

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abbès Laghrou Khenchela

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de la Biologie Moléculaire et Cellulaire

MEMOIRE

En vue de l'obtention de diplôme de master en biochimie appliquée

Option : Biochimie appliquée

Thème :

Etude des activités biologiques de

« *Senecio cineraria* »

Présenté par

Boucherit Amina

Jury de soutenance

Président: M^{me} Nadji Hamida

MAA. Univ. Abbès Laghrou - Khenchela-

Rapporteur: M^{me} Kara Ali W

MCB Univ. Abbès Laghrou - Khenchela-

Examinatrice: M^{me} Boutarfa S

MAA. Univ. Abbès Laghrou -Khenchela-

2017/ 2018

Remerciement

Mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux s'adressent à :

ALLAH le tout puissant qui m'a permis d'être ce que je suis aujourd'hui.

Car l'homme propose mais ALLAH dispose. Seigneur, veuillez toujours

diriger mes pas.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements à notre directrice du

mémoire madame Karaali Wahiba qui nous a guidé dans notre

travail, Merci pour nous avoir accordé votre temps, Merci d'avoir été très

patiente avec nous, Merci pour d'avoir mis votre expérience à notre profit.

Je tiens à présenter mon sincère et vif remerciement aux membres de

jury Madame Boutarffa S , et Madame Nadji Hamida, qui ont accepté de juger

mon travail.

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A mes parents

Qui m'ont transmis de l'amour la joie le courage et pour l'éducation qu'ils
m'ont prodigué

Aucun dédicace aucun mot ne pourrait exprimer mon respect ma
considération et mes profonds sentiment envers eux je prie mon dieu de les
bénir de veiller sur eux j'espère qu'ils seront toujours fiers de moi.

A mon mari Chaker et ma petite fille Loudjain.

A mes soeurs et mon frère

Hiba, Assia et Hamza. Pour votre soutien moral et
encouragements vous m'avez appris la patience et la concentration sur
mon travail. Je vous souhaite un avenir plein d'amour, de bonheur et de
succès. Je vous aime beaucoup.

A mes chères amies Meryem et Nour El Houda

Je vous remercie pour votre soutien moral, votre patience et votre dévouement

à ce travail, Je vous dédie le fruit de nos efforts. Je vous aime beaucoup.

Table de matière

| | |
|---|-----------|
| Dédicace | |
| Remerciement | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction..... | 01 |
| Chapitre I. Revue Bibliographique | 03 |
| I. La plante médicinale Senecio cineraria..... | 03 |
| I.1. Description de la plante..... | 04 |
| I.2. Place dans la systématique..... | 04 |
| I.3. Répartition géographique..... | 04 |
| I.4. Usage de la plante..... | 04 |
| II. Métabolites secondaires..... | 05 |
| II.1. Définition..... | 05 |
| II.2. Biosynthèse..... | 05 |
| II.3. Classification des métabolites secondaires..... | 05 |
| II.3.1. Les alcaloïdes..... | 05 |
| II-3-2. Les terpènes..... | 06 |
| II-3-3. Les stérols..... | 06 |
| II-3-4. Les saponines..... | 07 |
| II-3-5. Les composés phénoliques | 07 |
| II-3-6. Les coumarines | 07 |
| II-3-7. Les flavonoïdes | 07 |
| II-3-8-Les tannins..... | 08 |
| III. Le stress oxydant..... | 09 |
| III.1. Définition..... | 09 |
| III.2. Les radicaux libres..... | 09 |
| III.3. Sources des espèces réactives..... | 11 |
| III.3.1. Sources endogènes..... | 11 |
| III.3.2. Sources exogènes..... | 12 |
| III.4. Rôle physiologique des espèces réactives..... | 12 |
| III.5. Pathogénie du stress oxydatif..... | 12 |

| | |
|--|-----------|
| III.6. Systèmes de défenses antioxydants..... | 13 |
| III.6.1. Les antioxydants enzymatiques..... | 13 |
| III.6.2. Les antioxydants non enzymatiques..... | 13 |
| IV. Activité antimicrobienne..... | 14 |
| IV.1. Les antibiotiques..... | 14 |
| IV.2. Les infections bactériennes..... | 14 |
| IV.2.1. Thérapeutique des infections bactériennes..... | 14 |
| IV.2.2. Mécanisme d'action des antibiotiques..... | 15 |
| IV.2.3. Résistance des antibiotiques..... | 15 |
| V. La coagulation..... | 16 |
| V.1. Généralité sur l'hémostase..... | 16 |
| V.1.1. L'hémostase primaire..... | 16 |
| V.1.2. La coagulation (hémostase secondaire)..... | 16 |
| V.1.2.1. La voie intrinsèque..... | 16 |
| V.1.2.2. La voie extrinsèque..... | 17 |
| V.1.3. La fibrinolyse..... | 18 |
| V.2. Les excès de coagulation..... | 19 |
| V.2.1. Les thromboses artérielles..... | 19 |
| V.2.2. Les thromboses veineuses..... | 19 |
| V.3. Traitement des maladies thrombotiques..... | 19 |
| V.3.1. Les antiagrégants..... | 20 |
| V.3.2. Traitements fibrinolytiques..... | 20 |
| V.3.3. Les anticoagulants..... | 20 |
| V.3.3.1. Les héparines..... | 20 |
| V.3.3.2. Les anti vitamines K..... | 21 |
| V.3.3.3. Les nouveaux anticoagulants..... | 21 |
| VI. L'hémolyse..... | 21 |
| VI.1. Définition..... | 21 |
| VI.2. Hémolyse physiologique..... | 22 |
| VI.2.1. Signes biologiques..... | 22 |
| VI.2.2. Conséquences de l'hémolyse physiologique..... | 22 |
| VI.3. Hémolyse pathologique..... | 22 |
| VI.3.1. Causes intrinsèques ou intra corpusculaires..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| VI.3.2. Causes extrinsèques ou extra corpusculaires..... | 23 |
| VI.3.3. Conséquences de l'hémolyse pathologique..... | 23 |
| VI.3.3.1. Signes d'hémolyse intra vasculaire..... | 23 |
| VI.3.3.2. Signes d'hémolyse extra vasculaire..... | 23 |
| VI.4. Traitement de l'hémolyse pathologique..... | 24 |
| Chapitre II. Matériel et Méthodes..... | 25 |
| I. Matériel..... | 25 |
| I.1. Matériel biologique..... | 25 |
| I.1.1 Matériel végétal..... | 25 |
| I.1.2.Souches bactériennes..... | 25 |
| I.1.3. Echantillons du sang..... | 25 |
| I.2. Les médicaments..... | 25 |
| I.3. Réactifs chimiques et équipements..... | 26 |
| II. Méthodes..... | 26 |
| II.1. Préparation et étude phytochimique de l'extrait méthanolique de la plante médicinale <i>S. cineraria</i> | 26 |
| II.1.1 Préparation de l'extrait méthanolique..... | 26 |
| II.1.2 Caractérisation phytochimique de la plante..... | 26 |
| A. Identification des flavonoïdes..... | 27 |
| B. Identification des tanins..... | 27 |
| C. Identification des saponines..... | 27 |
| D. Identification des alcaloïdes..... | 27 |
| II.1.3 Dosage des flavonoïdes..... | 27 |
| II.1.4. Chromatographie sur couche mince (CCM)..... | 28 |
| II.2. Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> de l'EMSC..... | 29 |
| II.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante..... | 29 |
| II.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne..... | 30 |
| II.2.2.1. Méthode des disques -Tests d'efficacité-..... | 30 |
| A. Préparation de l'inoculum..... | 30 |
| B. Ensemencement..... | 31 |
| C. Préparation des disques d'aromatogramme..... | 31 |
| D. Incubation et lecture..... | 31 |
| II.2.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI)..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| II.2.2.3. Synergie entre l'EMSC de plante étudiée et les antibiotiques..... | 33 |
| II.2.3. Evaluation de l'activité anticoagulante <i>in vitro</i> | 34 |
| II.2.3.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaquetés..... | 34 |
| II.2.3.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène..... | 34 |
| A. Principe de l'essai..... | 34 |
| B. Protocole expérimental..... | 34 |
| II.2.3.3. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie endogène..... | 35 |
| II.2.4. Evaluation de l'activité antihémolytique <i>in vitro</i> | 35 |
| II.2.4.1. Préparation des globules rouges..... | 35 |
| II.2.4.2. Préparation de l'extrait..... | 36 |
| II.2.4.3. Protocole expérimental..... | 36 |
| II.2.4.4. Expression des résultats..... | 36 |
| II.3. Analyse statistique..... | 36 |
| Chapitre III. Résultats et discussion..... | 37 |
| I. Résultats de la caractérisation chimique de l'EMSC..... | 37 |
| I.1. Screening phytochimique..... | 37 |
| I.2. Dosage des flavonoïdes..... | 38 |
| I.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)..... | 39 |
| I.4. Résultats des activités biologiques..... | 43 |
| I.4.1. Détermination de l'activité antioxydante de EMSC par la méthode de DPPH* | 43 |
| I.4.2. Evaluation de l'Activité anti-hémolytique..... | 44 |
| I.4.3. Evaluation de l'activité antibactérienne..... | 46 |
| A. Résultat de l'activité antibactérienne testée par la méthode des disques..... | 46 |
| B. Test de synergie..... | 50 |
| I.4.4. Evaluation de l'activité anticoagulante..... | 51 |
| Conclusion et perspectives..... | 54 |

Résumé

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1. Quelques photos de <i>Senecio cineraria</i> (A) la plante entière, (B) les fleurs, (C) les feuilles..... | 03 |
| Figure 2. Etapes de coagulation | 18 |
| Figure 3. Courbe d'étalonnage de la quercétine..... | 28 |
| Figure 4. La réduction du DPPH [•] par un antioxydant | 29 |
| Figure 05: Différentes étapes de l'activité antibactérienne..... | 32 |
| Figure 06: Microplaques utilisées pour détermination de CMI..... | 33 |
| Figure 07: Résultats du screening phytochimique..... | 38 |
| Figure 08: Courbe d'étalonnage de Quercétine..... | 38 |
| Figure 09 : Quelques photos de chromatogramme résultant de l'analyse de EMSC par CCM sur gel de silice..... | 40 |
| Figure 10 : Les concentrations de EMSC qui inhibent 50 % du radical DPPH [•] | 44 |
| Figure 11 : Courbes de pourcentages d'inhibition de l'hémolyse en fonction de différentes concentrations..... | 45 |
| Figure 12 : Histogramme de pourcentage d'inhibition de l'hémolyse en présence des différentes concentrations..... | 46 |
| Figure 13 : Quelques photos des résultats de l'activité antibactérienne..... | 49 |
| Figure 14 : Quelques photos des résultats de la synergie EMSC/Antibiotiques..... | 51 |
| Figure 15 : Histogrammes de TCK et TQ..... | 52 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 01. Principales espèces réactives générées dans les systèmes biologiques..... | 10 |
| Tableau 02. Résultats des tests phytochimiques de la plante <i>Senecio cineraria</i> | 36 |
| Tableau 03. Résultat de la CCM de EMSC par différents systèmes de solvant | 39 |
| Tableau 04. Interprétation des couleurs des spots en différentes classes de flavonoïdes..... | 41 |
| Tableau 05. Détermination de la zone d'inhibition (ZI) de l'extrait de <i>Senecio cineraria</i> | 47 |
| Tableau 06. Concentration minimale inhibitrice de l'EMSC..... | 48 |
| Tableau 07. Résultats des zones d'inhibitions de la synergie EMSC/Antibiotique | 50 |
| Tableau 08. Résultats de l'activité anticoagulante | 51 |

Liste des abréviations :

A : Absorbance

AlCl₃ :Chlorure d'aluminium.

CAT : catalase

CCM : chromatographie sur couche mince

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CN : contrôle négatif

CP : contrôle positif

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO : densité optique.

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

E : tocophérol

EMSC : extrait méthanolique de Senecio cineraria

ERN : espèces réactives azotées

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FeCl₃ : chlorure de fer III

GPx : Glutathion peroxydase

G6PD : Glucose 6 Phosphate Deshydrogénase

GR : glutathion réductase

GSH : Glutathion

HBMP : héparine de bas poids moléculaire

HCl : Acide chlorhydrique

HNF : héparine non fractionnée

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HOCl: acide hypochlorique

H₂SO₄: Acide sulfurique

IC50: concentration inhibitrice a 50%.

Me OH : Méthanol

Mg EQ/g E : Equivalent milligramme de quercétine par g d'extrait

MH : Muller-Hinton

NaOH : Hydroxyde de sodium

Nm : Nanomètre

NO[·] : monoxyde d'azote

NO₂[·] : dioxyde de nitrogène

Ofx : Ofloxacin

OH[·] : radicale hydroxyle

O₂^{·-} : Anion superoxyde

¹O₂ : oxygène singulier

O₃ : ozone

ONOO⁻ : peroxydinitrite

P : Pénicilline

PAI : plasminogen activator inhibitor

PBS : Phosphate Bufferes Saline.

P K : Pyruvate Kinase

Q : ubiquinone

RF : rapport frontal

SOD : superoxyde dismutase

t-PA : tissue plasminogen activator

UV : Ultra violet

u-PA : urokinase plasminogen activator

ZI : zone d'inhibition

Introduction

INTRODUCTION

Durant des siècles et même des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son bien-être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tous types de remèdes naturels pour finalement créer un lien de complémentarité avec la nature et élaborer ce que nous appelons aujourd'hui la « **médecine traditionnelle** » (Roumy, 2007).

A travers le monde, la médecine traditionnelle constitue soit le mode principal de prestation de soins de santé, soit un complément à ce dernier. En effet, l'OMS (2002) estime qu'environ 80% de la population africaine dépendent encore des médecines traditionnelles pour répondre à certains de leurs besoins au niveau des soins de santé primaire. Or, dans les pays industrialisés, c'est sous forme de thérapies complémentaires que les plantes sont aujourd'hui surtout utilisées. En Europe et en Amérique du Nord, plus de 50% de la population a eu recours au moins une fois à des compléments alimentaires à base de plantes. C'est encore beaucoup plus au Canada (70 %) et en Allemagne (90%).

Une des singularités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acides nucléiques), ils synthétisent également une foule importante d'autres métabolites indirectement essentiels à la vie des plantes, dits « **métabolites secondaires**».

Ces métabolites assurent des fonctions clés dans la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (radiation ultra-violette, température, sécheresse, etc.) (Kutchan, 2001 ; Wink, 2003 ; Kliebenstein, 2004).

D'un point de vue applicatif, ces molécules constituent souvent la base des principes actifs des plantes médicinales, l'évaluation de leurs valeurs thérapeutiques ayant fait l'objet de nombreuses recherches et amené à l'identification des principaux éléments actifs des plantes (Newman et Cragg, 2012).

L'Algérie, grâce à sa situation géographique particulière, sa superficie étendue et son relief, bénéficie d'une gamme très variée de climats et de sols, favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales. Cette richesse et cette originalité font que l'étude présente un intérêt scientifique « **fondamental** »

pour la connaissance et le savoir faire dans le domaine de l'ethnobotanique, de la pharmacopée traditionnelle mais également un intérêt scientifique « **appliqué** » dans le domaine de la valorisation des ressources phytogénétiques.

