement:

V.5.1. Résultat du rendement des extraits aqueux :



Figure V.4 : Les extraits aqueux (rhizomes et feuilles).

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Tableau V.3: résultats du rendement des extraits aqueux.

	Extrait	**Résultats**
Rendement %	Feuilles	**20.21 %**
	racines	**7.15 %**

Les résultats montrent que les deux extraits aqueux en feuilles et en racine donnent un rendement de 20.21 % et 7.15 % successivement.

V.5.2. Résultat du rendement de l'HE :

Le rendement d'HE extraite de 60g des racines de *carthamus caeruleus* par la méthode d'hydrodistillation est exprimé dans le tableau suivant :

Tableau V.4: résultats du rendement d'HE.

	Masse de la plante (g)	**Masse de l'HE (g)**	**Résultats**
Rendement%	60	0.036	**0.06 %**

Les racines de *carthamus caeruleus* à donner un rendement faible en huile essentielle de 0.06 % pour 60g de poudre dans 10 fois son poids eau distillée.

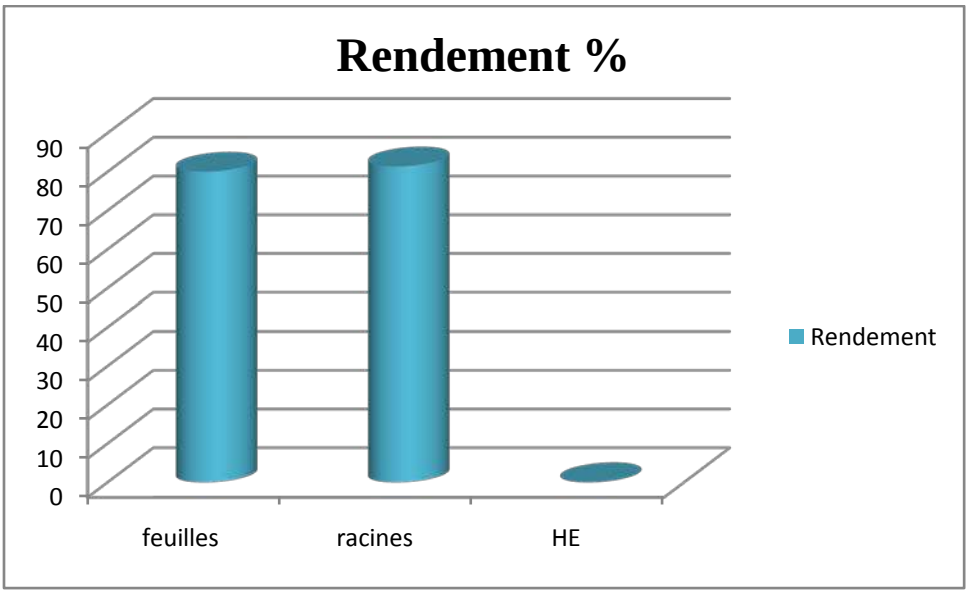


Figure V.5: graphe du rendement des extraits aqueux et de l'HE.

V.6. Résultat de l'IR :

