



République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR –KHENCHELA-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Présenté Pour l'obtention du Diplôme de
MASTER

FILIERE : Biologie moléculaire et cellulaire
OPTION : Biochimie appliquée

Thème

**Etude des activités biologiques de deux plantes
médicinales**

Ruta montana et Onopordum acanthium

Présenté par :

M^{lle} : BOUZAHER Radja

Encadré par :

M^{me} : KARAALI Wahiba

Soutenu le : 14/06/2015

Jury de soutenance

Président : Dr Boufennara S

Apporteur : M^{me} Karaali W

Examineur : M^{lle} Messai A

Dr. Univ. Khenchela

MAA. Univ. Khenchela

MAB. Univ. Khenchela

Promotion : Juin 2015

Remerciement

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

*Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout **puissant**, pour m'avoir donnée le pouvoir, la force et la patience ...*

*J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon encadreur **M^{me} Karaali Wahiba** ... Merci d'avoir accepté de diriger ce travail, Merci pour votre encadrement sans faille tout au long du période de réalisation de ce travail. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir d'avoir pu faire votre connaissance avant tout...*

*Je remercie le docteur **Mr Hamada Youssef**, le doyen de faculté de la science de la nature et de la vie. D'avoir accepté de réaliser ce travail en monôme.*

*Je remercie le docteur **Mr Boufennara Souhil** D'avoir accepté de juger mon travail en tant que président.*

*Je remercie **Mlle Messai A** .maitre de conférence .D'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

Je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et qui été présente chaque fois que cela a été nécessaire. Merci Maman, Merci Papa, Merci ma Soeur, mes Frères. C'est avec vous que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenu grâce à votre présence, à votre sourire, à votre amitié.

♥Merci♥

Dédicaces

À mes très chers parents

*Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle ne saurait
exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous
porte...*

*Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et
vos encouragements.*

*Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez
consentis pour mon éducation.*

*Que dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de
santé et de bonheur !*

*À ma très chère sœur : Malak et mes chers frères Bilel, zakaria et
souhaib*

*Pour leur soutien et leur encouragement tout au long de la
réalisation de ce travail.*

*À mon encadreur : Mme Karaali Wahiba pour leur amour, leur
humanité et leur gentillesse avant tout ...*

D.K

*Merci d'être toujours là pour moi, merci de m'avoir supporté, tu me
redonne toujours confiance à moi. Que dieu te bénisse, et te donne la force
et le courage.*

À tous mes enseignants

À tous mes amis et mes collègues

À tous qui me connaissent de près ou de loin.

♥ Radja ♥

Liste des abréviations

A_B : Absorbance de blanc

ACTH : Adréno Cortico Trophic Hormone

ADN : Acide désoxyribonucléique

A_E : Absorbance d'extrait

AINS :anti-inflammatoire non stéroïdiens

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

AIS :anti-inflammatoires stéroïdiens

ARN :Acide ribonucleique

Bu(OH) :butanolique

BSA :Serum albumin bovin

°C: Degré celsius

cm : Centimètre

CCM : Chromatographie sur couche mince

Chl :chlorofofmique

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

D :distance

DO : Densité Optique

DPPH :2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAc :extrait acetate

E. coli :*Escherichia coli*

ERO :espèces réactives de l'oxygène

EP:Ether de petrole

°F : degré FAR night

Fe²⁺ : fer

FeCl₃ : chlorure de fer

g : gramme

GR :glucocorticoïdes

GPx : glutathion peroxydase

h : heure

HCl : Acide chlorhydrique

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

H₂O : Eau

H₂SO₄: Acide sulfurique

H₂O_d: eau distillée

IC₅₀ : concentration inhibitrice 50 %

IL-2 : Interleukine 2

IL-1 : Interleukine 1

I₂: iode

K₃Fe[CN]₆ : ferricyanure de potassium

LOST : Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutique

LDL : Low Density Lipoprotein

LT B₄ : Leucotrienes B₄

LTC₄ : Leucotrienes C₄

LTB₄ : Leucotrienes B₄

M : mole

MDA : malondialdéhyde

Me (OH) : Méthanol

mg EAG / g E : milligramme équivalent acide gallique /gramme extrait

mg EQ / g E: milligramme équivalent quercitine /gramme extrait

mL : millilitre

mm : millimètre

NO*: monoxyde d'azote

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF-κB : nuclear factor-kappa B

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH: ammoniaque

Nm :nanomètre

O.acanthium : *Onopordum acanthium*

O₂* : radical superoxyde

OH*: radical hydroxyle

ONOO-:peroxynitrite

O₂:Oxygene

P: Probabilité

PA: pas d'activité

PKC:Proteine kinase C

PGE₂: prostaglandines E 2

PGE₁₂: prostaglandines E 12

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

Qrct:quercitine

Rf:Rapport frontal

R. montana: *Ruta Montana*

SD: Standard deviation

Spp: Espèce

SOD:Superoxyde dismutase

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

TNF_α: tumor necrosis factor alpha

μg: microgramme

μM: micromolaire

UV: Ultraviolet

UV-Vis: Ultra violet-Visible

V: Volume.