La cinéraire maritime ou le *Séneçon cinéraire*, est une plante qui appartient à la famille des *Asteraceae*. Cette famille est la plus importante des angiospermes avec 23 600 espèces, très répandue dans les régions tempérées.

Notre travail s'est consacré à l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques de l'extrait méthanolique de la plante *Sénecio cineraria*, il a pour objectif d'extraire les molécules bioactives, avec la détermination de certains groupes, comme il vise à tester les activités biologiques de l'extrait méthanolique surtout l'activité antioxydante , antimicrobienne, anticoagulante et antihémolytique.

Revue bibliographique

Chapitre I. Revue bibliographique

I- La plante médicinale « *Senecio cineraria* »

La cinéraire maritime ou le *Séneçon cinéraire*, est une plante qui appartient à la famille des *Asteraceae*. Cette famille est la plus importante des angiospermes avec 23 600 espèces. C'est une famille très répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées (Dupot et Guignard, 2012).

plusieurs synonymes de l'espèce : *Jacobaea maritima*(L), *maritima* L. *Cineraria*, *maritima* L. *Senecio* (Pelsier et Meijden, 2005 Othouana).

I-1. Description de la plante

C'est un arbrisseau à souche ligneuse xérophile, vivace arbustive à fleurs semis-rustique très souvent cultivée comme annuelle, d'origine méditerranéenne, de couleur jaune avec une hauteur de 40 à 60 cm.

Elle possède des tiges dressées, raides, sous ligneuses à la base, rameuses, blanches, des feuilles ovales, profondément pennatifides, souvent lyrées, blanches cotonneuses dessous, vertes tomenteuses dessus, les inférieures pétiolées à segment ultime aussi large que long, les supérieures sessiles. Les capitules sont petits, réunis en corymbe dense, involucre blanc tomenteux, à bractées oblongues lancéolées. Les fleurs jaune doré, avec 9 à 12 fleurs en languette. Les akènes glabres, à courte aigrette ciliée, caduque. (Dupont F. et Guignard J-L, 2012).



(A)



(B)



(C)

Figure 01. Quelques photos de *Senecio cineraria* (A) la plante entière, (B) les fleurs, (C) les feuilles

I-2. Place dans la systématique

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta* (plantes vasculaires)

Super division : *Spermatophyta* (plantes à graine)

Division : *Magnoliophyta* (plantes à fleurs)

Classe: *Magnoliopsida*.

Sous-classe: *Asterdae*.

Ordre: *Asterales*.

Famille: *Asteraceae*

Genre: *Senecio*

Espèce: *Cineraria* (*Pelser et Meijden, 2005 Othonna*)

I-3. Répartition géographique

La plante est très rare, elle est répandue dans la région des Alpes-Maritimes, Alpes de haute-Provence et assez commune sur les rochers maritimes de la cote méditerranéenne continentale et de la Corse. (**Jean-Claude Rameau. Dominique Mansion, et al**).

I-4. Usage de la plante

La Senecio cineraria a été utilisée dans des préparations pharmaceutiques pour un usage externe pour traiter les inflammations oculaires comme les conjonctivites et les cataractes. (**Jean-Claude Rameau. Dominique Mansion, et al**). Il a également été utilisé en homéopathie. En outre, cette plante est également utilisée et cultivée dans les cimetières. (**Jean-Claude Rameau. Dominique Mansion, et al**).

II- Métabolites secondaires

II-1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes biosynthétisés par les plantes autotrophes (**BOUDJOUREF, 2011**) à partir de métabolites primaires et caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (**NEWMAN et CRAGG, 2012**). Les métabolites secondaires n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante cependant, ils jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème (**PEEKING *et al.*, 1987**).

En 1987 Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils présentent une énorme valeur économique en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique. (**PEEKING *et al.*, 1987**).

II-2. Biosynthèse

La production des métabolites secondaires est étroitement liée au métabolisme primaire, résultent généralement de trois voies de biosynthèse: la voie de shikimate, la voie de mévalonate et du pyruvate (**VERPOORTE et ALFERMANN, 2000**). La plupart des précurseurs sont issus de la glycolyse (pyruvate, phosphoénolpyruvate, acétyl- CoA), de la voie des pentoses phosphate (glycéraldéhyde-3-P, Erythrose-4-P) et du métabolisme des lipides (glycéraldéhyde-3-P et acétyl-CoA). Ces précurseurs sont à l'origine de la diversité structurale observée au niveau des métabolites secondaires (**MAYER, 2004**). Du point de vue synthétique, les métabolites secondaires peuvent être subdivisés en deux catégories: (**LITVAK et MONSON, 1998**)

- Les phyto-anticipines ou les métabolites de constitution, C'est-à-dire synthétisés par la plante de manière permanente même en absence d'un facteur de stress.
- Les métabolites induits ou phytoalexines qui sont synthétisés uniquement en cas de stress.

II-3. Classification des métabolites secondaires

II-3-1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent un des groupes de métabolites secondaires d'origine végétale retrouvés dans environ 20% de toutes les espèces de plantes (**Zhang et Björn, 2009**) et douées des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (**Zenk *et al.* 2007**).

Les alcaloïdes contenant plus de 10000 à 12000 différentes structures (**Stöckigt et al. 2002**). Ils sont des composés organiques de faibles poids moléculaires et de structures complexes, plus ou moins basiques et hétérocycliques avec un atome d'azote comme hétéroatome. Les pyrazoles forment un groupe d'alcaloïdes contenant deux atomes d'azote dans le noyau aromatique, ceux-ci ne sont pas d'origine naturelle (**Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007**).

Bien que beaucoup des alcaloïdes soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (la morphine, la codéine), antipaludéens (quinine, chloroquinine), anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine) et antimicrobiennes (**Faizi et al. 2003**).

II-3-2. Les terpènes

Les terpènes forment une classe d'hydrocarbures odoriférants, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Leur squelette de carbone est constitué d'unités isopréniques (C₅H₈) reliées entre eux. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. Ils sont les plus représentés dans la constitution chimique des huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

Des investigations concernant les activités biologiques des mono-et des sesquiterpènes ont prouvé l'existence des effets: anesthésique, antihistaminique (allergies), anti-rhumatismal, diurétique (-eudesmol), insecticide, analgésique, toxique (sesquiterpènes) quelquefois, antibiotique, anti-inflammatoire, anti-cancéreux, irritant et calmant (**Hsiou-Y, 2000 ; Veli kovi , 2003**). Un grand nombre d'entre eux possède des propriétés antiseptiques (**Klaas et al. 2002**). Les terpénoïdes sont connus comme doués de propriétés antifongiques et antibactériennes.

II-3-3. Les stérols

Les stérols, appelés phytostérols, sont des composés naturellement présents dans les membranes cellulaires des plantes et jouent un rôle très important dans la perméabilité de celles-ci et aussi dans la prolifération cellulaire (**Bruneton, 1993 ; Rahal, 2004 ; Kartal, 2005**). Les principaux stérols dans les plantes, les champignons et les algues sont caractérisés par la présence, sur la chaîne latérale, d'un méthyle (ou éthyle) attaché au carbone C-24. Plusieurs études ont démontré que les phytostérols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle. (**Bruneton, 1993 ; Rahal, 2004 ; Kartal, 2005**).

II-3-4. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils sont des glycosides de stéroïde ou de triterpène. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres; cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. (Manach, 2004).

II-3-5. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont les composés naturels les plus répandus dans la nature. Ces composés présentent une grande diversité de structures, dont les molécules possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...). Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylée). (Robbers et al, 1996).

II-3-6. Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. Dans les plantes, on les rencontre chez les *Apiacées*, les *Astéracées*, les *Fabacées*, les *Rosacées*, les *Rubiacees*, les *Rutacées* et les coumarines possèdent des propriétés antibactérienne, antifongique et anticoagulante; La warfarine est une coumarine utilisée comme anticoagulant qui posséderait également des propriétés antivirales (Cowan, 1999). De même, les coumarines présentes dans la plante *Galium odoratum*, seraient responsables de l'activité antibactérienne et antifongique (Hostettmann, 1991).

II-3-7. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chloroplastes (Guignard, 1996).

Leur fonction principale semble être la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Gàbor et al. 1988). Les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui possèdent une unité C6-C3 liée à un noyau aromatique (Zhang et Björn, 2009).

De Rijke et al. (2006) ont classé les flavonoïdes en 6 familles qui impliquent les flavonols, les flavones, les flavanes, les isoflavones, les anthocyanines et les flavanols.

Une activité antibactérienne est connue pour les flavonoïdes. En effet, ils sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries (**Didrak 1999 ; Modak 2001 ; Okigbo 2005 ; Mamatha 2005**).

Etant donné que les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes suite à une infection microbienne, il n'est donc pas surprenant qu'ils possèdent des propriétés antimicrobiennes (**Cowan, 1999**). En effet, ils sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries. Leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. (**Prasad et al. 2004**).

II-3-8-Les tannins

Les tannins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire fortement hydroxylés. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (**Alkurd et al. 2008**). On distingue: les tannins hydrolysables et condensés.

Les tannins hydrolysables

Ces tannins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle. Comme leur nom l'indique, ces tannins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (**Conrad et al. 1998**).

Les tannins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol (**Wollgast, 2000 ; Dykes, 2006**).

Les tannins ont une action antibactérienne puissante par l'inhibition de la croissance des bactéries ruminales (**Chatterjee et al. 2004 ; Leitao 2005**), ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*.

L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (**Sivakumaran 2004**).

III. Le stress oxydant

III-1.Définition

La terminologie de "stress oxydant" est généralement utilisée pour toute agression environnementale ayant pour conséquence une production accrue d'oxydants (radicaux libres ou molécules toxiques dérivées de l'oxygène). (**Hernandez et al., 1995; Lamb et Dixon, 1997**).

III-2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques neutres ou chargées présentant dans leur orbite électronique externe un électron non apparié dit célibataire. Le radical libre est instable et très réactif et pour devenir stable il doit appairier son électron ou bien céder le sien à une autre molécule. Chacune de ces réactions aboutit à la formation de nouveaux radicaux libres. (Hernandez et al., 1995; Lamb et Dixon, 1997). Les radicaux libres qui proviennent de l'O₂ sont appelés espèces réactives oxygénés (ERO) comme l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le radical hydroxyle (OH[•]), alors que Les radicaux libres qui sont générés de la réaction de l'oxygène avec l'azote sont appelés espèces réactives azotés (ERN) notamment le monoxyde d'azote (NO[•]) et le dioxyde de nitrogène (NO₂[•]) (Boots et al., 2008 ; Wang et al., 2011). Ces espèces réactives oxygénées et azotées regroupent non seulement des radicaux libres mais également des dérivés non radicalaires qui sont très réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux libres, parmi ces dérivés non radicalaires on distingue: l'oxygène singulier (¹O₂), l'ozone (O₃), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'acide hypochlorique (HOCl) et le peroxydinitrite (ONOO⁻) (Tableau 01).

Tableau 01 : Principales espèces réactives générées dans le système biologique

| Noms | Symboles |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Espèces radicalaires | |
| Anion superoxyde | O ₂ ^{•-} |
| Radical hydroxyle | OH [•] |
| Monoxyde d'azote | NO [•] |
| Dioxyde de nitrogène | NO ₂ [•] |
| Espèces non radicalaires | |
| Oxygène singulier | ¹ O ₂ |
| Ozone | O ₃ |
| Peroxyde d'hydrogène | H ₂ O ₂ |
| Acide hypochlorique | HOCl |
| Peroxydinitrite | ONOO ⁻ |

III-3. Sources des espèces réactives

Les ERO et les ERN sont produites dans l'organisme par de nombreux mécanismes tant endogènes qu'exogènes.

III-3.1. Sources endogènes

- La chaîne respiratoire mitochondriale; Au cours du métabolisme normale et notamment lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'anion superoxyde est produit. Si usuellement cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2%) elle peut s'amplifier avec l'augmentation du volume de l'oxygène consommé dans certaines situations tel que l'augmentation de l'intensité respiratoire (effort physique, hyperoxie) et lors des désordres inflammatoires ou nutritionnels (**Favier, 2003 ; Bonnefont-Rousselot, 2007**).
- La chaîne de transfert d'électron dans la membrane du réticulum endoplasmique; fait intervenir des cytochromes P450 qui peuvent produire des ERO au cours des réactions de détoxification des drogues et d'autres métaboliques toxiques. Ces réactions prennent lieu principalement au niveau du foie (**Barouki, 2006**).
- L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire (**Martinez-Cayuela, 1995**).
- La xanthine oxydase est une enzyme qui joue un rôle important dans le catabolisme des purines. Elle génère des ERO lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, et de la xanthine en acide urique (**Harrison et al ., 2003**).
- L'activation des phospholipases induit la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est métabolisé par la cyclo oxygénase et la lipo-oxygénase en prostaglandines et leucotriènes respectivement.

Cette voie implique un transfert d'électrons qui pourrait initier la formation des ERO, principalement de superoxyde (**Adibhatla et Hatcher, 2006**).

III-3.2. Sources exogènes

- Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux libres, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma, ou des rayons ultraviolets capables de produire des anions superoxydes, de l'oxygène singulier, de radicaux hydroxyle et de peroxyde d'hydrogène (**Kohen et Nyska, 2002**).
- L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres comme d'anion superoxyde par induction de la transcription des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P450 (**Milane, 2004**).
- Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides et herbicides) et médicaments (antibiotiques et anticancéreux) peuvent contribuer à la production des ERO qui se forment comme produits de leur métabolisme *in vivo* (**Martínez - Cayuela, 1995**).

III-4. Rôle physiologique des espèces réactives

La production des ERO et des ERN est permanente et physiologique, elle n'est pas limitée aux conditions pathologiques, car ces espèces réactives participent à de nombreuses fonctions biologiques (**Kocchilin-Ramonatxo, 2006**). A titre d'exemple le NO[•] est une espèce réactive très répandue qui agit comme une molécule de signalisation dans divers phénomènes physiologiques notamment la vasodilatation des cellules musculaires lisses, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les mécanismes de défense (**Favier, 2003 ; Valko et al., 2006 ; Singh et al., 2008 ; Boots et al., 2008**). Ces espèces réactives (O₂^{•-}, H₂O₂, NO[•], ONOO⁻, HOCl) participent aussi à la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes (**Favier, 2003 ; Roberts et Sindhu, 2009**).

III-5. Pathogénie du stress oxydatif

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution a été démontré (**Favier, 2003**). En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydatif est potentiellement

impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (**Pincemail et al. 2002**) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète. En effet, la plupart des maladies induites par la stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux libres (**Sohal et al., 2002**).

III-6. Systèmes de défenses antioxydants

Pour limiter les effets délétères des ERO et leurs conséquences physiopathologiques, l'état rédox intracellulaire est équilibré par des systèmes antioxydants (**Leopold et Loscalzo, 2009**). Ces systèmes antioxydants sont soit des enzymes qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes en molécules stables soit des molécules non enzymatiques qui piègent rapidement les espèces réactives (**Valko et al., 2006**).