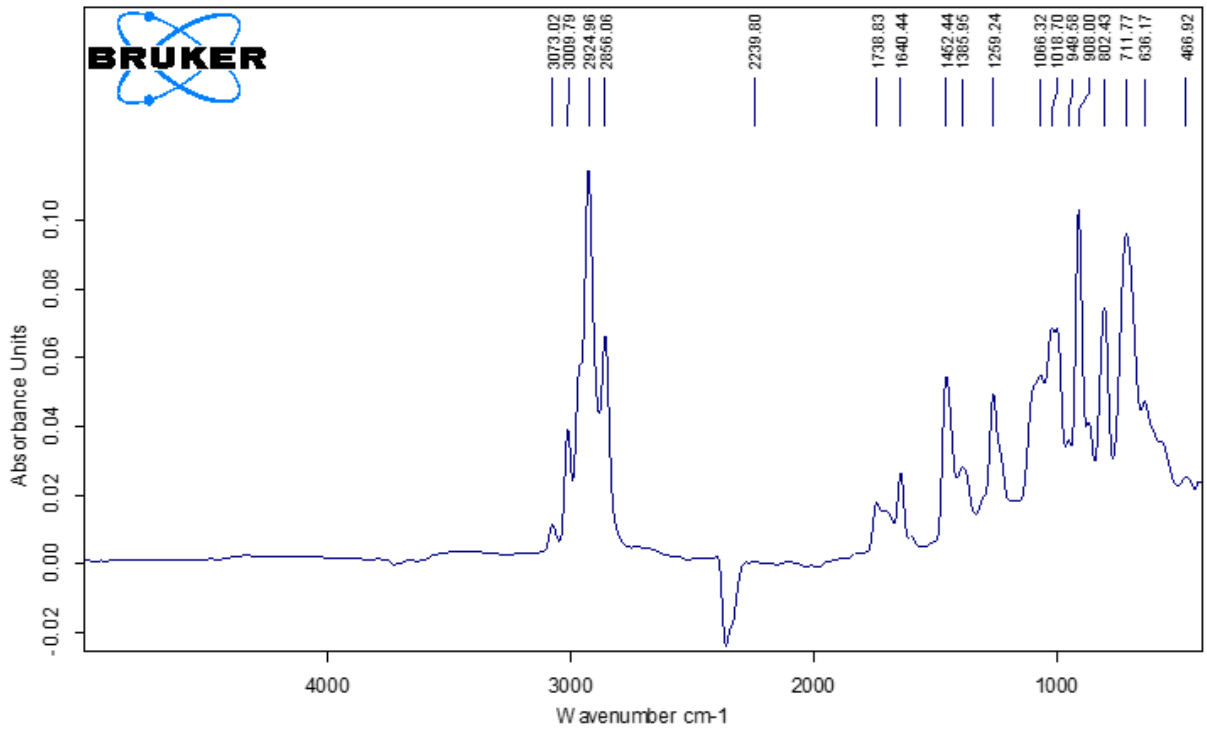


Figure V.6: Spectre FTIR.

L'analyse par spectroscopie infrarouge permet de localiser les groupements fonctionnels constituants l'HE de *carthamus caeruleus.*

3009 cm^{-1} : élongation des doubles liaisons cis

2924 et 2856 cm^{-1} : vibration d'élongation cymétrique et acymétrique du groupe méthylène (-CH2).

1738 cm^{-1} : groupement fonctionnel Ester carbonyle des triglycerides.

1465cm^{-1} : vibrations des liaisons CH2 et CH3 des groupes aliphatique **[67]**.

V.7. Résultats des propriétés physico-chimiques :

Tableau V.5 : résultats des propriétés physico-chimiques.

	Lois	Résultats
Indice d'acide (mg KOH/g HE)	$I_A = (m_b/mh)$	**2.8**
Indice de saponification	$I \quad \frac{(VT-VE)\times CHCl\times MKOH}{mh}$	**120**

(mg KOH/g HE)		
Indice d'estirification (mg KOH/g HE)	$I_E = I_S - I_A$	**117.2**
Indice de refraction (mg KOH/g HE)	/	**1.529**
Densité	$d = \frac{\rho huile}{\rho eau}$	**0.682**

V.8. Résultats de l'analyse quantitative:

Dosage des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu :

La quantification des polyphénols est effectuée par le réactif de Folin-Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune, qui se colore en bleu lors de l'oxydation des polyphénols. La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 750 nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

Les analyses quantitatives des phénols totaux, ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard.

Courbe d'étalonnage : (acide gallique) :

Tableau V.6: résultats de la courbe d'étalonnage d'acide gallique dans l`eau distillée.

Concentration (µg/ml)	**0**	**50**	100	150	200	250	300
Abs	0	0.2213	0.4003	0.6877	0.9626	1.1616	1.3278

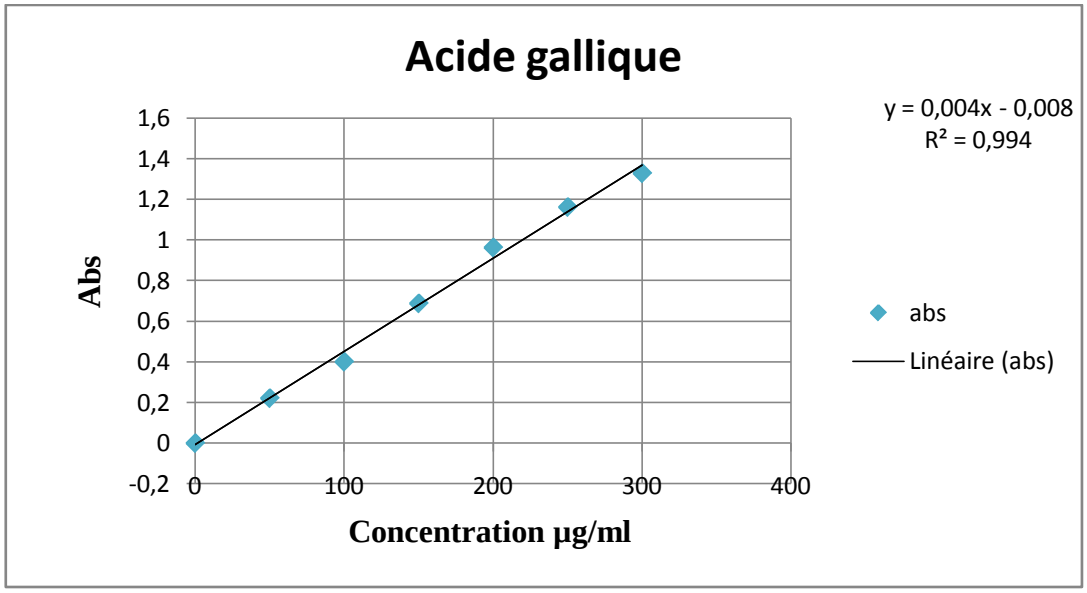


Figure V.7: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats de l'analyse quantitative des phénols totaux sont réunis dans le tableau ci-dessous :