ZI: Zone d'inhibition

Liste des figures

Figure1. Différentes familles de polyphenoles, polymères des flavonoïdes :proanthocyanidines, anthociyanogenes ou procyanidols.....	04
Figure 2. Structure chimique de base des flavonoïdes	05
Figure 3 : structure chimique de différents flavonols et flavones	05
Figure 4. Photos montrant les différentes aspects de la plante <i>Ruta montana</i> ; écorces, plante entière et fleurs(A.B.C).....	10
Figure 5. : photos montrant les différentes parties : feuilles, fleurs, plante entière et tiges d' <i>Onopordum acanthium</i> (A,B,C,D).....	13
Figure 6. Mécanisme de la peroxydation lipidique	06
Figure 7. : Les médiateurs de l'inflammation	24
Figure 8. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.....	26
Figure 9. Mécanisme d'action des AINS.....	27
Figure 10. Courbes d'étalonnage de la quercétine	52
Figure 11. Teneur en flavonoïdes totaux de différentes fraction de la plante <i>Ruta Montana</i> (mgEQ/gE).....	52
Figure 12. Teneur en flavonoïdes totaux de différentes fraction de la Plante <i>Onopordum Acanthium</i> (mgEQ/gE).....	53
Figure 13. Courbes d'étalonnage de l'acide gallique.....	54
Figure 14. Teneur en polyphenols totaux de différentes fraction de la plante <i>Onopordum Acanthium</i>	55
Figure 15. Teneur en polyphenols totaux de différentes fraction de la plante <i>Ruta Montana</i>	56
Figure 16. Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait Ether de petrole par chromatographie sur gel de silice par le système solvant (Chloroforme/Methanol(96%/04%) (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$	58
Figure 17. Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait acétate d'ethyl par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$ par les systèmes solvant: A.Chloroforme/Méthanol (96/4) B. Ether de pétrole/Acétate(80%/20%).....	61
Figure 18 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait butanolique de <i>R.montana</i> par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant :	62

Chloroforme/méthanol/ H ₂ O _d (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$	
Figure 19 Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait Ether de petrole par chromatographie sur gel de silice par le système solvant (Chloroforme/Methanol(96%/04%) (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$	63
Figure :20. Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait Chloroformique par chromatographie sur gel de silice par le système solvant (Chloroforme/Methanol(96%/04%) (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$	64
Figure :21. Les concentrations des extraits méthanolique de <i>R.Montana</i> inhibent 50 % du radical DPPH°.....	66
Figure :22. La réduction du DPPH° par un antioxydant.....	67
Figure :23. Les concentrations des extraits méthanolique d' <i>O.acanthium</i> inhibent 50 % du radical DPPH°.....	68
Figure :24. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(OH) <i>R.montana</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> (A,B,C).....	76
Figure :25. photo montrant l'effet antibacterien de l'ext me(oh) <i>R.montana</i> ;l'agentamicine et le methanol contre <i>staphylococcus Aures subp rrosnebach</i> (sensible)(A ;BC).....	77
Figure : 26. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(oh) <i>R.montana</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Staphylococcus Aureus subp Rosenbach(resistante)</i> (A,B,C).....	77
Figure :27. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(oh) <i>R.montana</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Echerichia Coli</i>) (A,B,C).....	78
Figure :28. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(OH) <i>R.montana</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Proteus Mirabilis ssp</i> (A,B,C).....	78
Figure :29. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(OH) <i>R.montana</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Selmonellla ssp</i> (A,B,C).....	79
Figure :30. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(OH) <i>O.acanthium</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> (A,B,C).....	80
Figure 31 .Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(OH) <i>O.acanthium</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Staphylococcus Aureus subp Rosenbach(sensible)</i>	80

(A,B,C).....	
Figure :32. Photo montrant l'effet antibactérien de L'EXT Me (OH) <i>O.acanthium</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Staphylococcus Aureus subp Rosenbach(resistante)</i> (A,B,C).....	81
Figure :33. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(OH) <i>O. acanthium</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Echerichia Coli</i> (A,B,C).....	81
Figure : 34. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(OH) <i>O. acanthium</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>Proteus Mirabilis ssp</i> (A,B,C).....	81
Figure :35. Photo montrant l'effet antibactérien de L' EXT Me(OH) <i>O.acanthium</i> , l'Agentamicine et le methanol contre <i>selmonella ssp</i> (A,B,C).....	82
Figure :36 . Photos montrant la détermination de la CMB d'extrait Me(OH) <i>R. montana</i> sur <i>Staphylococcus Aureus subp Rosenbach(resistante)</i>	86
Figure :37 . Photos montrant la détermination de la CMB d'extrait Me(OH) <i>R.montana</i> sur <i>Selmonella ssp</i>	86
Figure :38 . Photos montrant la détermination de la CMB d'extrait Me(OH) <i>R.montana</i> sur <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	87
Figure :39 . Photos montrant la détermination de la CMB d'extrait Me(OH) <i>O.acanthium</i> sur <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	88
Figure :40 . Photos montrant la détermination de la CMB d'extrait Me(OH) <i>O.acanthium</i> sur <i>Selmonella ssp</i>	89