III.6.1. Les antioxydants enzymatiques

Les enzymes anti oxydantes représentent un système très important pour la défense contre l'attaque radicalaire (détoxification enzymatique) et incluent principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glucose-6 phosphodéshydrogénase (G6PD). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire. (**Oltra et al., 2001 ; Devi, 2007**).

III.6.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques peuvent être d'origine endogène ou exogène. Parmi les antioxydants endogènes on peut citer le glutathion réduit, les thioredoxines, les glutaredoxines, les métallothionéines, l'acide lipoïque ou les polyamines. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (**Favier, 2003**). Les protéines comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants en chélatants les métaux de transition (Fer et cuivre) qui participent dans la génération des espèces très réactives (**Cemeli et al., 2009**). Par ailleurs, les antioxydant exogènes sont apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone) et les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (**Pincemail et al., 2002 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Les oligo-

éléments comme le sélénium, le zinc, le manganèse et le fer sont aussi considérée comme des antioxydants nutritionnels.

Ils servent notamment de cofacteur aux enzymes antioxydants (la glutathion peroxydase, la SOD cytosolique, la SOD mitochondriale, la G6PD et la catalase respectivement) (**Berger, 2003 ; Fang et al ., 2002**). Les polyphénols (flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques) sont aussi des puissants antioxydants nutritionnels capables de complexer les métaux de transition et d'inhiber la propagation de la réaction radicalaire en piégeant différentes espèces réactives (**Valko et al , 2006**).

IV. Activité antimicrobienne

IV-1. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1995**).

IV-2. Les infections bactériennes

Une infection bactérienne est un ensemble de troubles qui résultent de la pénétration d'une bactérie pathogène dans un organisme. Elle peut être :

- locale, lorsqu'elle se manifeste uniquement au niveau où les germes ont pénétré ;
- générale, lorsqu'un germe franchit les barrières opposées par l'organisme à son entrée (peau, muqueuses) ou au niveau des ganglions, il pénètre dans le sang et se dissémine par celui-ci dans tout l'organisme ;
- focale : c'est l'infection en foyer dans les tissus ou organes où les germes sont apportés par la circulation sanguine. (**Pocidalò et al. 1989 ; Marc et al. 2001**).

IV-2-1. Thérapeutique des infections bactériennes

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. (**BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1995**). Les antibiotiques sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques.

IV-2-2. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les bactéries par différents mécanismes;

- Les antibiotiques agissent sur la synthèse de la paroi bactérienne et bloquent la transpeptidase qui intervient pour synthétiser la paroi des cellules-filles en provoquant la formation de paroi incomplète aboutissant à l'éclatement de la bactérie, comme la β lactamines, la bacitracine et la vancomycine.
- Les antibiotiques altèrent la membrane cytoplasmique et la dissocient ce qui entraîne une fuite du cytoplasme comme la polymyxine et la colistine.
- Les antibiotiques empêchent la synthèse des protéines bactériennes; L'ADN du noyau transmet à l'ARN messenger (ARNm) le code de synthèse des protéines. Cet ARNm vient en contact du ribosome rencontré l'ARN de transfert (ARNt) qui apporte les aminoacides. Certains antibiotiques empêchent la libération de l'acide aminé par la ARNt. comme les tétracyclines.
- D'autres antibiotiques gênent la lecture du code de synthèse sur l'ARN messenger. comme les aminosides. Le chloramphénicol inhibe l'enzyme qui permet aux acides aminés codés des'assembler en polypeptide utile.
- les antibiotiques agissent en gênant la réplication de l'ADN nucléaire comme la rifamycine et l'acide nalidixique (**Duval et al. 1985**).

IV-2-3. Résistance des antibiotiques

La résistance d'une espèce bactérienne à un antibiotique se développe au fur et à mesure que l'antibiotique est administré. Elle se traduit par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice.

Dans 10%, cette résistance est due à des modifications génétiques de la bactérie, alors que dans 90% des cas cette résistance est due à l'acquisition de plasmides qui sont des molécules d'ADN se trouvant dans le cytoplasme des bactéries. Le transfert des plasmides se fait par conjugaison, par mobilisation ou par transformation.

La résistance plasmidique permet à la bactérie d'élaborer des enzymes capables de détruire la molécule d'antibiotique par exemple des β lactamases pour les β lactamines, des adénylases-acétylase-phosphorylases pour les aminosides, les tétracyclines, et les sulfamides.

Cette résistance des germes aux antibiotiques explique l'importance de l'antibiogramme qui permet de choisir l'antibiotique le plus efficace vis à vis d'un germe déterminé et la mise en évidence des germes multi résistants dont la dissémination doit être évitée en milieu hospitalier (**Berche et al. 1989 ; Hamza, 1993 ; Fatorrusso et al. 2001**).

V. La coagulation

V-1.Généralité sur l'hémostase

L'hémostase correspond aux phénomènes qui permettent d'interrompre un saignement lors d'une lésion vasculaire. Un ensemble de mécanismes équilibre cette hémostase entre les deux extrêmes que sont l'hémorragie et la thrombose. Ce phénomène adaptatif du sang, également appelé par abus de langage coagulation, est décomposé en trois étapes: l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire et la fibrinolyse (**Allain P. Médicaments et coagulation. Les médicaments (3^e édition). CdM éditions 2000, 500p et mise à jour 2008: www.pharmacorama.com**).

V-1-1. L'hémostase primaire

C'est l'ensemble des phénomènes vasculoplaquettaires permettant l'arrêt d'une hémorragie par la formation du clou plaquettaire sur la lésion endothéliale vasculaire (**Allain P. Médicaments et coagulation. Les médicaments (3^e édition). CdM éditions 2000, 500p et mise à jour 2008: www.pharmacorama.com**).

V-1-2. La coagulation (hémostase secondaire)

Cette étape aboutit à la formation d'un réseau de fibrine qui consolide le thrombus ou clou plaquettaire. Elle se décompose en une cascade de réactions enzymatiques faisant intervenir de nombreux facteurs. Les facteurs de coagulation sont désignés par des numéros allant de I à XIII qui interviennent dans l'ordre décroissant. Chaque facteur existe sous forme inactivée et activée (cette dernière forme est indiquée par la lettre a). Les facteurs II (prothrombine), VII (proconvertine), IX (anti-hémophilique B) et X (Stuart), désignés par le terme PPSB (Prothrombine, Proconvertine. Anti-hémophilique B, Stuart), sont des facteurs vitamine K-dépendants. La prise d'antagonistes de la vitamine K conduira à une diminution de leur synthèse.

Selon le modèle traditionnel, la coagulation met en jeu deux voies, extrinsèque et intrinsèque, aboutissant à une voie finale commune. (**Allain P. Médicaments et coagulation. Les médicaments (3^e édition). CdM éditions 2000,500p et mise à jour 2008: www.pharmacorama.com**).

V-1-2. 1. La voie intrinsèque

Dans cette voie de coagulation tous les éléments nécessaires de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII par leur contact aux structures électronégatives de la matrice sous-endothéliale

(Collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes) (**Vogler et al., 2009**). Le facteur XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX (**Vogler et al., 2009**). Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes (PS) par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son co-facteur, le facteur VIII, le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X. Ce dernier forme avec son cofacteur (le facteur V), les phospholipides plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium, le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine en thrombine (**Ajjan et Grant, 2006**).

V-1-2. 2. La voie extrinsèque

C'est la voie qui fait intervenir un nombre limité de facteurs (**Caen et al, 1975**). Cette voie est activée par un facteur non plasmatique qui est le facteur tissulaire, une glycoprotéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales et les cellules de la matrice sou-endothéliale. Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui permet l'interaction avec le facteur VII (pro-convertine) pour former un complexe enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII). Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquent de prothrombine en thrombine (**Colvin, 2004**).

La thrombine formée par les deux voies, catalyse la conversion de fibrinogène (FI) en monomères de fibrine qui s'associent les uns aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (**Ajjan et Grant, 2006**). Les différentes étapes de coagulation sont présentées dans la figure suivante :

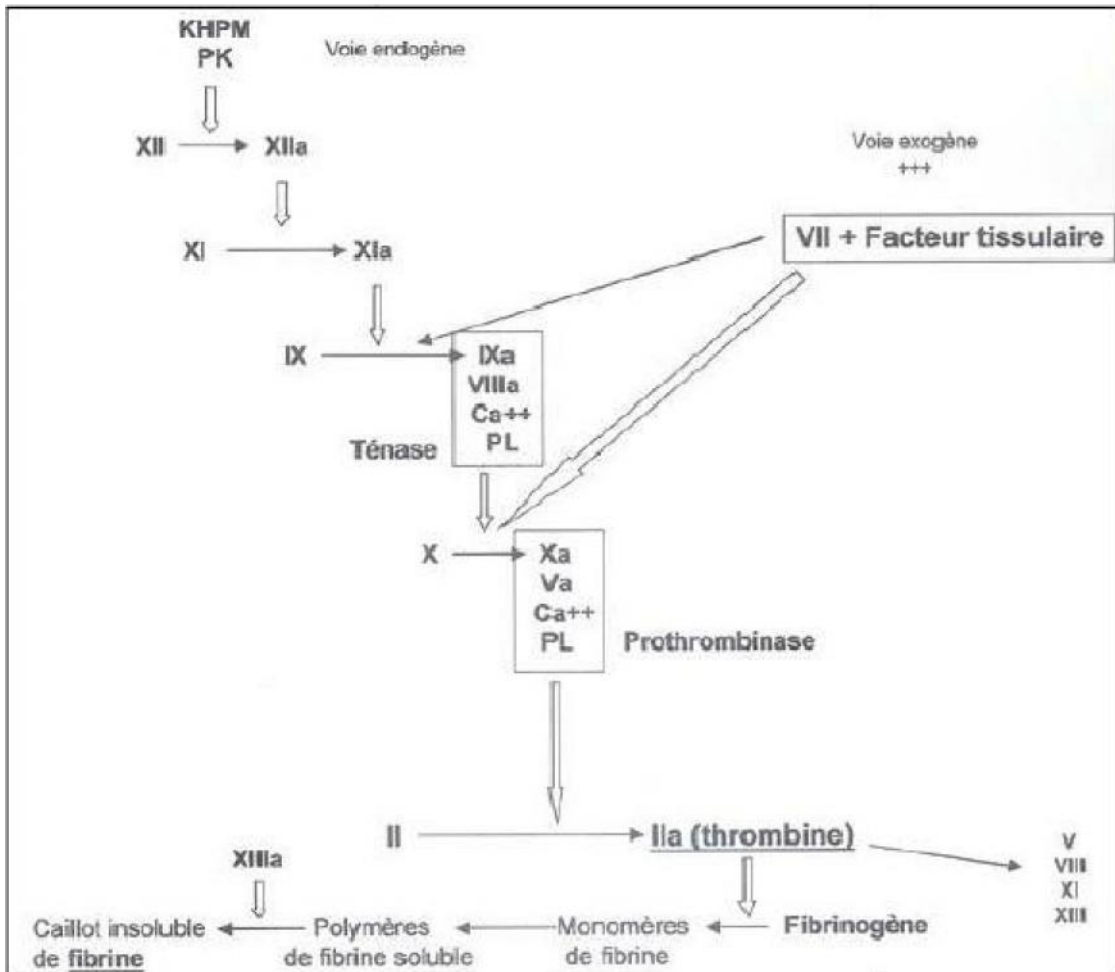


Figure 02. Etapes de coagulation (Christian NEU, 2011).

V-1-3. La fibrinolyse :

La fibrinolyse est un phénomène en équilibre constant avec la coagulation, Ce processus permet, grâce à la plasmine, de lyser le caillot formé ainsi que les déchets de fibrine circulants sans pour autant provoquer d'hémorragies en détruisant les clous hémostatiques ou le fibrinogène. La plasmine, appelée aussi fibrinolyse, est une protéase qui hydrolyse la fibrine en fragments appelés produits de dégradation de la fibrine mais elle hydrolyse également le fibrinogène et d'autres facteurs de la coagulation.

La plasmine provient de l'activation du plasminogène par le t-PA (tissue plasminogen activator) et l'u-PA (urokinase plasminogen activator). Le plasminogène est une glycoprotéine présente dans le plasma, inactive, bien que se fixant sur la fibrine.

La libération des activateurs du plasminogène est stimulée par les dépôts de fibrine et par la thrombine. Il existe des inhibiteurs endogènes du t-PA et de l'u-PA appelés plasminogen activator inhibitor (PAI) qui, en inhibant les activateurs, réduisent la transformation du plasminogène en plasmine et donc l'activité fibrinolytique. (www.pharmacorama.com).

V-2. Les excès de coagulation (les thromboses)

Les excès de coagulation sont moins fréquents et provoquent des thromboses dans les vaisseaux.

V-2-1. Les thromboses artérielles

La thrombose artérielle est un caillot ou thrombus blanc constitué d'amas plaquettaire consolidé par un réseau fibrineux et elle se forme habituellement après l'érosion ou la rupture de la plaque athéromateuse liée à l'évolution de l'athérosclérose, cette thrombose est connue sous le nom d'athérothrombose (**Franchini M, Mannucci PM. Venous and arterial thrombosis: Different sides of the same coin?. *European Journal of Internal Medicine* 2008; 19: 476–481**). L'athérothrombose est considérée actuellement comme la cause principale de la mortalité dans le monde, elle est responsable des complications cliniques très dangereuses regroupées en trois catégories : les syndromes coronariens aigus, l'accident vasculaire cérébral et l'ischémie aiguë des membres inférieurs (**Jensen R. Clinical Presentation of Arterial Thrombosis vs. Venous Thrombosis. *Clinical Hemostasis Review* 2002; 16(8):1-6**).

V-2-2. Les thromboses veineuses

La thrombose veineuse ou phlébite profonde est liée à la formation d'un caillot de sang qui bouche une veine. Elle survient le plus souvent dans une veine des jambes, mais elle peut survenir sur presque toutes les veines de l'organisme (bras, cerveau, tube digestif, reins, etc.). Les veines superficielles, sous la peau, peuvent aussi être touchées par une phlébite, on parle alors de phlébite superficielle (**LEONI, 2001**).

V-3. Traitement des maladies thrombotiques

Le traitement pharmacologique est primordial pour limiter les dommages des thromboses artérielles et veineuses. L'objectif de ce traitement est la ré-canalisation du vaisseau occlus et l'évitement d'une ré-occlusion précoce. Actuellement, il existe trois classes d'agents pharmacologiques anti-thrombotiques utilisables, les antiagrégants, les anticoagulants, et les fibrinolytiques.

V-3-1. Les antiagrégants

Les antiagrégants (aspirine, ticagrelor, clopidogrel...) représentent à l'heure actuelle le traitement de référence des thromboses artérielles (**AUBRY et HALNA DU FRETAY, 2010**) mais les anticoagulants sont aussi recommandés en association avec les antiagrégants et les fibrinolytiques pour traiter les syndromes coronaires aigus et l'infarctus cérébral (**HELFT et LEGER, 2009**).