Tableau V.7: Teneur en polyphénols des extraits de macération dans l`eau pour différentes concentrations.

Concentration (mg/ml)	0.1
Abs	0.4389
(µg EAG/mg EX feuilles)	111.725
Abs	0.0387
(µg EAG/mg EX rhizomes)	11.675

La valeur du dosage des polyphénols de l'extrait de feuilles sont beaucoup plus élevée que celle trouvée par l'extrait de rhizomes de *carthamus caeruleus.* Elles sont de 111.725 et de 11.675 µg EAG/0.1 mg d'extrait. C.-à-d ; de 1117.27 et de 116.75 µg EAG/mg d'extrait.

V.9. Résultats des activités biologiques :

V.9.1. Activité antioxydant :

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydant de nos extraits testés. La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur de son potentiel antioxydant.

Dans ce test, nous avons utilisé le DPPH comme un radical libre, stable, d'absorbance de 516 nm, pour l'évaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques.



Figure V.8 : Les résultats de l'activité anti radicalaire.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée est de tracer les graphes du pourcentage de l'activité antioxydant obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits :

$$\mathbf{AA\%} = \frac{\boldsymbol{AbsSC - AbsEssai}}{\boldsymbol{AbsSC}} \times \mathbf{100}$$

Tableau V.8: résultats l'absorbance et l'activité antioxydant de l'extrait de feuilles en fonction de la concentration

Concentration (µg/ml)	50	100	150	200	250	300
Abs (extrait de feuilles)	0.4838	0.4240	0,4019	0.3686	0.3370	0.1379
AA%	14.74	25.28	29.18	40.03	40.61	63.34

.

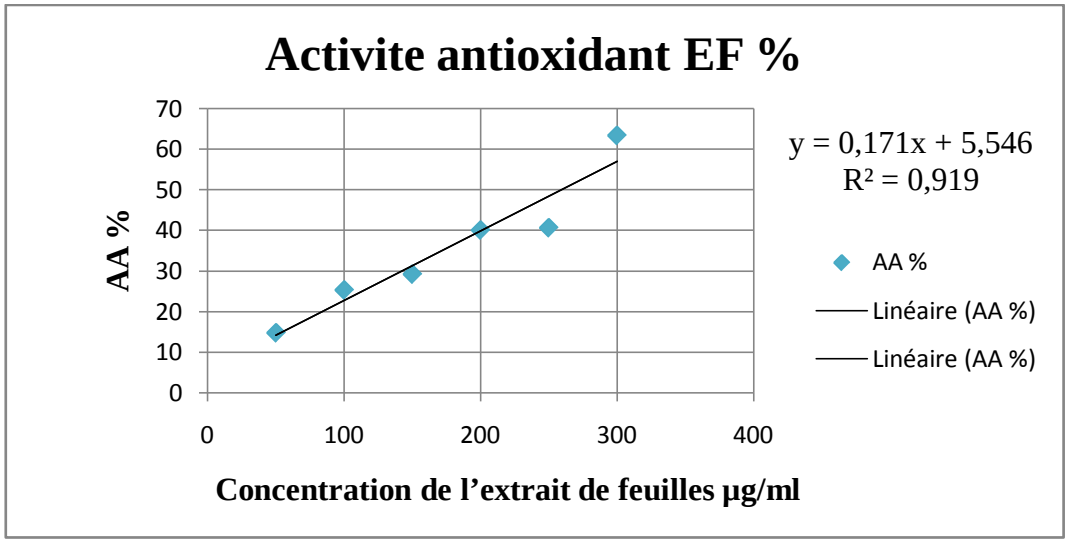


Figure V.9 : Résultats de l'activité antioxydant pour l'extrait aqueux des feuilles.

Tableau V.9 : résultats l'absorbance et l'activité antioxydant de l'extrait de rhizomes en fonction de la concentration.