Liste des tableaux

Tableau 1. montrant les valeurs normales de la température corporelle....	37
Tableau 2. Screening phytochimiques des composés constituant de l'extrait méthanoliques de <i>Ruta montana</i>	49
Tableau 3. : Screening phytochimiques des composés constituant de l'extrait méthanoliques d' <i>Onopordum acanthium</i>	50
Tableau 4. . CCM de la fraction Ether de pétrole ,Système solvant : Ether de pétrole/Acétate (80%/20%) .Adsorbant :Gel de silice.....	57
Tableau 5. CCM de la fraction Ether de pétrole .Système solvant : Chloroforme/ Methanol (96%/4%). Adsorbant :Gel de silice.....	58
Tableau 6 CCM de la fraction Acétate d'ethyl. Système solvant : Chloroforme/ Méthanol(96%/04%). Adsorbant :Gel de silice.....	59
Tableau 7. CCM de la fraction Acétate d'ethyl . Système solvant : Ether de pétrole/Acétate (80%/20%). Adsorbant :Gel de silice.....	60
Tableau 8. CCM de la fraction butanolique. Système solvant : Chloroforme/méthanol /H ₂ O _d . Adsorbant : gel de silice.....	62
Tableau9 CCM de la fraction Ether de petrole.Système solvant : Chloroforme/Methanol(96%/04%).Adsorbant :Gel de silice.....	63
Tableau 10. CCM de la fraction Chloroformique . Système solvant : Chloroforme/Methanol(96%/04%) Adsorbant :Gel de silice.....	64
Tableau 11. représente les pourcentages de réduction du radical DPPH° par les différentes fractions de l'extrait <i>R.montana</i>	65
Tableau 12. représente les pourcentages de réduction du radical DPPH° par les différentes fractions de l'extrait <i>O.acanthium</i>	68
Tableau 13. . Pourcentages d'inhibition de la dénaturation et de dénaturation de la BSA de l'extrait Me(OH) <i>R.montana</i> a plusieurs concentrations (µg/ml)	69
Tableau 14. . Pourcentages d'inhibition de la dénaturation et de dénaturation de la BSA de l'extrait ether de pétrole <i>R.montana</i> a plusieurs concentrations (µg/ml.....	70

Tableau 15. Pourcentages d'inhibition de la dénaturation et de dénaturation de la BSA de l'extrait acétate d'éthyl <i>R.montana</i> a plusieurs concentrations (µg/ml).....	70
Tableau :16. Pourcentages d'inhibition de la dénaturation et de dénaturation de la BSA de l'extrait Bu(OH) <i>R.montana</i> a plusieurs concentrations (µg/ml).....	71
Tableau :17. Pourcentages d'inhibition de la dénaturation et de dénaturation de la BSA de l'extrait Me(OH) <i>O.acanthium</i> a plusieurs concentrations....	72
Tableau : 18. Pourcentages d'inhibition de la dénaturation et de dénaturation de la BSA de l'extrait CHL <i>O.acantium</i>	73
Tableau :19. Pourcentages d'inhibition de la dénaturation et de dénaturation de la BSA de éther de pétrole <i>O.acantium</i>	73
Tableau :20. Pourcentages d'inhibition de la dénaturation et de dénaturation de la BSA de l'extrait acétate d'éthyl <i>O.acantium</i>	74
Tableau :21. Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait methanolique <i>Ruta montana</i>	75
Tableau :22. Diamètre des zones d'inhibition de l'extrait methanolique <i>Onopordum aconthium</i>	79
Tableau :23. Concentration minimale inhibitrice(CMI) : EXT ME(OH) <i>R. montana</i>	83
Tableau :24. Concentration minimale inhibitrice(CMI) : EXT ME(OH) <i>O.aconthium</i>	84
Tableau :25. Concentration minimale bactéricide de l' extrait Me(OH) de <i>Ruta montana</i>	85
Tableau :26. Concentration minimale bactéricide de l Extrait methanolique d' <i>Onopordum Acanthium</i>	88
Tableau :27. Effet de l'extrait méthanolique de <i>Ruta montana</i> sur la fièvre induite par la levure de bière chez des rats Wist.....	90

Tableau :28. Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Onopordum acanthium</i> sur la fièvre induite par la levure de bière chez des rats Wistar.....	91
--	-----------