V-3-2. Traitements fibrinolytiques

Le but du traitement fibrinolytique (streptokinase, urokinase, activateur tissulaire de plasminogène...) est de lyser le thrombus artériel ou veineux. Ce traitement est associé le plus souvent à un traitement antiagrégant et anticoagulant (**CROZIER et WOIMANT, 2007**).

V-3-3. Les anticoagulants

Les anticoagulants représentent le traitement principal de la maladie veineuse thromboembolique. De nombreux anticoagulants agissant à différents niveaux de la cascade de la coagulation sont utilisés et ils sont regroupés en trois classes. Deux classes d'anticoagulants classiques (les héparines et les anti vitamines K) et la classe des nouveaux anticoagulants (**BATTY et SMITH, 2013**).

V-3-3-1. Les héparines

Il existe deux types d'héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée, l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP).

L'héparine non fractionnée est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées de taille (poids moléculaire varie de 5000 à 35000 daltons) et de structures différentes extraites de la muqueuse Intestinale de porc. Alors que les héparines de bas poids moléculaire sont issues de la dépolymérisation des chaînes polysaccharidiques de l'HNF par des procédés chimiques ou enzymatiques, leurs poids moléculaires varient de 3000 à 5000 daltons. L'HNF et les HBPM forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation. Le complexe HNF-antithrombine III inactive notamment les facteurs Xa et la thrombine (facteur IIa), mais à un moindre degré les facteurs IXa, XIa et XIIa, alors que le complexe HBPM-antithrombine III inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (**BATTY et SMITH, 2013**).

V-3-3-2. Les anti vitamines K

La vitamine K est un élément nécessaire dans la synthèse au niveau du foie de quatre facteurs de la coagulation, la prothrombine II, la proconvertine VII, le facteur stuart X, et le facteur antihémophilique B (le facteur IX). Elle intervient dans la carboxylation des molécules d'acide glutamique de l'extrémité-N-terminale de la chaîne glycoprotéinique de chacun de ces facteurs. Cette carboxylation est nécessaire pour l'activité biologique et la fixation de ces facteurs sur les surfaces phospholipidiques plaquettaires (HELFT et LEGER, 2009).

V-3-3-3. Les nouveaux anticoagulants

Des nouveaux anticoagulants sont actuellement utilisés à côté des anticoagulants classiques. Ces anticoagulants sont subdivisés selon leur mode d'action en deux catégories; les inhibiteurs indirects qui agissent en potentialisant l'activité de l'antithrombine III, et parmi les quelles, la fondaparinux et l'idraparinux qui sont des inhibiteurs synthétiques indirects et sélectifs du facteur Xa et ils sont constitués de 5 unités saccharides capables de modifier la conformation en augmentant l'activité inhibitrice naturelle de l'antithrombine I III sur le facteur Xa. Les inhibiteurs directs agissent directement sur le facteur Xa ou la thrombine, et parmi les quelles, le DX-9065a, l'hirudine, L'argatroban...etc.

Le DX-9065a est un dérivé synthétique de l'acide propanoïque qui inhibe directement le facteur Xa libre et le facteur Xa lié dans le complexe prothrombinase, alors que l'hirudine est un peptide de 65 acides aminés extrait de la glande salivaire d'une espèce de ver (*Hirudo medicinalis*) et il inhibe directement et de façon irréversible la thrombine. L'argatroban est un dérivé synthétique d'acide carboxylique qui inhibe directement la thrombine (GIRARDEL et SAMAMA, 2006).

VI. L'hémolyse

VI-1. Définition

L'hémolyse (hemo: sang, lyse: perturbation) c'est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal, (Thomas, 2013). Cependant, dans certains cas l'hémolyse est exagérée, réduisant la durée de vie des hématies on parle alors d'une hyper hémolyse, (Ucar, 2002).

VI-2. Hémolyse physiologique

L'hémolyse physiologique est la destruction du globule rouge après une durée de vie 120 jours par vieillissement, elle est compensée immédiatement par la moelle osseuse, sans répercussion clinique ni biologique.

Les globules rouges âgés, après une durée de vie normale de 120 jours, sont phagocytés par les macrophages du système des phagocytes mononucléés. Chez le sujet normal, la majorité des globules rouges sont détruits dans les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50 %), le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier la rate et le foie. (Wiltink et al., 1972).

VI-2-1. Signes biologiques

La phagocytose porte sur les GR dont le vieillissement s'est traduit par :

*Modifications des biochimiques : diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaires, phénomènes oxydatifs.

*Modifications morphologiques : tendance à la sphérocytose par réduction de la surface membranaire et/ou hyper hydratation.

*Modifications de la plasticité : diminution de la déformabilité des globules rouges entraînant une stagnation dans les capillaires.

VI-2-2. Conséquences de l'hémolyse physiologique

Chaque jour, la destruction de 1/120 de globules rouges libère 6 à 8 g d'hémoglobine qui va être catabolisée :

- La partie globinique est hydrolysée en acides aminés qui rejoignent le pool métabolique général.

-La partie héminique est dégradée par une hème-oxygénase qui ouvre le cycle tétrapyrrolique et libère le fer. (Wiltink et al., 1972).

VI-3. Hémolyse pathologique

L'hémolyse pathologique est due à un vieillissement prématuré des globules rouges, une destruction indépendante de leur âge. Il s'agit d'une exagération du phénomène physiologique avec diminution de la durée de vie du GR ce qui entraîne une anémie hémolytique souvent très grave. Deux causes de l'hémolyse pathologique : intrinsèques et extrinsèques. (Dominik et al., 2013).

VI-3-1. Causes intrinsèques ou intra corpusculaires

Elles concernent les anomalies constitutionnelles du GR (congénitales et héréditaires) :

*Anomalies de l'hémoglobine : syndromes thalassémiques définis par absence ou diminution de production de chaînes de globine, et anomalies de structure de l'hémoglobine responsables de l'hémoglobinose.

*Anomalies de la membranaire : elliptocytose héréditaire, acanthocytose constitutionnelle, stomatocytose, et hémoglobinurie paroxystique nocturne.

*Anomalies enzymatiques : déficit en G6PD (Glucose 6 Phosphate Deshydrogénase) et Pk (pyruvate kinase). Ceci entraîne une diminution de la production d'énergie avec perturbation du processus métabolique de la glycolyse.

VI-3-2. Causes extrinsèques ou extra corpusculaires

Il s'agit d'agressions externes diverses entraînant une fragilisation de la membrane érythrocytaire :

*Hémolyse mécanique : qui se produit par fragmentation du globule rouge, se rencontre lors de micro angiopathie et aussi porte de prothèses cardiaques.

*Hémolyse immunologique : réaction antigène-anticorps avec fixation du complément.

*Hémolyse infectieuse : deux mécanismes interviennent, soit infection bactérienne(perfringens, streptocoques), ou infection parasitaire(paludisme, toxoplasmose).

(Dominik et al., 2013).

VI-3-3. Conséquences de l'hémolyse pathologique

VI-3-3-1. Signes d'hémolyse intra tissulaire

-Splénomégalie.

-Hyper bilirubinémie libre, ictère.

-Augmentation des excréctions fécales.

-Fer sérique très élevée.

-Anémie par diminution de l'hémoglobine. (**Otmani. H, 2009**).

VI-3-3-2. Signes d'hémolyse extra vasculaire

-Diminution du taux d'haptoglobine.

-Hémoglobinémie si les capacités de fixation sont dépassées.

-Hémoglobinurie si l'hémoglobinémie excède les capacités de transport de l'haptoglobine.

-Bilirubine libre élevé.

-Met hémalbumine.

-Diminution d'hémopexine. (**Otmani. H, 2009**).

VI-4. Traitement de l'hémolyse pathologique

Les traitements d'une hémolyse pathologique sont aussi nombreux qu'il y a de formes différentes d'anomalies hémolytiques :

- *Une supplémentation en acide folique notamment pour les patients avec une anémie hémolytique chronique.
- *Une transfusion sanguine si nécessaire.
- *Dans certains cas, une ablation de la rate (splénectomie).
- *Chez les personnes splénectomisées, la vaccination est recommandée afin de minimiser le risque infectieux chez des patients aux défenses immunitaires basses.
- *Des corticoïdes, des immunoglobulines ou des immunosuppresseurs lorsque l'anémie est auto-immune ou à composante inflammatoire. (<https://douleurs-musculaires.ooreka.fr>).

Matériel et méthodes

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante, antibactérienne, anticoagulante et anti hémolytique de l'extrait méthanolique de la plante médicinale: *Senecio cineraria*. La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de biologie, **Université Abbés Laghrour - Khenchela-**.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Matériel végétal

Il est constitué de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante médicinale *Senecio cineraria* (EMSC) récoltée dans la région de el kalla wilaya de Tarf Algérie pendant le mois de mai 2016 et identifiée par docteur Nabila Suilah au laboratoire de valorisation des ressources naturelles, molécule bioactives et analyses physicochimiques et biologiques, à l'université Constantine1.

I.1.2. Souches bactériennes

Afin de tester le potentiel antibactérien de EMSC *in vitro*, cinq souches bactériennes deux Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) et trois Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ont été utilisées. Les souches proviennent de l'Institut de la Nutrition Alimentation et Technologie Agro Alimentaire de Constantine (INATAA)

I.1.3. Echantillons du sang

Six échantillons de sang ont été recueillis à partir des personnes saines pour l'évaluation de l'activité anti-coagulante et anti-hémolytique.

I.2. Les médicaments

Quatre médicaments ont été utilisés comme contrôle positif :

- Les antibiotiques : pénicillines et ofloxacine de concentration 10 UI et 5µg respectivement pour l'activité antibactérienne ;
- Le médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI pour l'activité anticoagulante ;
- Le médicament antihémolytique «Dicynone » de concentration 250 mg pour l'activité antihémolytique.

I. 3. Réactifs chimiques et équipements

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl₃, HCl, acide acétique, NaOH, NH₄OH, KI, I₂, NaCl, AlCl₃, diméthyl sulfoxide (DMSO), quercétine, méthanol, n-butanol, *Éther de pétrole*, *acétate d'éthyle*, chloroforme, toluène, acétone, éthanol, dichlorométhane, hexane ; proviennent tous de Sigma-Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Spectrophotomètre (spectrum SP-UV 2005), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (VILBER LOURMAT), Bain Marie (nive bath, MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOGEX), Vortex (VELP), Balance analytique (OHAUS), Balance (KERN PCB), Centrifugeuses (EZ Swing 3K, Rotofix 32 A), Réfrigérateurs (Liebherr), Plaque chauffante (LabTech), Autoclave (Raypa) et pH mètre (Hanna instruments).

II. Méthodes

II.1. Préparation et étude phytochimique de l'extrait méthanolique de la plante médicinale *S. cineraria*

II.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique

La partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de la plante a été bien nettoyée et séchée à température ambiante et à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil. Enfin, la plante sèche a été pulvérisée à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation. La méthode de Markham (**Markham, 1982**) était suivie pour la préparation d'extrait méthanolique; 950 g de la poudre végétale est introduit dans un bécher qui contient le mélange hydroalcooliques; méthanol /H₂O (7:3) pendant une nuit (macération alcoolique). Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, elle dure dans chaque fois 24 heures. Le méthanol est ensuite éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite à 55 °C dans un Rotavapeur (HAHNVAPOR) pour obtenir l'extrait brut méthanolique.

II.1.2. Caractérisation phytochimique de la plante

Les tests de screening phytochimique sont des réactions physicochimiques qui permettent de caractériser la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et responsables de propriétés pharmacologiques; Ils ont été réalisés à base de précipitations ou de colorations caractéristiques.

A. Identification des flavonoïdes

On ajoute à 05 ml d'extrait, quelques gouttes de AlCl_3 (01%). L'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonoïdes (**Edeaga et al., 2005**).

B. Identification des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 2%, ont été ajoutées à 2 mL de l'extrait brut méthanolique. La solution obtenue a été reposée pendant quelques minutes. Le test est considéré positif s'il ya l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (**Karumi et al., 2004**).

C. Identification des saponines

5 ml de l'extrait brut méthanolique ont été mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides (**Karumi et al., 2004**).

D. Identification des alcaloïdes

5ml d'HCl 1% ont été ajoutés a 1 ml d'extrait. Le mélange est chauffé au bain marie, puis traité séparément par le réactif de BOUCHARDAT (réactif iodo-ioduré) qui donne une précipitation brun rougeâtre (**MAJOB et al., 2003**).

II.1.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes de l'extrait a été quantifié par la méthode du trichlorure d'aluminium (**Boharun et al, 1996**); 1 ml de l'extrait (préparés dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage $y= ax+b$ établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-40 $\mu\text{g} / \text{ml}$, chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les extraits servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes à été exprimé en milligrammes équivalent de quercétine par gramme du poids d'extrait (mg EQ / g E) (**Figure 03**).

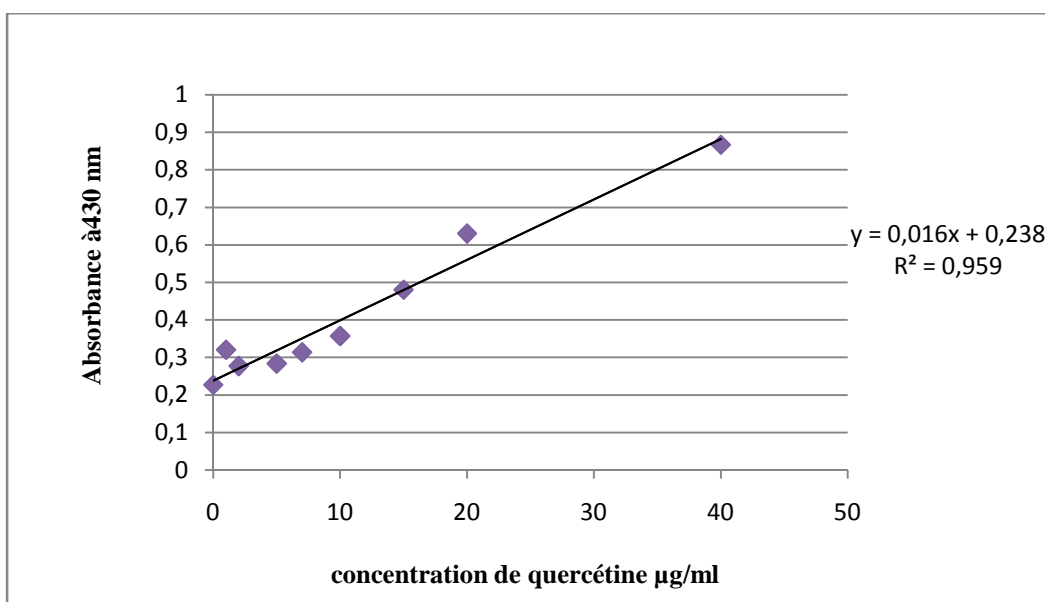


Figure 03. Courbe d'étalonnage de la quercétine

II.1.4. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation rechercher, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal –Rf- et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures.