Concentration (µg/ml)	10	20	30	40	50
Abs (extrait de Rhizomes)	0.5013	0.4974	0.4678	0.4500	0.4312
AA%	4.51	5.25	10.89	14.28	17.86

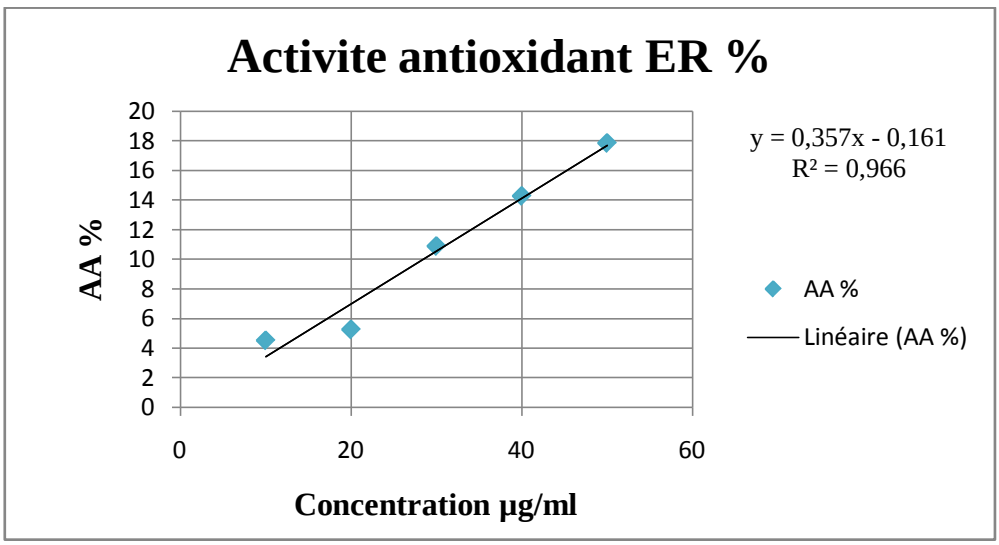


Figure V.10 : Résultats de l'activité antioxydant pour l'extrait aqueux des racines.

Tableau V.10 : Résultats l'absorbance et l'activité antioxydant de l'extrait de l`HE en fonction de la concentration.

Concentration (µg/ml)	50	100	150	200	300
Abs	0.5086	0.5012	0.5001	0.4993	0.4732
AA%	7.00	8.35	8.55	8.70	13.47

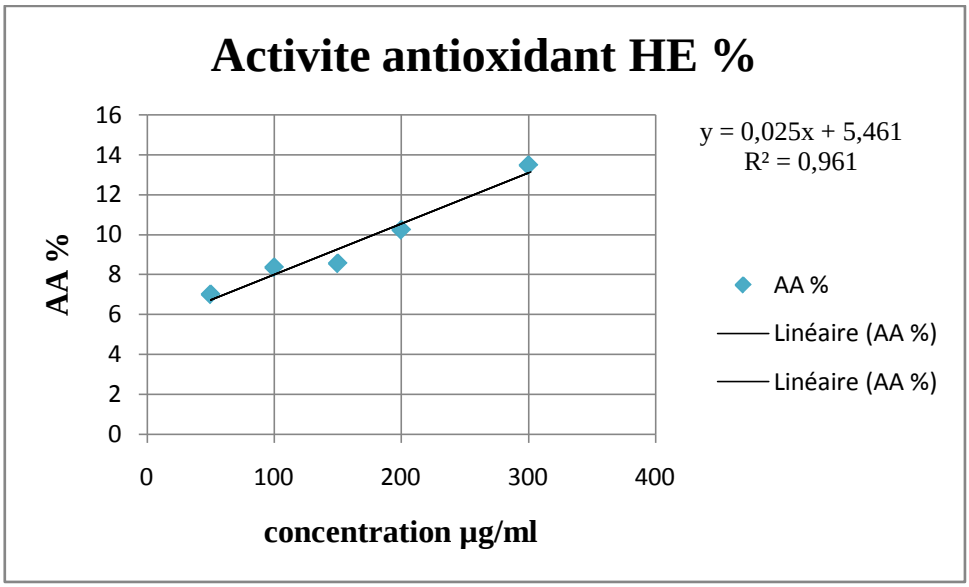


Figure V.11 : Résultats de l'activité antioxydant pour l'HE.

Plus l'IC50 est petite, plus la molécule a une activité antioxydant plus puissante. Les résultats présentés dans les tableaux révèlent que l'extrait aqueux de rhizomes possède l'activité de piégeage des radicaux la plus élevée avec la valeur de IC50 de 185µg/ml suivie de l'extrait aqueux de feuilles (IC50 = 265µg/ml) et les HE (IC50 = 1781.56µg/ml). Ce qui est largement inférieure de celles des extraits aqueux.

V.9.2. Activité antibactérienne :

Lors de cette étude, nous avons testé l'activité des extraits de *carthamus caeruleus* (HE, feuilles, rhizomes) bois à différentes concentrations vis-à-vis de 08 microorganismes (6 bactéries, 2 levures).