Table de matière

Dédicace	
Remerciement.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Table de matière.....	
Introduction.....	01
Chapitre I. Revues Bibliographique	02
I. La phytothérapie et médecine classique	02
I.1. Les substances chimiques des plantes médicinales, leurs propriétés et leurs activités biologiques	03
I.1.1. Les polyphenols	03
I.1.1.1 .Les flavonoïdes.....	04
I.1.1.1 .1.Localisation et distribution.....	04
I.1.1.1.2.Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes	06
I.1.2.Propriétés thérapeutiques des polyphenols	
I.1.1.2. Les acides phénoliques et tanins hydrolysables	07
I.1.1. 3. Les stilbènes	07
I.1.1.4. Lignines et subérines.....	07
I.1.1. 5. Propriétés thérapeutiques des polyphenols.....	08
I.1.3. Les alcaloïdes	08
II.Botanique et systématique des plantes medicinales : <i>Ruta montana</i> et <i>Onoprduum acanthium</i>	
II.1. La plante (<i>Ruta montana</i>).....	09
II.1.1. Définition	09
II.1.2. Description botanique.....	09

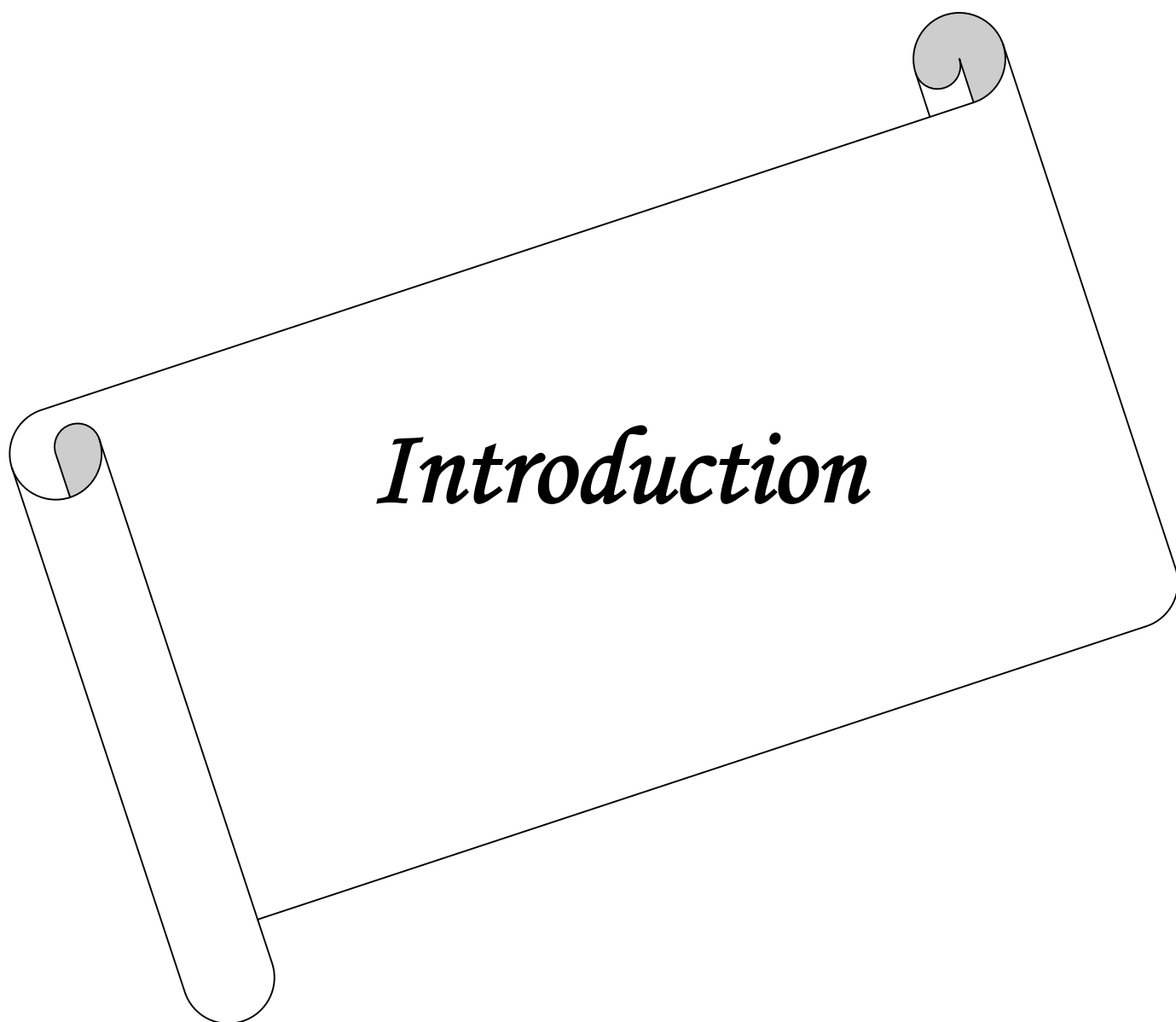
II.1.3. Air de répartition et habitat.....	11
II.1.4. Systématique de la plante.....	11
II.1.5. Utilisations en médecine traditionnelle.....	12
II.2. La plante « <i>Onoprdum acanthium</i> ».....	12
II.2.1.Définition.....	12
II.2.2.Description botanique.....	12
II.2.3.Air de répartition et habitat.....	14
II.2.4.Systématique de la plante.....	14
II.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle.....	15
III. Rappels sur les activités biologiques étudiées	15
III.1. Stress oxydant cellulaire, radicaux libres et antioxydants	15
III.1.1. Définition	15
III.1.2. .Les radicaux libres.....	15
III.1.3 .Les espèces réactives de l’oxygène.....	15
III. 1.3.1. Le radical superoxyde	16
III. 1.3.2. Le radical hydroxyle.....	16
III. 1.3.3.Le peroxyde d’hydrogène.....	16
III. 1.4. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif.....	16
III. 1.4.1.L’oxydation de l’ADN	17
III. 1.4.2.L’oxydation des protéines	17
III.1.4.3.L’oxydation des lipides.....	17
III.1.5. Les antioxydants.....	19
III.1.5. 1.Les antioxydants endogènes.....	19
III.1.5. 2.Les antioxydants exogènes.....	20
III.1.6.Les maladies liées au stress oxydatif.....	22
III.2.L’inflammation	22