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium. L'extrait a été déposé à l'aide d'une micropipette (2 µl) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque. Ensuite, les plaques ont été placées dans les cuves de développement dans les quelles se trouve un système de solvants approprié appelé phase mobile, à environ 0,5 cm de hauteur. La migration a été effectuée par l'utilisation de sept systèmes de solvants:

- **Système 01 :** Acétate d'éthyle-Acide formique-Acide acétique- Eau distillée (100-11-11-26).
- **Système 02 :** Butanol-Acide acétique-Eau distillé (04/01/05).
- **Système 03 :** Chloroforme-Acétone-Ammoniaque10% (80/40/18).
- **Système 04 :** Acétone-Eau distillé (01/01).
- **Système 05 :** Chloroforme-Méthanol-Eau distillé (65/45/12).
- **Système 06 :** Butanol-Acide acétique-Eau distillé (02/03/05).

➤ **Système 07** : Acétate d'éthyle-Acide acétique-Acide formique (100/11/11).

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant / la distance parcourue par le solvant. Ce facteur permet de mentionner une information préliminaire sur la structure des substances flavoniques.

Après développement, les plaques ont été séchées, puis visualisées séparément par une lampe UV à 254 et 365 nm. Les rapports frontaux (R_f) des spots issus de la séparation ont été calculés selon le rapport suivant :

$$R_f = d / D$$

d: Distance parcourue par la substance

D: Distance parcourue par le solvant

Ce facteur permet de mentionner une information préliminaire sur la structure des substances flavoniques.

II.2. Evaluation des activités biologiques *in vitro* de l'EMSC

II.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

La capacité de l'extrait à piéger les radicaux libres est déterminée par une méthode colorimétrique, simple et rapide; la méthode de Koleva (**Koleva et al., 2002**) qui utilise le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) qui, à l'état stable, possède une coloration violette foncée qui absorbe à 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution en jaune pâle (**Figure 04**).

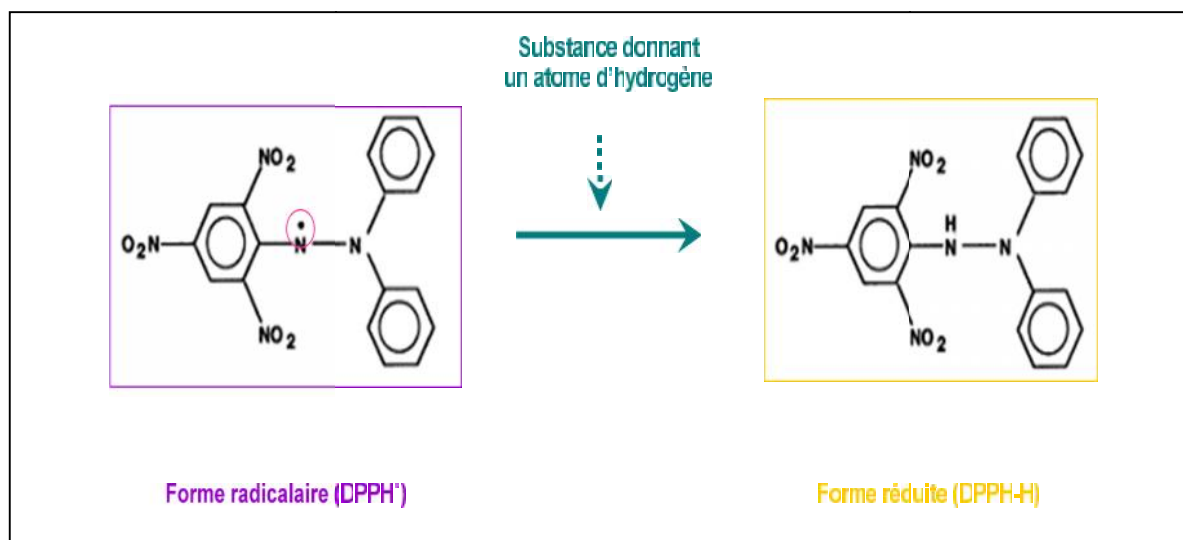


Figure 04. La réduction du DPPH• par un antioxydant (**Molyneux, 2004**)

Le DPPH° 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) a été solubilisé dans du méthanol absolu pour avoir une solution de 100 μ M. A partir d'une solution méthanolique mère de $C_1= 10$ mg/ml de chaque extrait, les dilutions suivantes ont été préparées : $C_2=100$ mg/ml, $C_3= 70$ mg/ml, $C_4= 50$ mg/ml, $C_5=30$ mg/ml, $C_6=20$ mg/ml, $C_7: 15$ mg/ml, $C_8=10$ mg/ml, $C_9=05$ mg/ml.

A chaque volume de 1,5 ml de la solution méthanolique du DPPH°, un volume de 15 μ l de chaque concentration préparée de l'extrait est ajouté. Après agitation et incubation à la température ambiante pendant 15 min, les densités optiques des mélanges réactionnels sont mesurées par le spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions par le méthanol.

L'activité antioxydante est comparée à celle d'un flavonoïde commercial qui est la quercétine qui est à son tour déterminée de la même façon que celle de l'extrait. Les résultats ont été exprimés par le pourcentage d'inhibition (% PI du DPPH°= $[(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$) et par le paramètre IC₅₀ ou la concentration efficace de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH°. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Brand-Williams et al., 1995; Atoui et al., 2005).

II.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* a été évalué par la technique de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri. Pour les résultats montrant un effet positif contre les souches bactériennes testées, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée sur milieu liquide.

II.2.2.1. Méthode des disques -Tests d'efficacité-

A. Préparation de l'inoculum

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum. L'inoculum bactérien de chaque souche a été préparé dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à partir de culture pure de 24 h. La densité a été ajustée à 0.5 Mack Ferland (voire Annexe 5) (DO=0.08-0.10 lue à 625nm). La densité optique des suspensions a été ajustée à 0,5 Mc Ferland.

B. Ensemencement

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, un écouvillon est trempé dans la suspension et son contenu est étalé à la surface entière de la gélose Mueller-Hinton à trois reprises. Après chaque application, on a tourné la boîte de 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum.

C. Préparation des disques d'aromatogramme

Des disques de papier Wattman N°3 stériles de 5 mm de diamètre, imprégnés chacun de l'extrait repris dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) à raison de 100 mg/ml, ont été déposés à l'aide d'une pince à la surface du milieu gélosé. Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 30 min à la température ambiante pour une prédiffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h.

Des témoins négatifs (disques imprégnés par le DMSO) et positifs disques d'antibiotiques ont été testés. L'Ofloxacin (OFX) et Pénicilline (P) sont les antibiotiques choisis en raison de leur spectre d'action assez large et de leur utilisation fréquente en milieu hospitalier pour le traitement des infections causées par la plupart des germes de notre étude. Les expériences ont été réalisées en trois répétitions.

D. Incubation et lecture

Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) ont été mesurés autour des disques après une pré-incubation de 30 minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 ou 48 heures selon le germe.

L'effet de l'extrait se traduit par l'apparition autour du disque d'un halo translucide correspondant à l'absence de la croissance bactérienne. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (**Choi et al., 2006**).

En effet les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD (standard déviation). La souche ayant un diamètre $D < 8\text{mm}$, $9 \leq D \leq 14\text{mm}$, $15 \leq D \leq 19\text{mm}$, $D \geq 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++), extrêmement sensibles (+++). (Figure 05 montre les différentes étapes).



Figure 05: Différentes étapes de l'activité antibactérienne

II.2.2.2. Détermination de la concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La CMI a été déterminée en utilisant la technique de micro-dilution avec le bouillon Muller Hinton par des microplaques à fond en U (NCCLS, 1997).

La CMI de l'EMSC a été déterminée selon le protocole suivant :

- 90 µl de bouillon Muller Hinton ont été répartis dans tous les puits de la microplaque;
- 100 µl d'EMCS ont été distribués dans les premiers puits de la microplaque (A1, A2, A3) puis effectuons les dilutions successives (100 µl de A1 dans B1 et ainsi de suite).
- L'inoculum bactérien des souches *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* a été préparé. Les microplaques ont été inoculées avec de 10 µl de la suspension bactérienne (diluée au 1/10ème) pour obtenir un volume final de 200 µl ;
- Des puits A6, A7, A8 et A9 ont été réservés pour les antibiotiques (contrôles positifs).

- Les puits A11 et A12 représentent respectivement le témoin de culture des bactéries et le témoin de stérilité du milieu de culture MH (contrôles négatifs) ;
- Les microplaques préparées ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, la croissance bactérienne (traduit par une turbidité) a été examinée dans chaque puits ;

La CMI d'un EMSC vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe (**Bolou et al., 2011**).

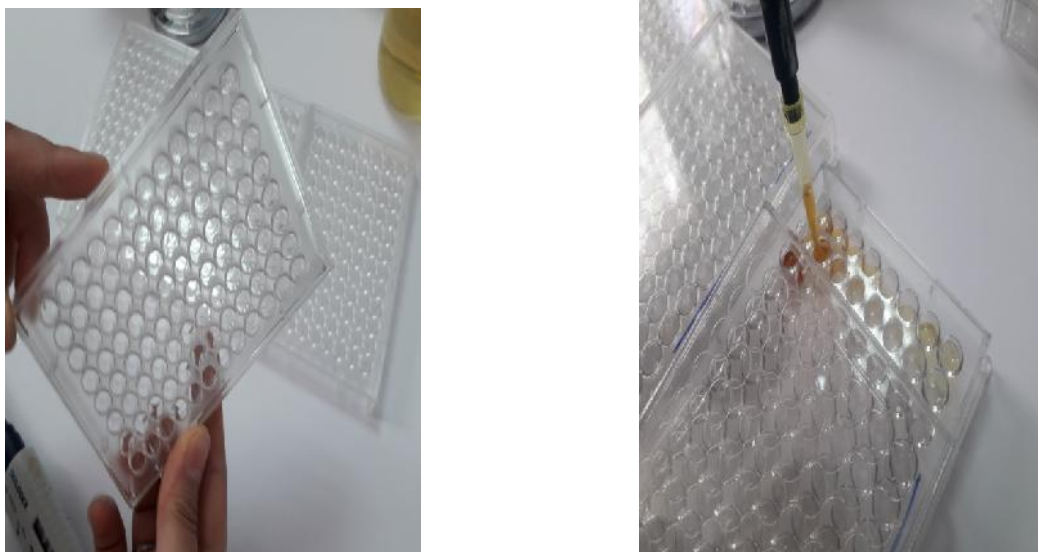


Figure 06: Microplaques utilisées pour détermination de CMI.

II.2.2.3. Synergie entre l'EMSC de plante étudiée et les antibiotiques

L'effet synergique de l'extrait avec les antibiotiques a été évalué par la méthode de diffusion des disques décrite précédemment. Des disques d'antibiotique ont été imprégnés par 10 μ l d'EMCS, ensuite déposés délicatement sur la gélose MH ensemencé préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurés en mm (**Saffidine K. 2015**).

Les zones d'inhibition observées pour les combinaisons ont été comparées à la moyenne des zones d'inhibition pour les antibiotiques testés seul. Une différence significative (> 5 mm) montre un effet synergique (**Saffidine K. 2015**).

II.2.3. Evaluation de l'activité anticoagulante *in vitro*

L'activité anti coagulante de l'EMSC a été évalué *in vitro* vis-à-vis la voie exogène et endogène de la coagulation, et ceci sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de 2 tests globales et chronométriques, le temps de Quick (TQ) ou nommé également Taux de Prothrombine (TP), et le Temps de Céphaline Kaolin (TCK).

II.2.3.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaquettés

Le pool plasmatique déplaquettés est un mélange de plasma déplaquettés des volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables.

Le sang de chaque volontaire a été prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur en solution anti coagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 3 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes.

II.2.3.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène

L'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène de la coagulation à été évaluer en utilisant un test de coagulation de Quick (TK) ou le temps de prothrombine (TP) qui permet une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation.

A. Principe de l'essai

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine). Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'EMSC exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

B. Protocole expérimental

Effet de l'EMSC sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon les étapes suivantes; 10 µl de l'EMSC préparé dans le DMSO (0,5 mg/ml) a été additionné à 90 µl du plasma standard, le mélange a été incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200 µl de thromboplastine pré incubé à 37 °C pendant 15 min. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide du chronomètre.

II.2.3.3. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie endogène

Le test du temps de Céphaline Kaolin (TCK) est un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de voie endogène.

A. Principe de l'essai

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'EMSC exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

B. Protocole expérimental

L'effet de l'EMSC sur la voie endogène de la coagulation a été évalué selon les étapes suivantes :

10 µl de l'EMSC préparé dans le DMSO (0,5 mg/ml) a été additionné à 90 µl du plasma pauvre en plaquettes qui est ensuite incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, 100 µl d'une solution de céphaline Kaolin ont été additionnés puis le mélange est réincubé à 37 °C pendant 3 min et la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100 µl d'une solution aqueuse de 0,025 M CaCl₂.

Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide du chronomètre.

Un médicament anticoagulant (Lovenox 2000UI) dissout dans le DMSO a été utilisé comme contrôle positif.

II.2.4. Evaluation de l'activité antihémolytique *in vitro*

L'effet antihémolytique de l'EMSC a été réalisé selon la méthode de Yang et al. (2005) :

II.2.4.1. Préparation des globules rouges

5 ml de sang d'une personne saine ont été recueillis dans des tubes traités à l'EDTA, puis centrifugés pendant 5 min à 1000 tr/min.

Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé trois fois avec du tampon phosphate saline (PBS) (0,2 M et pH 7,4) (Annexe n) puis remis en suspension dans une solution saline (4 %).

L'opération de lavage a consisté en une série de centrifugation à 1000 tr/min pendant 5 min de la suspension du culot dans le PBS.

Après la dernière centrifugation, 0,4 ml du culot a été additionné à 9,6 ml de tampon phosphate saline (0,2 M à un pH de 7,4) pour obtenir une solution érythrocytaire d'hématocrite à 4%.

II.2.4.2. Préparation de l'extrait

Différentes concentrations de l'EMSC (1 mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25 mg/ml) ont été préparés dans le PBS.

II.2.4.3. Protocole expérimental

Les différentes étapes de l'essai sont :

- Mettre dans des tubes 1 ml de la solution érythrocytaire préparée avec 0,5 ml de l'EMSC (dilué avec le PBS) à différentes concentration initiales ;
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 20 min ;
- Ajouter 0,5 ml de la solution de NaCl (2 %) dilué avec le PBS au mélange réactionnelle ;
- Centrifuger les tubes à 1000 tr/min pendant 10 min ;
- Récupérer le surnageant ;
- Lire l'absorbance du surnageant (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre ;
- L'hémolyse relative à été évalué en comparaison avec l'hémolyse induit par NaCl en absence d'EMSC (contrôle négatif).
- Un médicament antihémolytique (Dicynone 250 mg) dissout dans le tampon PBS et en absence d'EMSC a été utilisé comme contrôle positif.
- Chaque série d'expérience a été effectuée en triplicata et le % d'inhibition de l'hémolyse par l'EMSC a été calculé.