Figure V.12 : Test de l'activité bactérienne.

Les résultats de l'évaluation antimicrobienne des extraits sont repris ci-dessous.

Dans ces tableaux sont inclus les valeurs en (mm) des zones ou des diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes inhibés par l'activité antimicrobienne.

Tableau V.11: Diamètre des zones d'inhinibition en (mm) des souches bactérienne vis- à-vis avec l'HE.

Souches bactériennes			**Concentrations (mg/ml)**							
Souche	**Code**	**Coloration de gram**	**40**	**20**	**10**	**5**	**2.5**	**1.25**	**0.625**	**0.312**
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	**11**	/	/	/	/	/	/	/
Candidas albicans	ATCC 10231		10	/	/	/	/	/	/	/
Eschirichia coli	ATCC 8739	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Bacillus subtilis	ATCC 6633	+	11	10	10	10	/	/	/	/
Salmonella typhimuium	ATCC 14028	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	+	11	10	10	10	10	/	/	/
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	+	16	15	15	15	14	14	13	12
Saccharomyces cerevisaie	ATCC 9763		/	/	/	/	/	/	/	/

Le tableau (**Tableau V.10**), montre que l'HE de *carthamus caeruleus* n'a pas un pouvoir antibactérien puissant malgré l'inhibition de quelques souches tel que Pseudomonas Aeruginosa, Candidas Albicans, Bacillus Subtilis, Staphylococcus aureus et Staphylococcus Aureusqui donne des zones d'inhibition que pour les concentrations pures.

Tableau V.12 : Diamètre des zones d'inhinibitionen (mm) des souches bactérienne vis-à-vis avec l'extrait de rhizomes.

Souches bactériennes			**Concentrations (mg/ml)**							
Souche	**Code**	**Coloration de gram**	**40**	**20**	**10**	**5**	**2.5**	**1.25**	**0.625**	**0.312**
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Candidas albicans	ATCC 10231		/	/	/	/	/	/	/	/
Eschirichia coli	ATCC 8739	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Bacillus subtilis	ATCC 6633	+	/	/	/	/	/	/	/	/
Salmonella typhimuium	ATCC 14028	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	+	14	13	12	12	12	11	11	11
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	+	/	/	/	/	/	/	/	/
Saccharomyces cerevisaie	ATCC 9763		/	/	/	/	/	/	/	/

L'extrait de rhizomes ne présente pas une une activité antibactérienne que pour la souche Staphylococcus Aureus.

Tableau V.13: Diamètre des zones d'inhinibition des souches bactérienne vis-à-vis avec l'extrait de feuilles.

Souches bactériennes			Concentrations (mg/ml)							
Souche	**Code**	**Coloration de gram**	**40**	**20**	**10**	**5**	**2.5**	**1.25**	**0.625**	**0.312**
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Candidas albicans	ATCC 10231		12	/	/	/	/	/	/	/
Eschirichia coli	ATCC 8739	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Bacillus subtilis	ATCC 6633	+	/	/	/	/	/	/	/	/
Salmonella typhimuium	ATCC 14028	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	+	13	13	12	12	12	12	11	11
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	+	11	/	/	/	/	/	/	/
Saccharomyces cerevisaie	ATCC 9763		10	10	10	10	10	10	10	10

Malgré l`existence des zones d`inhibition, relativement faible, nos résultats prouvent l`existence d`activité antibactérienne contre quatre souches. Tant que les autres souches sont avérées résistantes.



Figure V.13 Résultats du test de l'activité antibactérienne.

V.9.3. Activité cicatrisante:

a- pour l'incision :

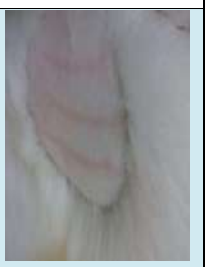
Tableau V.14: Résultats de l`activité cicatrisante pour l`incision.

Lapin	1	2	3	4	5
Apre 11 jours de l'incision					
Apre 12 jours de l'incision					
Apre 15 jours de l'incision					

D'après ce tableau on a constaté que le lapin traité seulement de l'huile essentielle de *carthamus caeruleus* s'est guérit rapidement.

b- <u>Pour les brulures :</u>

Tableau V.15: Résultats de l`activité cicatrisante pour les brulures.

Lapin	1	2	3	4	5
Apre 11 jours de l'incision					
Apre 12 jours de l'incision					
Apre 15 jours de l'incision					

Ce test nous a permet de remarquer que la cicatrice de bruleur sur le lapin numéro 1 soigné de la créme (1) à base de *carthamus caeruleus* a été disparu rapidement par rapport aux autres.