III.2.1.Définition	22
III.2.2.Les causes majeures de l'inflammation.....	22
III.2.3. Les médiateurs et le déroulement de la réaction inflammatoire.....	23
III.2.4. Type d'inflammations	24
III.2.4.1. Inflammations aiguës.....	24
III.2.4.2. Inflammations chroniques.....	24
III.2.5.Les anti-inflammatoires intervenants lors des mécanismes inflammatoires.....	25
III.2.5.1.Les anti-inflammatoires stéroïdiens (ATS).....	25
III.2.5.2.Les anti-inflammatoires non stéroïdiens(ATNS).....	26
III.2.5.3.Les anti -leucotriènes.....	27
III.2.5.4. Les inhibiteurs des cytokines pro-inflammatoires.....	28
III.2.6.Pathologies inflammatoires.....	28
III.2.6.1.L'Athérosclérose.....	28
III.2.6.2.Allergies.....	28
III.2.6.3. Myopathies.....	29
III.2.6.4. Cancer.....	29
III.3.Infections bactériennes et substances antimicrobiennes.....	29
III.3.1.Les substances antimicrobiennes	30
III.3.1.1.Resistance aux antimicrobiens « antibiotique ».....	30
III.3.2.Activité antimicrobienne des extraits des plantes.....	31
III.3.3.Description de souches bactériennes étudiées.....	32
III.3.3.1.Escherichia coli	32
III.3.3.2. Staphylococcus aureus (sensibles et résistante).....	33
III.3.3.3. Pseudomonas aeruginosa.....	33
III.3.3.4. Proteus mirabilis.....	34
III.3.3.5. Salmonella.....	35
III.4.L'hyperthermie et fièvre.....	35

III.4.1.Mécanisme de la fièvre.....	36
III.4.2 Température corporelle.....	37
III.4.3.les antipyrétiques.....	37
Chapitre II. Matériel et Méthodes	38
I. Matériel.....	38
I.1. Matériel biologique (Echantillonnage).....	38
I.1.1. Matériel végétal.....	38
I.1.2. Les souches microbiennes testées.....	39
I.1.3. Matériel animale.....	39
I.2. Réactifs chimiques et instrumentations.....	39
II. Méthodes	39
II.1.Méthodes concernant le matériel végétal.....	39
II.1.2. Screening chimique des plantes.....	40
II.1.2.1. Recherche des tanins.....	40
II.1.2.2. Recherche des saponosides	40
II.1.2.3. Recherche des flavonoïdes	40
II.1.2.4. Recherche des composés réducteurs.....	41
II.1.2. 5. Recherche des alcaloïdes.....	41
II.1.3. Etude quantitative.....	41
II.1.3.1. Dosage des flavonoïdes.....	41
II.1.3. 2. Dosage des polyphénols totaux.....	42
II.1.4. Etude qualitative.....	42
II.1.4.1. Chromatographie sur couche mince.....	42
II. 1.4.2. Protocole de CCM sur gel de silice	43
II.1.4.3. Calcul du Rapport frontal	43
II.2. Etude de l'activité biologique des extraits de <i>Ruta montana</i> et de <i>Onopordum acontium</i>	