II.2.4.4. Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule suivante (Miki et al., 1987) :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_c - A_{\text{ext}}/A_c)100$$

A_c : absorbance du control négatif.

A_{ext} : absorbance de l'extrait.

II.3. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm (déviation standard (n=3)).

Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et discussion

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne, antioxydante, antihémolytique et anticoagulante de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante médicinale *Senecio cineraria* (EMSC).

I. Résultats de la caractérisation chimique de l'EMSC

I.1. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Le criblage phytochimique réalisé sur EMSC révèle la présence de plusieurs métabolites dont les résultats sont présentés dans le **Tableau 02**.

Tableau 02 : Résultats des tests phytochimiques de la plante *Senecio cineraria*.

| Métabolites secondaires | L'observation | Résultat |
|-------------------------|--|----------|
| Flavonoïdes | Apparition d'une couleur jaune | ++ |
| Tanins | Apparition d'une couleur bleu noir Absence d'un précipité | + |
| Saponines | Absence d'une mousse | - |
| Alcaloïdes | Apparition d'un précipité brun marron | ++ |

(+): test faiblement positif, (++) : test fortement positif, (-): test négatif

Les essais phytochimiques effectués sur l'EMSC ont révélé la présence des flavonoïdes, des tanins, et des alcaloïdes. Il est important de noter que c'est la première identification des métabolites secondaire pour la plante *S. cineraria*.

Les résultats obtenus (**Figure 07**) par l'étude phytochimique nous a donné une bonne prévision concernant l'activité biologique de la plante, bien qu'elle soit générale et imprécise, elle reste encourageante surtout que ces composés phytochimiques dont on a prouvés la présence sont connus par leurs effets pharmacologiques et d'être impliqués dans de nombreuses activités biologiques.

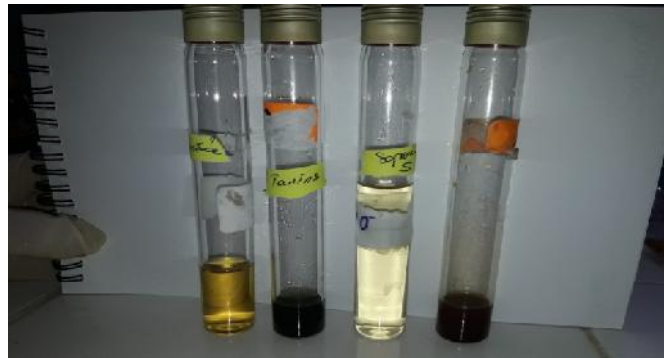
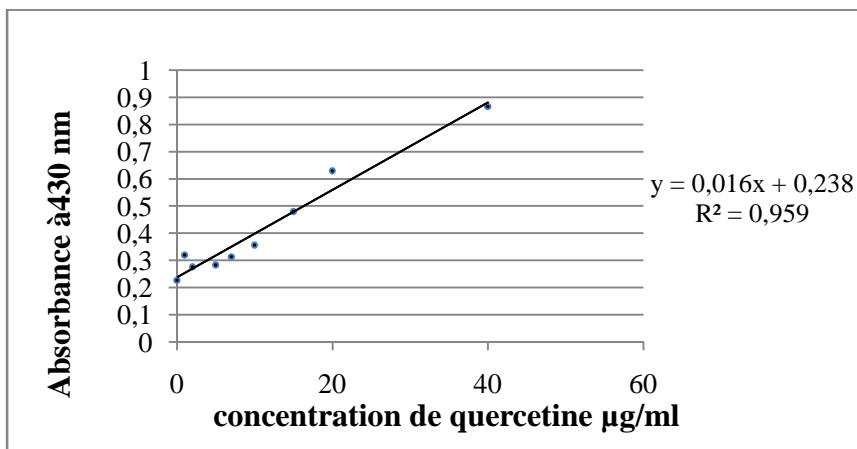


Figure 07 : Résultats du screening phytochimique

I. 2. Dosage des flavonoïdes

L'étude quantitative de l'extrait au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage (**figure 08**) a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine. Des mesures de densité optique sont réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait et déterminés par l'équation :

$$Y=0.016 X+0.238.$$



Chaque point de la courbe représente la moyenne

Figure 08: Courbe d'étalonnage de Quercétine.

Le résultat du dosage de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de *S. cineraria* est estimé à une teneur importante à l'ordre de **60.16 mg EQ/g E**.

Le choix de quantifier les flavonoïdes parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que les flavonoïdes ont des activités biologiques très importantes. (**Beta et al., 2005**; **Meddour, 2013**).

Cette valeur considérable en flavonoïdes serait responsable de leurs propriétés analgésique, antifongique, antioxydante, antimicrobienne et hémostatique (**Kabran Guy R.M. et al., 2012**).

I.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est l'une des méthodes de séparation et d'identification rapide des constituants d'un extrait végétal donné. Cette technique informe sur le contenu en flavonoïdes des extraits de plante. Pour obtenir un meilleur système de séparation, nous avons utilisés plusieurs systèmes dont 07 ont donné des résultats. Les résultats de la CCM sont représentés dans le **Tableau 03** et la **Figure 09**.

Tableau 03. Résultat de la CCM de EMSC par différents systèmes de solvant

| N° système | N° spots | Rf | Les couleurs des composés | Résultats |
|------------|----------|-----------|---------------------------|---|
| Système 1 | 02 | -Rf1=0.22 | -Bleu blanc fluorescent | -Terpènes, flavonoïdes |
| | | -Rf2=0.85 | -Orange | -Flavones, quercétine |
| Système 2 | 02 | -Rf1=0.09 | -Jaune | -Flavonols, quercétine, catéchine |
| | | -Rf2=0.7 | -Violet foncé | - Myrcétine, flavones, flavonols, flavonols substitués |
| Système 3 | 01 | -Rf=0.13 | -Violet ou mauve | Acide gallique, acide phénol |
| Système 4 | 01 | -Rf=0.93 | -Orange | Catéchine, myrcétine |
| Système 5 | 01 | -Rf=0.96 | -Orange | Anthocyanidine 3,5 diglucoside |
| Système 6 | 02 | -Rf1=0.53 | -Violet | -Flavones |
| | | -Rf2=0.82 | -Jaune | -Myrcétine |
| Système 7 | 01 | -Rf=0.26 | -Jaune-vert | -Flavonols |



Figure 09 : Quelques photos de chromatogramme résultant de l'analyse de EMSC par CCM sur gel de silice

Deux spots ont été ségrégués des dépôts de l'EMSC par les système de solvants 1 (acétate d'éthyl-acide formique-acide acétique-eau distillée), 2(butanol-acide acétique-eau distillée) et 6(butanol-acide acétique-eau distillée) , tandis que un seul spot a été obtenu par les systèmes 3 (chloroforme-acétone-ammoniaque) 4(acétone-eau distillée) 5 (chloroforme-méthanol-eau distillée) et 7(acétate d'éthyl-acide acétique-acide formique-eau distillée).

Selon la littérature la plupart des flavonoïdes ne sont pas visibles sur le gel de chromatographie (cellulose) après leur migration, à l'exception des anthocyanines qui apparaissent en spots orange et les chalcones, aurones et 6-hydroxyflavonols qui apparaissent en jaune. Pour cette raison, les chromatogrammes doivent être visionnés sous lumière UV, et les flavonoïdes deviennent visibles (fluorescents) sous cette lumière (**Markham, 1982 ,Hamlat, 2006**).

Tableau 04 : Interprétation des couleurs des spots en différentes classes de flavonoïdes

| Rf des flavonoïdes | Types des flavonoïdes | Références |
|---------------------------|------------------------------|--|
| 0.06-0.9 | Terpènes | Mamyrbekova-Bekro.J et al, 2013 |
| 0.03-0.97 | Flavonoïdes | Mamyrbekova-Bekro.J et al, 2013 |
| 0.41-0.94 | Myrcétine | Hadj.M, 2012 |
| 0.09 | Catéchine | Kholkhal.F, 2014 |
| 0.23 | | Meziti.A, 2009 |
| 0.15-0.94 | | Hadj.M, 2012 |
| 0.03-0.58 | Quercétine | Mamyrbekova-Bekro.J et al, 2013 |
| 0.09-0.59 | | Meziti.A, 2009 |
| 0.35-0.41 | | Kholkhal.F, 2014 |
| 0.52-0.92 | | Hadj.M, 2012 |
| 0.80-0.97 | Anthocyanidine diglucoside | 3,5 Said.I et al, 2016 |
| 0.13-0.64 | Acide phénol | Kholkhal.F, 2014 |
| 0.00-0.5 | Flavonols substitués | Said.I et al, 2016 |
| 0.13 | Acide gallique | Kholkhal.F, 2014 |
| 0.21 | | Hadj.M, 2012 |
| 0.38 | | Meziti.A, 2009 |
| 0.23-0.85 | Flavones | Kholkhal.F, 2014 |
| 0.07-0.75 | | Said.I et al, 2016 |
| 0.5-0.75 | Flavonols | Madjour.S, 2014 |
| 0.15-0.78 | | Meziti.A, 2009 |
| 0.04-0.41 | | Kholkhal.F, 2014 |

En se basant sur cette littérature (**Tableau 04**) et selon les couleurs des spots obtenues sur le chromatogrammes de l'extrait (**Tableaux 03 et figure 09**), on peut déduire la possibilité d'existence des types des flavonoïdes suivants : terpènes, flavonoïdes, flavones, quercétine, flavonols, catéchine, myrcétine, flavonols substitués, acide gallique, acide phénol, anthocyanidine 3,5 di glucoside.

I.4. Résultats des activités biologiques

I.4.1. Détermination de l'activité antioxydante de EMSC par la méthode de DPPH[•]

Puisque le principal mécanisme d'action antioxydante des polyphénols des végétaux est le piégeage des radicaux libres, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des végétaux par le piégeage de radicaux libres synthétiques en solution dans des solvants polaires comme le méthanol à température ambiante. Les radicaux les plus fréquemment utilisés incluent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et l'acide 2,2-0-azino-bis (3-ethylbenzoline-6-sulphonique) (ABTS).

Dans cette étude, la méthode par le DPPH[•] a été choisie pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de la plante parce qu'elle est l'une des méthodes les plus simple, les plus rapide et les plus efficace à cause de la grande stabilité du radical DPPH[•] (Bozin, et al., 2008; Nur Alam et al., 2013).

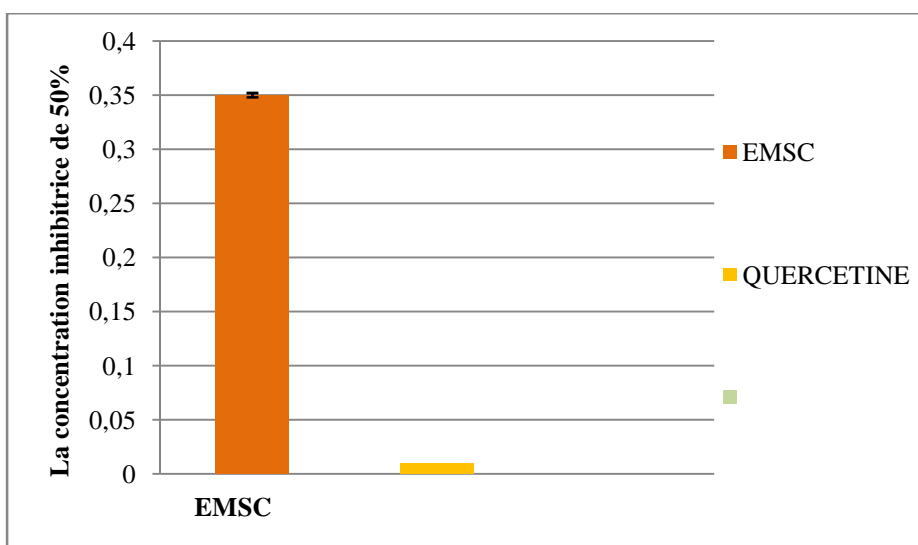
Dans le test de DPPH[•], la cinétique de décoloration de ce radicale a été suivie à 517 nm qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal comme le montre l'équation suivante.

$$\text{DPPH}^{\bullet} + \text{AH (Flavonoïde)} \longrightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\bullet} \text{ (radical flavonoxy)}$$

Le DPPH[•] présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire. Pour des fins comparatives la quercétine est utilisée comme un antioxydant standard.

Les résultats de l'activité antioxydante exercée sur le radical libre DPPH[•] par les extraits de *R. montana* sont exprimés par le paramètre IC₅₀ (Figure 10). Ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH[•] (IC₅₀),

Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Brand-Williams et al., 1995; Atoui et al., 2005). Les résultats de cette activité sont figurés dans la Figure 10.



Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Figure 10 : Les concentrations de EMSC qui inhibent 50 % du radical DPPH \cdot .

Selon les résultats enregistrés, l'extrait est doté d'une activité antioxydante importante, leur IC50 est **0,35 mg/ml**, mais relativement faible que celle du quercetine dont la valeur de leur IC50 est de l'ordre de **0,01 mg/ml**.

La différence dans l'activité inhibitrice, est peut être due à la différence de la teneur en antioxydants (les polyphénols et les flavonoïdes).

Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH \cdot alors transformé en une molécule stable DPPH-H (Cristina et al., 2009)

I.4.2. Evaluation de l'Activité anti-hémolytique

Les globules rouges sont parmi les cellules les plus utilisées dans l'évaluation de la toxicité à cause de leur disponibilité, et la facilité de leur surveillance au cours de la lyse cellulaire grâce à la libération de l'hémoglobine, (Situ et Bobek, 2000).

En outre, la présence d'une concentration très élevée d'acides gras polyinsaturés, sur la membrane et le rôle de transport d'oxygène joué par les molécules d'hémoglobine, rend les érythrocytes une cible privilégiée des radicaux libres, (Situ et Bobek, 2000).

L'interaction d'un composé cytotoxique avec la membrane des globules rouges provoque la perte de leur intégrité ce qui conduit à leur lyse. (Tiwari et al., 2011).

Le chlorure d'hydrogène est très utilisé dans les tests d'évaluation de l'activité anti-hémolytique. Il provoque la dégradation de la membrane cellulaire des hématies en libérant le contenu cytoplasmique et particulièrement l'hémoglobine. (Tiwari et al., 2011).

Résultats et discussion

La **figure (11)** représente le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse en présence de différentes concentrations de l'extrait méthanolique, comparé à un témoin positif contenant des hématies intactes (en présence de PBS).