CONCLUSION

Les huiles essentielles sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide Elles sont synthétisées par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires, La qualité d'une huile dépend essentiellement de sa composition chimique.

Les plantes médicinales sont classées comme source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques, D'après cette étude on a permis d'effectuer une analyse phytochimique, d'évaluer l'activité antioxydante, antibactérienne et d'évaluer l'activité cicatrisante

L'espèce *Carthamus caeruleus* s'avère être intéressante; Son utilisation en médecine traditionnelle en vertu de ses propriétés cicatrisantes conforterait son utilisation dans les industries pharmaceutique et cosmétique

Les résultats trouvés concernant la composition phytochimique a partir de la plante étudiée est en corrélation avec son pouvoir antioxydant, antibactérien cicatrisant :

- Le criblage phytochimique caractérisé par réactions colorées a montré la présence de : flavonoïdes, saponosides, polyphénols, des tannins

- L'activité antibactérienne de l'huile de *Carthamus cearuleus.L* a été évaluée sur des souches bactériennes par la méthode de diffusion sur des disques. Les résultats ont montré que l'huile n'a pas d'activité contre toutes les souches.
- Les résultats obtenus après une application traditionnelle de la *Carthamus caeruleus L* sur la peau ont montré une efficacité remarquable de cette dernière sur la cicatrisation

Enfin, on pourra proposer cette plante comme composés alternatifs dans la phytothérapie, aussi ce travail n'est qu'un début dans l'axe de recherche des plantes médicinales, et que de nouvelles perspectives expérimentales seront envisagées pour faire une étude plus profonde.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Références

[1] TOUAFEK Ouassila., (2010). Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud Algériens., Thèse de doctorat en sciences Spécialité : chimie organique Option : Phytochimie de l'université de Mentouri-constantine., P1.

[2] CHEMLI R., (1997). Plantes médicinales et aromatiques de la flore de Tunisie., Thèse de doctorat en pharmacie., l'université de monastir de Tunisie., P 120.

[3] KRIEF Sabrina., (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii)., Thèse de doctorat l'université de Ouganda.

[4] OBAME ENGONGA Louis., (2009). Etude Phytochimique, Activités Antimicrobiennes et Antioxydantes de Quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines., Thèse de doctorat en Spécialité: Biochimie-Microbiologie (Substances à Activités Antimicrobienne et Antioxydante l'université de Ouagadougou. P7.

[5] JDIDI Imen., (2015). Etude phytochimique et activités biologiques des extraits et des huiles essentielles de foeniculum vulgare mill., Diplôme national d'ingénieur.,institut national agronomique de Tunisie., P2.

[6] DONATIEN Kone., (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes-extraction, identification d'alcaloïdes -caractérisation, quantification de poly phénols : étude de leur activité antioxydante .thèse de doctorat, L'université Paul Verlaine de Metz –upv-m – (France), France.

[7] BENZEGGOUTA Naïrouz., (2005)., Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments., Thèse de Magister en Pharmacochimie, Université Mentouri de Constantine Institut de Chimie, constatine.

[8] ZEGHAD Nadia, (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister (Ecole doctorale) , Université Mentouri Constantine ,constantine.

[9] CHAKOU Fatma Zohra ., MEDJOUDJA Kenza ,(2014) . Etude bibliographique sur la phytochimie. Projet de fin d'études licence, Université kasdi Merbah Ouargla, Ouargla.

[10] GACI Yasmine , . LAHIANI Samia, (2017). Evaluation de l'activité antimicrobienne et cicatrisante d'extraits de deux plantes de la Région de kabylie: Pulicaria odora L. et Carthamus caeruleus L. Mémoire de Fin d'Etudes En vue de l'obtention du diplôme de Master, Université M'hamed bougara boumerdes ,boumerdes **.**

[11] HANNI Marroua . , GHERABA radhia, (2016). Valorisation et comparaison de l'activité thérapeutique et phytochimique de deux plantes médicinales :teucriumpolium et phlomis crinita .mémoire de fin d'étude de master ,université dr yahia fares de médéa ,médéa.

[12] http://www.aromacopa.com/phytotherapie.php (notion de phytothérapie)

[13] FERHAT Adel. , BELHADI Madani, (2016). Evaluation de l'activité cicatrisante et de l'effet anti-inflammatoire de *Carthamus caeruleus L*. Mémoire de Master académique, Université M'hamed bougara – boumerdes, boumerdes.

[14] DJABOU Nassim, (2012). Caractérisation et variabilité des plantes a parfum aromatique et médicinales de corse et de l'ouest algérien. Thèse en Convention de Cotutelle Internationale de doctorat**,** Université de corse pascal Paoli, Paoli.