II.2.1. Estimation <i>in vitro</i> de l'effet Scavenger des extraits vis-à-vis du radical libre DPPH°	43
II.2.2. Etude de l'activité antibactérienne.....	44
II.2.2.1. Méthode des disques -Tests d'efficacité.....	44
II.2.2.2. Détermination de la concentration Minimale inhibitrice (CMI).....	45
II.2.2.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)....	46
II.2.3..Activité Anti-inflammatoire	46
II.2.4. Etude de l'activité antipyrétique.....	47
II.3. Etude statistique.....	48
 Chapitre III. Résultats et Discussion.....	49
I .Résultats de l'étude phytochimique.....	49
I.1. Résultats de screening chimique de certains composés. Phytochimiques	49
I.2. Résultats de l'analyse quantitative.....	51
I.2.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	51
I.1.2.1.1. Dosage des flavonoïdes.....	51
I.2.1.2 Dosage des polyphénols.....	54
I.3. Résultat de l'étude qualitative- chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques des plante <i>Ruta montana</i> et <i>Onopordum acanthium</i>.....	56
I.3.1. Composés identifiés dans la fraction Ether de pétrole (<i>Ruta Montana</i>).....	57
I.3.2. Composés identifiés dans la fraction acétate d'éthyl.....	59
I.3.3. Composés identifiés dans la fraction butanolique (<i>Ruta montana</i>)...	61
I.3.4. Composés identifiés dans la fraction Ether de pétrole (<i>Onopordum Acantium</i>).....	63
I.3.5. Composés identifiés dans la fraction Chloroformique (<i>Onopordum Acantium</i>	64

I.4. Résultats des activités biologiques de <i>Ruta montana</i> et de <i>Onopordium acontium</i>	65
1.4.1. Résultat de l'activité antioxydant <i>in vitro</i> par la méthode radical DPPH°	65
1.4.2. Résultat de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	69
1.4.3. Résultat de l'activité antibactérienne	75
1.4.3.1. L'activité antibactérienne testée par la méthode des disques.....	75
1.4.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	80
1.4.3.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide	85
1.4. 4. Résultats de l'activité antipyrétique.....	90
Conclusion et perspective.....	93
Résumés.....	
Annexe.....	
Références bibliographiques.....	



Introduction :

La phytothérapie a été utilisée depuis des siècles pour traiter les infections. En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle.

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. D'un autre côté, la surproduction des espèces réactives d'oxygènes au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement. Cependant, l'utilisation de substances chimiques de synthèse anti-inflammatoires ou antioxydantes est accompagnée toujours d'effets secondaires indésirables, alors que l'utilisation de composés phytochimiques s'avère utile et sans effets secondaires.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques ainsi que les manifestations cliniques résultantes des symptômes de la fièvre ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse .

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités biologiques, anti-inflammatoire , antioxydante, antimicrobienne et antipyrétique des extraits de deux plantes différentes *Ruta montana* et *Onopordum acanthium* locales d'Algérie. De nombreuses espèces de ces deux genres sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques importantes.

Chapitre I

Aperçus

bibliographique

Chapitre I : Aperçus bibliographique

I. La phytothérapie et médecine classique

Le mot phytothérapie provient de 2 mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes »⁽¹⁾, la Phytothérapie utilise des plantes médicinales dans leur totalité ou certaines parties de la plante dans des buts thérapeutiques. La phytothérapie compte parmi les premières et les plus anciennes méthodes curatives depuis l'aube de l'humanité. C'est ainsi que les êtres humains utilisent des plantes depuis des siècles voire des millénaires à des fins thérapeutiques sur l'ensemble de notre planète, ce qui a permis aux hommes de générer au cours des siècles un large savoir et une immense expérience dans leur utilisation.

Historiquement parlant, la médecine classique n'existerait pas sans la phytothérapie. C'est avec le développement ultra-rapide des sciences naturelles au XIX^e siècle, et particulièrement avec les avancées de la chimie, que l'on a pu isoler des composants purifiés des plantes et produire leurs dérivés partiellement synthétiques, puis fabriquer de nouvelles molécules synthétisées chimiquement, pour finalement les introduire comme elles le sont actuellement dans l'arsenal de la médecine classique. Un grand nombre proviennent de la nature du moins en ce qui concerne leur structure de base.⁽¹⁾

Les substances et les composants purifiés à base de plantes ne sont pas l'apanage de la phytothérapie et ce malgré leur origine végétale mais sont classifiés dans la médecine classique. En effet les médicaments tirés des plantes ou d'origine végétale se distinguent des médicaments dits «classiques» par le fait que le principe actif du médicament n'est pas dû à une substance ou à une molécule particulière définie chimiquement. Une préparation à base de plantes contient une multitude de substances, lesquelles en synergie donnent l'effet thérapeutique voulu. Ainsi, en phytothérapie, c'est l'extrait dans sa totalité qui représente le principe actif. Dans la majorité des cas il n'y a pas une seule substance isolée qui soit responsable de l'effet thérapeutique voulu. ⁽²⁾

I.1. Les substances chimiques des plantes médicinales, leurs propriétés et leurs activités biologiques

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides, ils sont indispensables à la survie de ces plantes.