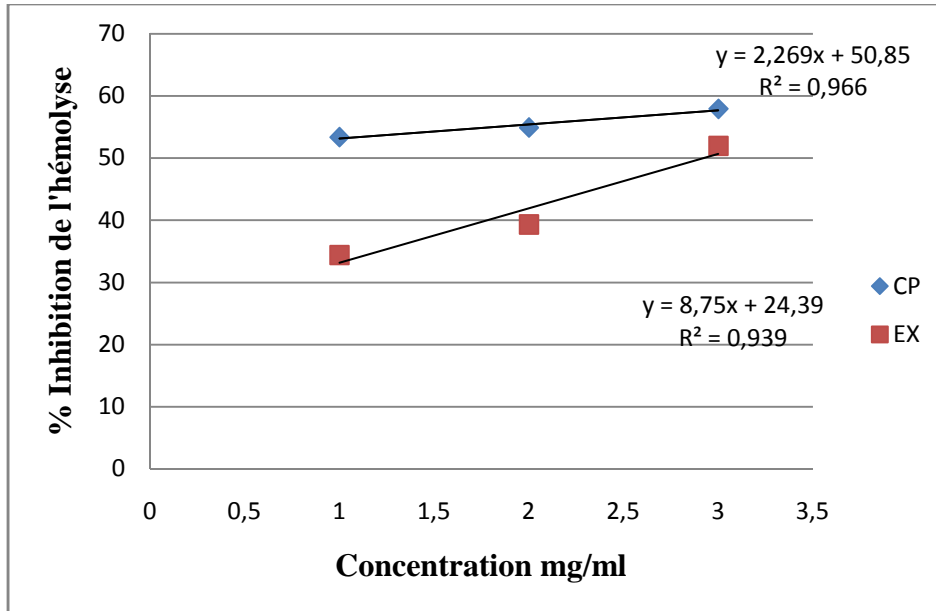


Figure 11 : Courbes de pourcentages d'inhibition de l'hémolyse en fonction de différentes concentrations.

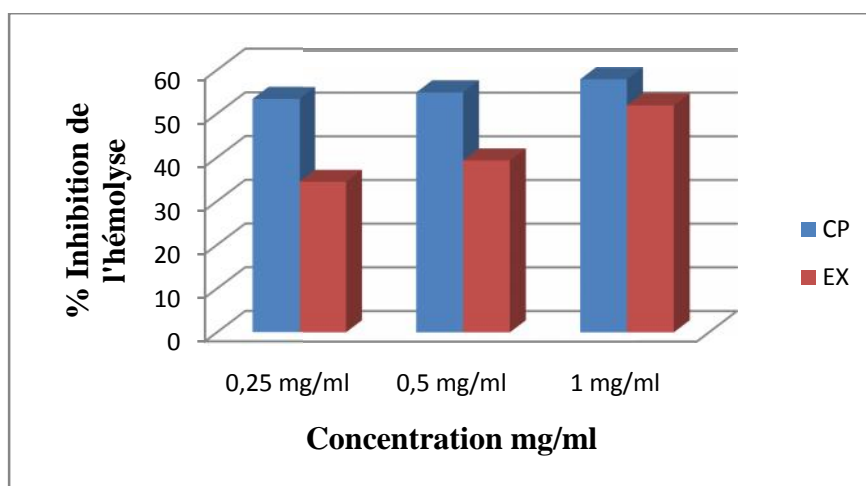


Figure 12 : Histogramme de pourcentage d'inhibition de l'hémolyse en présence de différentes concentrations.

D'après les résultats obtenus, l'EMSC induit une activité anti-hémolytique significative comparée au contrôle positif. Celle-ci est proportionnelle à la concentration de l'extrait utilisée au cours du test.

L'activité anti hémolytique est probablement due à la présence d'une faible quantité de composés terpéniques qui, à faibles concentrations jouent un rôle anti hémolytique. Ces molécules favorisent les interactions avec les protéines et les phospholipides grâce à leurs affinité avec ces derniers ce qui entraine un effet protecteur contre les oxydants, (**Silva et al., 2017**).

I.4.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

A. résultat de l'activité antibactérienne testée par la méthode des disques

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait sont présentées ci-dessous dans les tableaux (**Tableau 05, 06**).

Résultats et discussion

Tableau 05 : Détermination de la zone d'inhibition (ZI) de l'extrait de *Senecio cineraria*.

| Souches | EMSC | CN | CP | CP |
|-------------------------------|-----------|----|-----------|----------|
| | | | P | Ofl |
| <i>Escherichia coli</i> | 7.5±0.7 | 00 | 00 | 25 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 09±2.8 | 00 | 14±2.8 | 21±0.7 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5.25±0.35 | 00 | 11.5±2.12 | 20 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 10±1.4 | 00 | 10 | 25±1.4 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 09±1.4 | 00 | 17 | 23.5±0.7 |

Les résultats obtenus ci dessus ont montré un pouvoir antibactérien observé pour les souches : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Klebsiella oxytoca*

Tableau 06: Concentration minimale inhibitrice

| <i>Souches</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Klebsielaoxytoca</i> | | | <i>Listeria monocytogenes</i> | | |
|-----------------------|------------------------------|---|-----|-------------------------|---|-----|-------------------------------|---|-----|
| | EMSC | P | Ofx | EMSC | P | Ofx | EMSC | P | Ofx |
| <i>Concentrations</i> | | | | | | | | | |
| 40 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 05 | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| 2.5 | + | + | + | - | - | - | + | + | - |
| 1.25 | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| 0.625 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0.3125 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

CN : disques imprégnés par DMSO. CP : disques d'antibiotiques

Le potentiel inhibiteur de l'extrait a été confirmé par les tests de détermination de la CMI. Les résultats du tableau ci-dessus montre que la valeur de CMI est de 1.25 mg/ml pour la souche de *Klebsiela oxytoca*, 05 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* et de 10 mg/ml pour la souche *Listeria monocytogenes*. Les bactéries les plus sensibles sont les bactéries Gram positif. Cependant *Klebsiela oxytoca* qui est une bactérie Gram négatif présente une faible valeur de CMI (2.5 mg/ml). L'organisation structurale de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est moins complexe que celle des bactéries à Gram négatif. Parmi les souches étudiées, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* s'est montrée résistantes (00<ZI<06 mm).

L'activité antibactérienne de l'EMSC contre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Klebsiela oxytoca* peut être dûe à la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes et des tanins (Brantner A., Males Z., pepeljak S., Antolic A., 1996. Antibacterial activity of paliurus-pina-christi Mill (christ's sthorn). *Journal of Ethnopharmacology*. 52: 119-122.) dont leur présence est mise en évidence dans l'extrait

méthanolique de cette plante. Les composés phénoliques et les quinones qui en dérivent par oxydation participent à la défense de la plante contre les agressions comme antibactériens en se liant aux protéines et en inactivant les activités enzymatiques des microorganismes (**Harborne B., Williams C., 2000.** *Advances in flavonoid research since 1992. Photochemistry*, vol. (55): 481-504).. Citons à titre d'exemple l'action des tanins qui peuvent inhiber la machinerie enzymatique des microorganismes, ont une action lytique par effet direct sur leur membrane ou complexation de certains ions métalliques indispensables pour leur survie, en particulier le Fer (**Milal., Scalbert A., Expert D., 1996.** *Ironwith-holding by plant polyphénols and resistance to pathogens and rots. Phytochemistry*. 42 : 1551-1555.). Le résultat négatif pour les autres espèces bactériennes peut signifier la résistance de ces dernières vis-à-vis de l'EMSC sachant que certains microorganismes peuvent d'ailleurs dégrader les composés phénoliques qui leur servent alors de substrats carbonés et favorisent ainsi leur croissance.

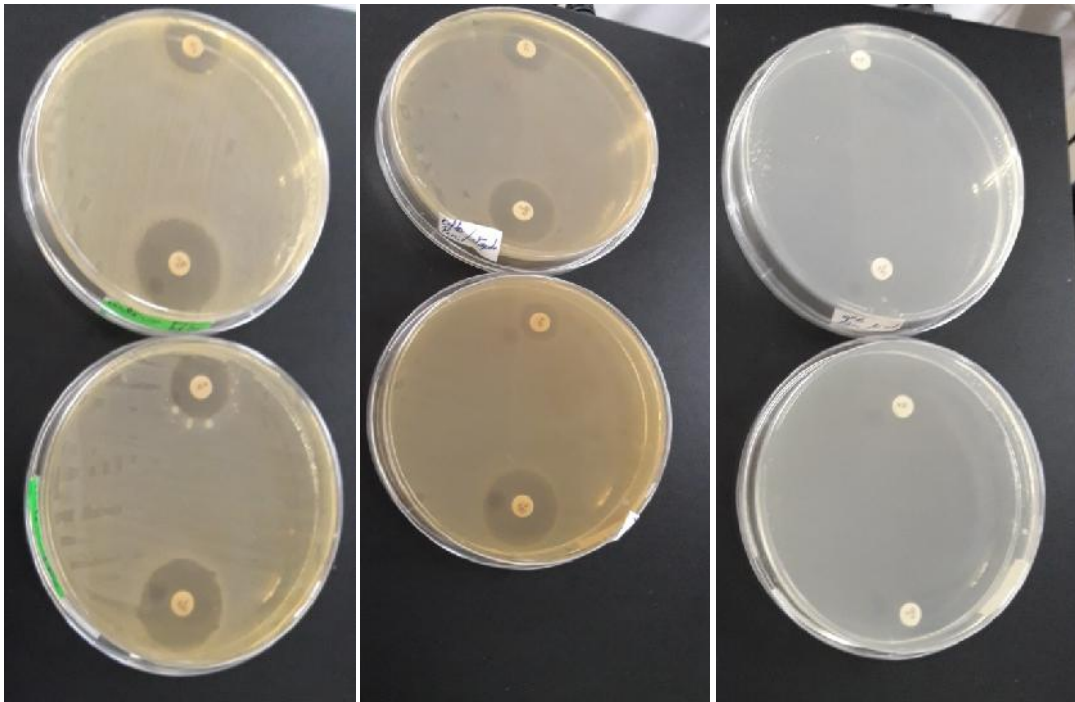


Figure 13 : Quelques photos des résultats de l'activité antibactérienne

B. Test de synergie

Les études de combinaison de substances médicinales en général, et antibiotiques en particulier, sont de plus en plus souvent décrites dans la littérature (**Rosato et al., 2007 ; Coutinho et al., 2011 ; Gauthami et al., 2012; Thiago et al, 2013 ;**). Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en vue de potentielles applications clinique, car permettant de réduire les éventuels effets secondaires des traitements actuels en diminuant la dose de composé utilisé (**Rosato et al., 2007**), limitant ainsi également de développement des phénomènes de résistances. C'est dans cette optique que l'extrait de *Senecio cineraria* a été testée en combinaison d'une part avec la pénicilline et d'autres part avec l'ofloxacine sur les cinq souches : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*. Les résultats sont montrés dans le **tableau 07**

Tableau 07: Résultats des zones d'inhibitions de la synergie EMSC/Antibiotique.

| Souches | Extrait+Penicilline | | Extrait+Ofloxacine | |
|-------------------------------|---------------------|----|--------------------|----|
| | R1 | R2 | R1 | R2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 14 | 14 | 24 | 22 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 12 | 14 | 24 | 24 |
| <i>Escherichia coli</i> | 00 | 00 | 00 | 00 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 14 | 16 | 23 | 23 |
| <i>Klebsiella oxytoca.</i> | 11 | 14 | 26 | 26 |

Il existe des effets potentialisateurs, la combinaison extrait/antibiotique est efficace. Avec cette combinaison, les concentrations nécessaires de pénicilline et d'ofloxacine pour l'inhibition des souches sont nettement réduites, de même que la concentration en extrait, alors que l'extrait n'était que légèrement actif lorsqu'il est utilisé seul.



Figure 14 : Quelques photos des résultats de la synergie EMSC/Antibiotiques

I.4.4. Evaluation de l'activité anticoagulante

Le pouvoir anticoagulant de l'extrait de *Senecio cineraria* a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TP et le TCK respectivement.

Le test de TCK est activée par le contact entre le facteur XII et la surface électronégative de l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif *in vivo*). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquent l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (facteur II) (GEROTZIAFAST, 2007). Un temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif où l'échantillon est remplacé par le DMSO traduit une activité anticoagulante du matériel testé. Les résultats de l'activité anticoagulante sont montrés dans le **tableau 08** et la **figure 15**.

Tableau 08 : Résultats de l'activité anticoagulante

| | TQ (s) | TP (%) | TCK (s) | TCK (%) |
|----------------|--------|--------|---------|---------|
| CN | 15 | 66.9 | 13.6 | 90.7 |
| CP | 23.3 | 32.16 | 20.3 | 39.9 |
| Tests | 43.6 | 51.3 | 27 | 26.7 |
| Témoins | 14 | 86.9 | 14.3 | 85.4 |

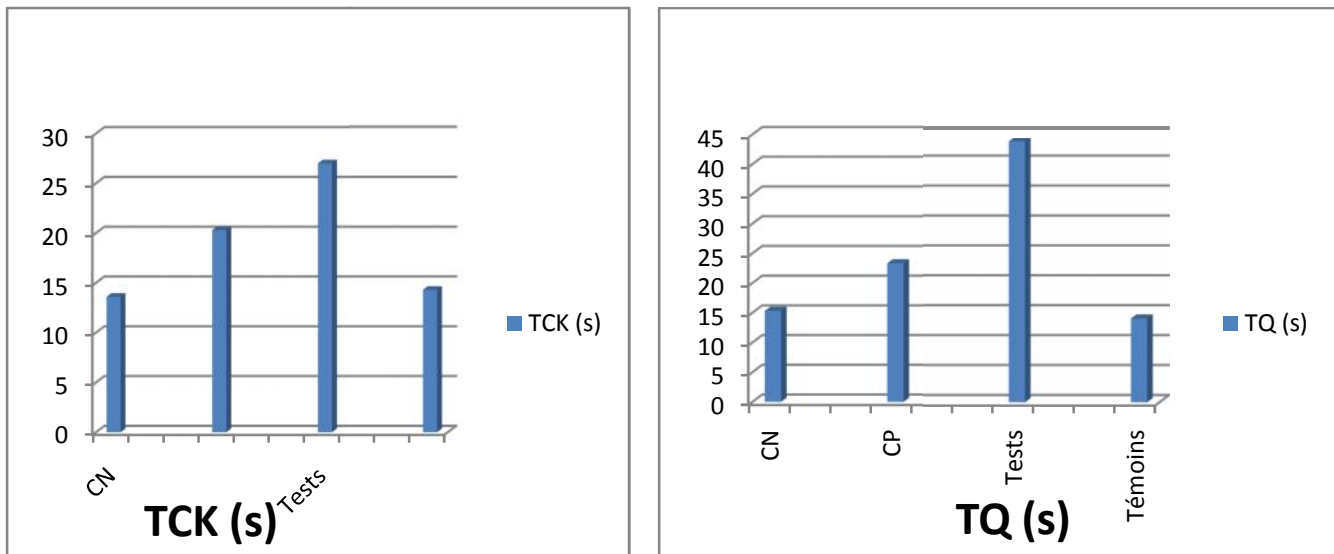


Figure 15 : Histogrammes de TCK et TQ.

Ces résultats montrent que la différence est significative avec le contrôle négatif. Les temps de TCK sont entre 29 et 24s pour l'extrait et le temps de contrôle négatif est entre 13 et 15 s.

Le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) est le test qui permet d'explorer globalement la voie exogène de la coagulation où le facteur tissulaire est le déclencheur de cette voie (TRIPODI, 2009). Le TQ normal est compris entre 12 et 14 secondes selon les réactifs utilisés (CAQUET, 2004) et un allongement par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante du matériel testé vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation. La différence est significative entre l'extrait et le contrôle négatif, le temps de TQ est entre 40 et 49 (s) pour l'extrait et le temps de contrôle négatif est entre 14 et 16 (s).