[15] Mr. BOURABAH Saïd; Mr. OUSSAR Bouzid, (2013). Prospection de l'activité antimicrobienne des associations d'huiles essentielles Essais sur le thym, le clou de girofle, la cannelle et l'origan . Mémoire de Master, Université Abderrahmane MIRA-Bejaia, Bejaia .

[16] BENHAOUA Siham, (2016). Activité antioxydante et analyse chimique des acides gras et des insaponifiables de Carthamus caeruleus . Mémoire Présenté pour obtenir le diplôme de : master en chimie, Université d'Oran 1, Oran.

[17] YEZZA Samiha, BOUCHAMA Sara., (2013/2014)., INDEX DES MÉTABOLITES SECONDAIRES VEGETAUX ., Mémoire de Master., UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA.

[18] KHELIFI Z., MEDJANI F., (2018). Evaluation des activités biologiques des extraits d'une plante Algérienne appartenant au genre Thymus.

[19] BOIZOT N., CHARPENTIER J-P., (2006)., Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestierspartiaux et aquatiques., Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier 1., Numéro spécial.

[20] KRIE S., (2015)., Métabolites secondaires des plantes et comportement animal., surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés., Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées., Ouganda., P17

[21] IHOUM R., comparaison des activites biologiques des feuilles et racines de Thymelaea Hirsuta., P10

[22] https://www.memoireonline.com/01/13/6764/m_Contribution--l-etude-de-l-activite-antimicrobienne-du-genevrierJuniperus-phoenicea--essai-d4.html>

[23] DJERMANE N., (2013-2014)., Extraction des métabolites secondaires des plantes médicinales., Pulicariaarabica(L.) Casset Rhanteriumad pressum Coss. &Durieuet., évaluation de leurs propriétés bioactives., Memoire de magister en biochimie appliquée.

[24] BELYAGOUBI & BENHAMMOU N., (2011-2012)., Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien., Thèse de Doctorat en Biologie Option., Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèse.

[25] K Saffidine., (2015)., Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de Carthamus caeruleus L. et de Plantago major L., Thèse de Doctorat en Sciences Filière: Biologie Spécialité: microbiologie.

[26] HMID I., (2013)., Contribution à la valorisationalimentaire de la grenade marocaine (punica granatum l.)., caracterisationphysicochimique, biochimique et stabilite de leur jus frais.,Thèsede doctorat en cotutelle entre l'université d'angers (france) et l'université de béni mellal (maroc)., spécialité sciences agronomiques.

[27] ABEDINI A., (2013)., Pharmacognosie Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'Hyptis atrorubens Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes,. École Doctorale Biologie Sante., Science Du Medicament.

[28] REZINE F & FEDAOUCHE M.S., (2017)., Coumarines à intérêt thérapeutique., Synthèse et contrôle analytique.

[29] AMELOT N., (2010)., Couplage entre signalisation calcique et modulation du transcriptome en reponse a la cryptogeine chez des cellules de tabac.

[30] ZAHAHE Oulame M., (2017)., Mise en place de nouveaux procédés de dégradation des lignines dans les liquides ioniques.

[31] MARCHAND Guillaume., (2018)., Synthèse et caractérisations de matériaux photosensibles à partir de lignines - Vers une utilisation en Traitement Photodynamique Antimicrobien appliqué à l'agronomie. Thèse de Doctorat.

[32] CONDASSAMY Olivia (2015)., Valorisation d'une lignine alcaline industrielle : vers le développement de nouveaux synthons et oligomères bio-sourcés issus de la lignine. Thèse de Doctorat.

[33] GABASTON Julien., (2018)., Stilbènes de la vigne et d'essences forestières (pin, épicéa) : Etude phytochimique et recherche d'activités anti-oomycète et insecticide. Thèse de Doctorat.

[34] FRISSOU Samia HANI Dalila., (2013-2014)., Etude des teneurs en alcaloïdes d'une plante médicinale «Matricaria pubescens» et la détermination de leurs activités antioxydantes. Mémoire de master.

[35] FRANCOIS Nsemi M., (2010)., Identification de polyphenols., evaluation de leur activite antioxydante et etude de leurs proprietes biologiques. Thèse de doctorat., Spécialité Chimie organique., Université Paul Verlaine-Metz.

[36] M. BOUGUERRA Ali, (2012). Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de Foeniculum vulgare Mill. En vue de son utilisation comme

conservateur alimentaire. Mémoire Présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister, Université Mentouri Constantine, constantine

[37] TOURE Daouda,. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quarte plantes aromatiques medicinales de cote d'ivoire. thèse de doctorat, Université felix houphouet –Boigny , Boigny .

[38] ABBES Amal,. (2014). Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'ammoides verticillata « noukha » de la région de tlemcen.mémoire de fin d'étude, université abou bekr belkaid ,Tlemcen .