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité. (3)

I.1.1. Les polyphénols

Les polyphénols (8000 composés connus) représentent un groupe de métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal (**figure 1**) on y retrouve :

- Les flavonoïdes (flavonols, flavonoïdes, chalcones et dihydrochalcones, anthocyanidines et tanins condensés)
- Les acides phénoliques de types benzoïques ou cinnamiques et les tanins hydrolysables (galliques et ellagitannins)
- Les stilbenes
- Les lignines et subérines .(3)

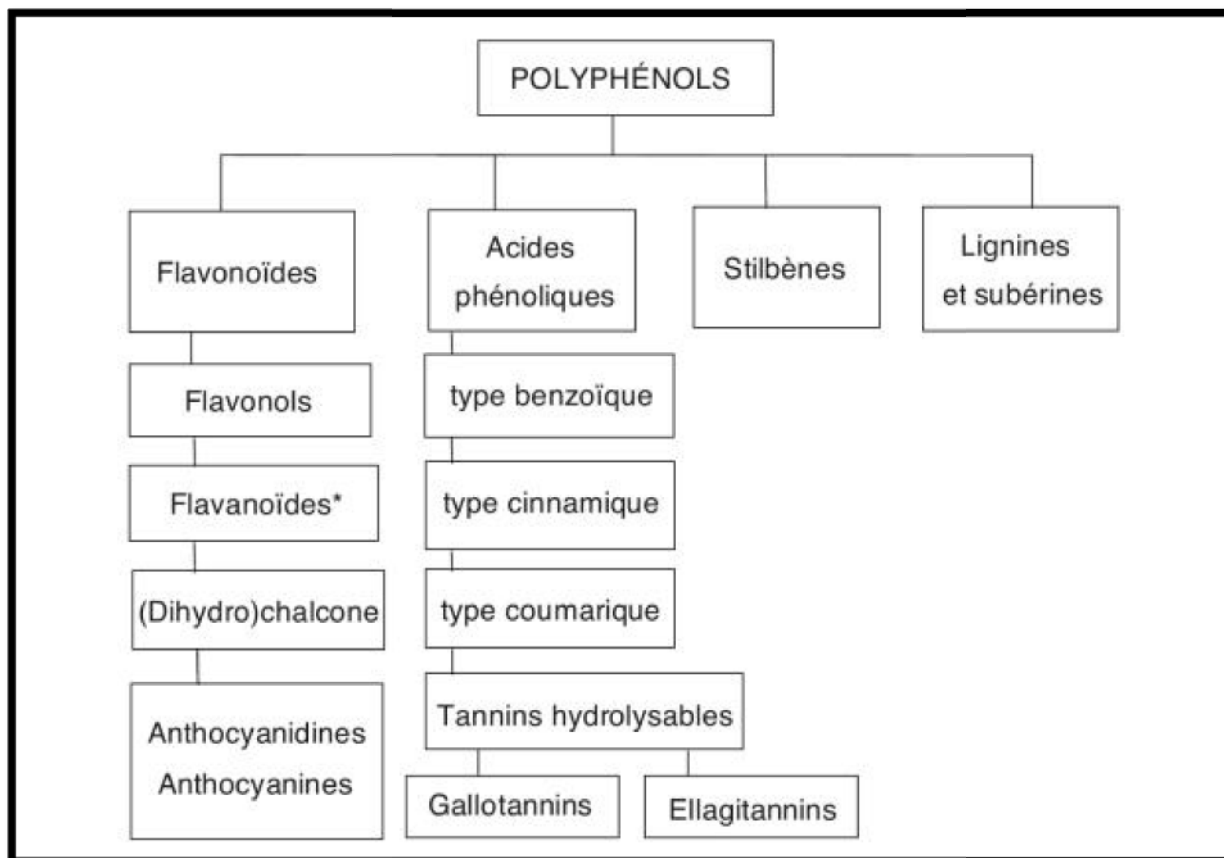


Figure1 : Différentes familles de polyphénols, polymères des flavonoïdes : proanthocyanidines, anthocyanogènes ou procyanidols.

I.1.1.1 .Les flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont des composés qui possèdent de fortes propriétés antioxydantes. Elles sont responsables de la couleur des aliments. Les flavonoïdes améliorent la fonction de la vitamine C et protègent de l'oxydation. On les retrouve dans une grande variété de fruits et de légumes et ils ont des effets bénéfiques pour le cœur, les artères, le foie, le système immunitaire, les tissus musculaires et le système nerveux. (4). Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbones (C6-C3-C6) (figures 2), correspondant à la structure du diphenylpropane (3). Au sein des flavonoïdes, on retrouve : les flavonols, les flavones (Figure3), chalcones et dihydrochalcones, anthocyanidines et tanins condensés.

I.1.1.1 .1. Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (5). Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans

l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (6).