Globalement, l'évaluation de la capacité anticoagulante de l'EMSC établie par les deux tests chronométriques d'exploration de la coagulation, le TCK et le TQ montre que l'extrait exerce une activité anticoagulante importante vis-à-vis des deux voies de la coagulation.

Récemment la découverte des plantes médicinales ayant une activité anticoagulante est rare (RAHMAN *et al.*, 2013). L'attribution exacte de l'activité biologique à un composé,

ou un petit groupe de composants dans un extrait de plante est une tâche difficile, puisque l'activité efficace dépend de plusieurs facteurs :

- Concentration et l'interaction synergique avec d'autres composants (**ALMELA *et al.*, 2006**) ;
- Périodes de récolte (**CELIKTAS *et al.*, 2007**) ;
- Méthodes d'extraction (**KOSAR *et al.*, 2005**).

Conclusion et perspectives

Conclusion

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. A cet effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches.

L'objectif de notre travail est l'étude de quelques caractéristiques de la plante médicinale *Senecio cineraria* par l'étude phytochimique, l'évaluation de leurs teneurs en flavonoïdes, la chromatographie sur couche mince ainsi que l'estimation *in vitro* des activités anticoagulante, antibactérienne, antioxydante et antihémolytique de cette plante, les analyses ont été réalisés sur l'extrait méthanolique.

Nos résultats indiquent la richesse de cette plante en différents métabolites secondaires actifs, alors que l'analyse quantitative en composés flavonoïques et l'analyse qualitative par CCM prouve la richesse de cette plante en différents classes des flavonoïdes qui sont dotées d'un pouvoir antioxydant.

L'activité antimicrobienne des extraits végétaux sur des souches bactériennes s'est avérée importante, vu que cette plante a révélé une activité remarquable sur les trois souches testées.

L'étude du pouvoir antioxydant par le test de DPPH a révélé un fort pouvoir antioxydant. L'étude de l'activité anticoagulante *in vitro* par les deux tests chronométriques, le TCK et le TQ a révélé un fort pouvoir anticoagulant.

D'après les résultats obtenus, l'extrait méthanolique de *Senecio cineraria* induit une activité antihémolyse significative. Celle-ci est proportionnelle à la concentration de l'extrait utilisée au cours du test.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests biologiques ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents

extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités biologiques des extraits de cette plante.

Résumé

Résumé

Senecio cineraria est un arbrisseau vivace d'origine méditerranéenne, appartient à la famille des Asteraceae, il est utilisé dans des préparations pharmaceutiques et en homéopathie.

Cette étude est une contribution scientifique à la détermination de certains composés phytochimiques, ainsi que l'étude de quelques activités biologiques in- vitro de l'extrait méthanolique de la plante.

L'analyse de l'extrait par les tests colorimétriques a révélé la présence de quelques groupes chimiques : flavonoïdes, alcaloïdes et des tannins. Ainsi, la chromatographie sur couche mince a montré la présence des différents composés flavonoïques.

Le dosage des flavonoïdes a révélé une teneur importante à l'ordre de **60.16 mg EQ/g E**.

Les résultats obtenus pour l'activité antioxydante montrent que l'extrait possède une activité importante avec une IC50 de l'ordre de **0,35 mg/ml**.

Le test d'activité anti hémolytique a révélé que l'extrait induit une activité anti hémolytique significative comparée au contrôle positif. Celle-ci est proportionnelle à la concentration de l'extrait utilisée au cours du test.

Le potentiel antibactérien de l'extrait a été confirmé sur les souches : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella oxytoca*, avec des CMI : 10 mg/ml, 20 mg/ml, 2.5 mg/ml respectivement.

L'évaluation de la capacité anticoagulante de l'extrait méthanolique établie par les deux tests chromométriques d'exploration de la coagulation, le TCK et le TQ démontre que l'extrait exerce une activité anticoagulante importante vis-à-vis des deux voies de la coagulation.

Mots clés : Sénecio cinéraria, screening phytochimique, CCM, activités biologiques.

Références bibliographiques

- Adibhatla et Hatcher, 2006

- Ajjan et Grant, 2006

- Allain P. Médicaments et coagulation. Les médicaments (3^e édition). CdM éditions 2000, 500p et mise à jour 2008: www.pharmacorama.com.
- Alkurd et al. 2008

- ALMELA *et al.*, 2006.

- AUBRY et HALNA DU FRETAY, 2010

- Babayi *et al.* 2004.

- Barouki, 2006.

- BATTY et SMITH, 2013.

- Berche *et al.* 1989 ; Hamza, 1993 ; Fatorrusso *et al.* 2001.

- Berger, 2003 ; Fang *et al.* , 2002.

- BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1995.

- Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem*, **82**, 390-393.

- Boharun *et al* , 1996.

- Bolou *et al.*, 2011.

- Boots *et al.* , 2008 ; Wang *et al.* , 2011.

- BOUDJOUREF, 2011.

- Bozin B, Mimica- dukic N, samojlik I, Goran A, Igetic R (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum L., Alliaceae*). *Food Chemistry*, **111**:925-9.

- Brand-Williams *et al.*, 1995; Atoui *et al.*, 2005.

- **Brantner A., Males Z., pepeljak S., Antolic A., 1996.** Antibacterial activity of paliurusspina-christi Mill (christ's sthorn). *Journal of Ethnopharmacology*. 52: 119-122.
- **Brunetton, 1999.**
- **Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007.**
- **Bruneton, 1993 ; Rahal, 2004 ; Kartal, 2005.**
- **Caen et al., 1975**
- **CAQUET, 2004**
- **CELIKTAS et al., 2007**
- **Cemeli et al., 2009.**
- **Chatterjee et al. 2004 ; Leitao 2005.**
- **Choi et al., 2006.**
- **Christian NEU, 2011.**
- **Colvin, 2004.**
- **Conrad et al. 1998.**
- **Cowan, 1999.**
- **Cristina et al., 2009.**
- **CROZIER et WOIMANT, 2007.**
- **De Rijke et al. 2006.**
- **Didrak, 1999.**
- **Didrak 1999 ; Modak 2001 ; Okigbo 2005 ; Mamatha 2005.**
- **Dominik et al., 2013.**
- **Dupot et Guignard, 2012.**

- Dupont F. et Guignard J-L, 2012_Abrégés de Pharmacie « Botanique :les familles des plantes ».15 édition Elsevier MASSON 192 PP. De Monet de Lamarck.
- Duval et al. 1985.
- Edeaga et al., 2005.
- Faizi et al. 2003.
- Favier, 2003 ; Kohen et Nyska, 2002.
- Favier, 2003 ; Bonnefont-Rousselot, 2007.
- Favier, 2003 ; Valko et al ., 2006 ; Singh et al ., 2008 ; Boots et al ., 2008.
- Favier, 2003 ; Robrts et Sindhu, 2009.
- Favier, 2003.
- Flore forestière française : Région Méditerranéenne. Par : Jean-Claude Rameau. Dominique Mansion. G. Dumé. page: 2087
- Franchini M, Mannucci PM. Venous and arterial thrombosis: Different sides of the same coin?. *European Journal of Internal Medicine* 2008; 19: 476–481.
- Gàbor et al. 1988.
- GEROTZIAFAST, 2007.
- GIRARDEL et SAMAMA, 2006.
- Guignard, 1996.
- Hamlat LN (2006). Flavonoïdes et acides phenoliques de Pistacia lentiscus. Thèse de Magister. Ecole normale supérieure Kouba, Alger: 153.
- Harborne B., Williams C., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Photochemistry*, vol. (55): 481-504
- Harrison et al , 2003.
- Hernadez et al., 1995; Lamb et Dixon, 1997.
- HELFT et LEGER, 2009.
- Hostettmann, 1991
- Hsiou-Y, 2000 ; Veli kovi , 2003.

- <https://douleurs-musculaires.ooreka.fr>.

-Jensen R. Clinical Presentation of Arterial Thrombosis vs. Venous Thrombosis. *Clinical Hemostasis Review* 2002; 16(8):1-6.

- Kabran Guy R.M. *et al.*, 2012.

- Karumi *et al.*, 2004.

- Kholkhal.F, 2014.

- Klaas *et al.* 2002

- Kohen *et Nyska*, 2002.

- Kocchilin-Ramonatxo, 2006.

- Koleva *et al.*, 2002.

- KOSAR *et al.*, 2005

- Kutchan, 2001 ; Wink, 2003 ; Kliebenstein, 2004.

- Latte *et Kolodziej* 2001, Leitao *et al.* 2005.

- LEONI, 2001.

- Leopold *et Loscalzo*, 2009.

- LITVAK *et MONSON*, 1998.

- Madjour.S, 2014.

- MAJOB *et al.*, 2003.

- Mamyrbekova-Bekro.J *et al*, 2013

- Manach, 2004.

- Markham KR (1982). Techniques of flavonoids identification. *Academic press, London*.
Chap. 1 and 2: 1-113.

- Martinez-Cayuela, 1995.

- MAYER, 2004.

- **Meddour A, Yahia M, Benkiki N, Ayachi A (2013).** Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* L. *Lebanese Science Journal*, **14**: 1.

- **Meziti.A, 2009.**

- **Milal., Scalbert A., Expert D., 1996.** Ironwth-holding by plant polyphénols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*. **42** : 1551-1555.

- **Milane, 2004.**

- **Miki et al., 1987.**

- **Molyneux, 2004.**

- **Moreno, 2006.**

- **NCCLS, 1997.**

- **NEWMAN et CRAGG, 2012.**

- **Nur Alam Md, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md (2013).** Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **21**, 143–152.

- **Oltra et al ., 2001 ; Devi, 2007**

- **Otmani. H, 2009.**

- **PEEKING et al., 1987.**

- Pelser et Meijden, 2005 Othonna**

- **Pincemail et al . 2002**

- **Pincemail et al ., 2002 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**
- **Pocidalo et al. 1989 ; Marc et al. 2001.**

- **Prasad et al. 2004.**
- **RAHMAN et al., 2013.**

- **Robbers et al, 1996.**

- **Roumy, 2007.**

- Rosato *et al.*, 2007 ; Coutinho *et al.*, 2011 ; Gauthami *et al.*, 2012; Thiago *et al.*, 2013 .
- Rosato *et al.*, 2007.
- Saffidine K. 2015.
- Said.I et al, 2016.
- Silva *et al.*, 2017.
- Situ et Bobek, 2000.
- Sivakumaran, 2004.
- Sohal *et al.* , 2002.
- Stöckigt *et al.* 2002.
- Thomas, 2013.
- Tiwari *et al.*, 2011.
- TRIPODI, 2009.
- Ucar, 2002.
- Ulanowska *et al.* 2006.
- Valko *et al.* , 2006.
- VERPOORTE et ALFERMANN, 2000.
- Vogler *et al.*, 2009.
- Wiltink *et al.*, 1972
- Wollgast, 2000 ; Dykes, 2006.
- Zhang et Björn, 2009.
- Zenk *et al.* 2007.

Annexes

Annexe 1

La Mc Farland standard 0.5 est une solution utilisée lors de la préparation des inocula bactériens.

Il se prépare en mélangeant 99.5ml d'Acide Sulfurique (0.18M) et 0.5ml de Chlorure de baryum (0.048 M) dans des tubes identiques aux tubes utilisés pour la préparation de l'inoculum. Il faut le stocker dans l'obscurité à une température de 22°C à 25°C.

Après la préparation de la solution, on doit vérifier l'exactitude de la densité de Mc Farland par le spectrophotomètre à longueur d'onde de 625nm devrait être compris entre 0.08 et 0.13. Avant chaque utilisation, agité le tube pour mélanger le fin précipité blanc de Sulfate de Baryum.

Annexe 2

Gélose de Muller Hinton est une gélose standardisée pour les tests de sensibilité aux antibiotiques et sulfamides.

Pour la préparation de la gélose de Muller Hinton, on a besoin :

- 21g de la poudre du Muller Hinton.
- 25g de l'agar agar.

Les étapes de préparation sont :

1. Dans un bécher, en dissolvant la poudre dans un litre de l'eau distillé, il faut l'homogénéiser et chauffer en agitant.
2. porté à ébullition environ une minute
3. met dans des flacons de verre bien fermé pour stériliser à l'autoclave pendant 15min à 121.1°C.

Pour l'utiliser, laisser le refroidir, puis couler en boîte de pétri (25ml par boîte) dans un milieu stérile et laisser reposer. Ils sont prête à l'utilisation immédiatement ou stocker à 2°C à 8°C pendant une semaine au plus.

Annexe 3

Phosphate buffer saline (PBS) est une solution isotonique et non toxique utilisée couramment en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate dipotassique et de chlorure de potassium. Il est utilisé pour lavage ou dilution des cellules.

Pour la préparation de PBS à pH égale à 7.2 on a besoin de :

- 13.21g/l de la base Na_2HPO_4 .
- 20.29g/l de l'acide $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$.
- 80g/l de NaCl .
- 2g/l de KCl .

Dissoudre les composants dans 500ml de l'eau distillé, en agitant jusqu'il s'homogénéise à l'aide d'un agitateur et conservé à 4°C dans des fioles propre au réfrigérateur, jusqu'au moment de l'utilisation. Il ne faut pas congeler, surchauffés, conditionner dans des fioles présentant une fissure ...etc.

Pour faciliter la préparation, il y a des comprimés commerciaux de tampon PBS qui donner une solution PBS prête à l'emploi après leur dissolution dans une certaine quantité de l'eau.

Thème: Etude des activités biologiques de Senecio cineraria

Résumé

Senecio cineraria est un arbrisseau vivace d'origine méditerranéenne, appartient à la famille des *Asteraceae*, il est utilisé dans des préparations pharmaceutiques et en homéopathie.

Cette étude est une contribution scientifique à la détermination de certains composés phytochimiques, ainsi que l'étude de quelques activités biologiques *in-vitro* de l'extrait méthanolique de la plante.

L'analyse de l'extrait par les tests colorimétriques a été révélée la présence de flavonoïdes, alcaloïdes et des tannins. Qualitativement, l'analyse effectuée par CCM de l'extrait a montré la présence d'une multitude de variété des flavonoïdes. Le dosage des flavonoïdes a montré une teneur importante à l'ordre de **60.16 mg EQ/g E**.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a montré que la concentration qui piège 50 % du radical DPPH° (IC50) est de **0,35 mg/ml**.

L'EMSC a révélé un effet anti hémolytique significative comparée au contrôle positif. Celle-ci est proportionnelle à la concentration de l'extrait utilisée au cours du test.

Le potentiel antibactérien de l'extrait a été confirmé sur les souches : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella oxytoca*, avec des CMI de 10 mg/ml, 20 mg/ml et 2.5 mg/ml respectivement.

Les tests chronométriques d'exploration de la coagulation (le TCK et le TQ) ont montré que l'extrait exerce une activité anticoagulante importante.

Mots clés : *Senecio cineraria*, screening phytochimique, CCM, activités biologiques.