[39] PIOCHON Marianne,. (2008). Étude des huiles essentielles d'éspéces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi –synthèse. Mémoire présenté à l'université du Québec a Chicoutimi, Québec.

[40] NEDJAI Ibtissem, NEDJAI Salma, (2017). Activité antimicrobienne des huiles essentielles .mémoire de fin de cycle du diplôme master, université A. Mira – Bejaia, Tlemcen.

[41] OUIS Naouel,. (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre et de feouil. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale), Université Mentouri Constantine, Constantine.

[42] BENBELAID Fethi,. (2015). Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur Enterococcus faecalis responsable d'infections d'origine dentaire. thèse de doctorat, Université abou beker belkaid, Tlemcen.

[43] LAOUAR Samiya,. (2013). Etude de l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles et l'effet de leurs associations avec les antibiotiques. Mémoire de fin d'étude , Université Abderrahmane MIRA ,Bejaia.

[44] BOURABAH Saïd ; OUSSAR Bouzid ,. (2013). Prospection de l'activité antimicrobienne des associations d'huiles essentielles Essais sur le thym, le clou de girofle, la cannelle et l'origan. Mémoire de Master, Université Abderrahmane MIRA-Bejaia, Bejaia.

[45] RAHMI Marouan., (2013). evaluation des activites biologique de cartham L., Mémoire master. Boumerdes.

[46] MANALLAH A., (2012)., Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d''olive Olea europaea L.

[47] GUILLOUTY A., (2016)., Plantes médicinales et antioxydants

[48] POISSON C., (2013)., Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique., Thèse De Doctorat.

[49] DESMIER T., (2016)., Les antioxydants de nos jours : definition et applications thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie.

[50] MANE S., (2012)., Etude comparee des proprietes antioxydantes des extraits d'ecorces de tronc, des feuilles et des fruits (coques et graines) de khaya senegalensis (desr.) a. juss (meliaceae)., Thèse de doctorat (Diplôme d'Etat).

[51] BOUBEKRI C., (2014)., Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques. Mémoire de master.

[52] M Fethoun & SAHEB R., (2015)., Evaluation de l'activité antioxydant de différents extraits de Foeniculum vulgare. Mémoire de master.

[53] SOKONA O & KHOUALDIAF., (2017/2018)., Etude rheologique des formulations préparées a base de l`huile essentielle du Thymus Serpolet . Mémoire de master.

[54] REBIQHI S., (2012)., caracterisation de souches de *staphylococcus aureus* et etude deleur antibioresistance ., centre hospitalo-universitaire.

[55] BOUTCHICHE A., (2017)., Etude comparative de quelques méthodes d'évaluation de la concentration minimale inhibitrices des extraits de plantes. Mémoire de Master Académique en Biologie Option : Microbiologie.

[56] https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/disk-diffusion.

[57] KOROTIMI D & KARABINTA A., (2010)., Propriété cicatrisante des feuilles de Opilia celtidifolia (Guill. et Perr.) Endl. ex Walp. (Opiliaceae). Thèse de doctorat à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako (Diplôme d'Etat).

[58] ESSAYAGH T., (2013)., Epidemiologie de L'infection chez les rules Hospitalises A L'unite Des Brules De L'hopital Militaire D'instruction Mohamed V De Rabat., Toulouse, France Pour Obtenir Le Doctorat National.

[59] FERHAT A & BELHADI M., (2015/2016)., Evaluation de l'activité cicatrisante et de l'effet anti-inflammatoire de Carthamus caeruleus L.

[60] FERRAK Y., (2016)., Développement D'un Modèle De Cicatrisation Épidermique Après Une Désépidermisation Laser.

[61] El HAIB A., (2011)., Valorisation De Terpenes Naturels Issus De Plantes Marocaines Par Transformations Catalytiques .

[62] BENHAOUA Siham., (**2015/2016).,** Activité antioxydant et analyse chimique des acides gras et des insaponifiables de Carthamus caeruleus. Mémoire master en chimie, Tlemsen.

[63] IBRAHIM Hanane & OUAZINE Yasmina., (2014)., Utilisation de la spectrophotométrie UV-visible pour l'étude de l'extraction solide-liquide du thym., Mémoire master en génie chimie. Université A.MIRA-BEJAIA.

[64] ***BOULEFRED Soumi.,*** **(2010).,** étude spectrophotometrique des chlorocomplexes de cobalt II en milieu méthanolique., Mémoire master., l'université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen.

[65] Ali-RACHED Fahima., (2017/2018)., Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 87, articles, 2018, p. 13 -21 13 Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L

[66]https://www.memoireonline.com/07/08/1340/m_dosage-biochimique-composes-phenoliques-datte-miel-sud-algerie22.html>

[67] ROHMAN A., MANA B., (2010)., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil., Food Research International 43 (2010) 886–892.