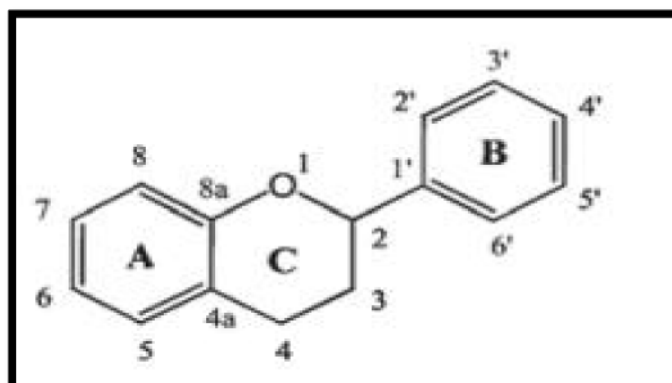


Figure 2 : Structure chimique de base des flavonoïdes

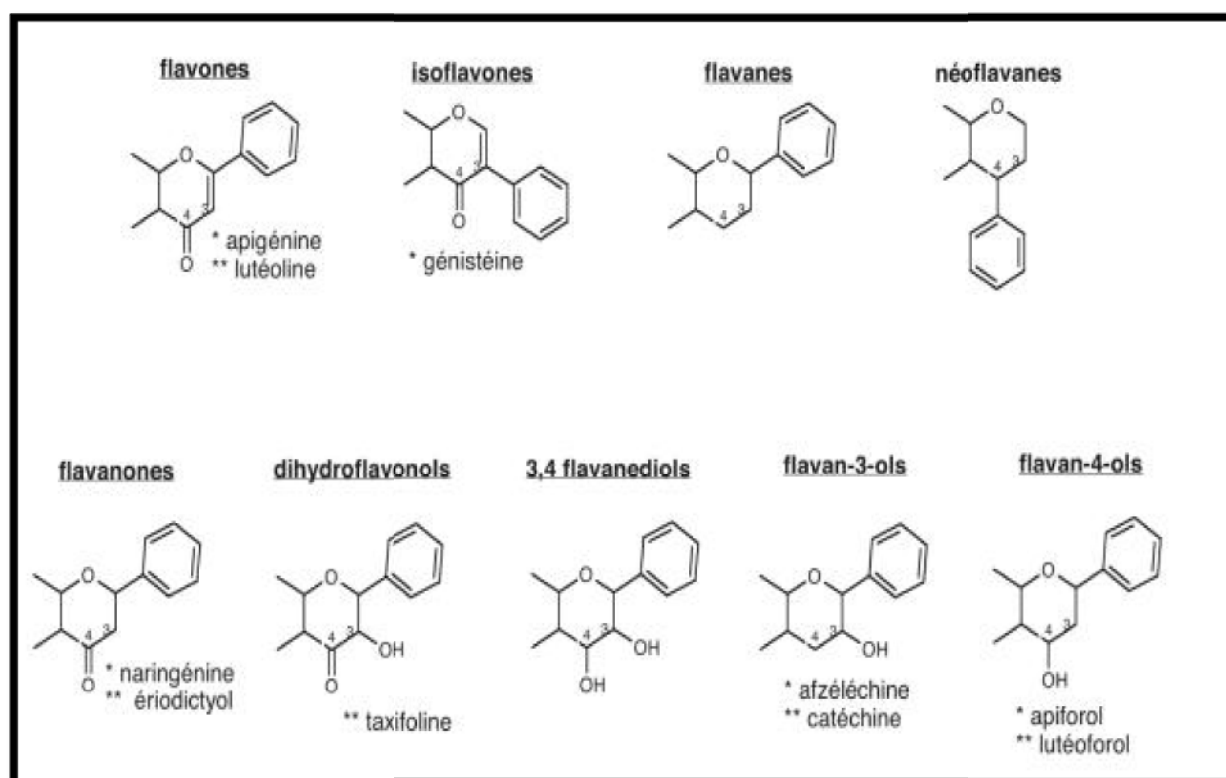


Figure 3 : structure chimique de différents flavonols et flavones

I.1.1.1.2. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement connus par leurs activités antivirales, antispasmodiques, anti tumorales, anti agrégation plaquettaires, antiallergiques, hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires, anti-hypertensives et antimicrobiennes (7). Certains flavonoïdes (notamment du soja) qui est une plante très riche en flavonoïdes ,et y possède un effet préventif sur le cancer du sein et de la prostate, comme elles préviennent aussi l'ostéoporose . (8)

De nombreuses études ont prouvé que les flavonoïdes déploient leurs activités pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro inflammatoires très actives. Cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase (9). Certaines kinases (PKC, la PI3kinase et tyrosine kinases) impliquées dans la réponse inflammatoire sont aussi affectée par les flavonoïdes. (10) La présence de la double liaison C2=C3 dans le noyau des flavonoïdes semble être essentielle à leur activité anti-inflammatoire(11) .Le potentiel anti-inflammatoire dépend également du profile d'hydroxylation des cycle A et B .(11)

Les flavonoïdes peuvent empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'aldose réductase. En effet, Ong et Khoo (1997) ont rapporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques.

En plus, les flavonoïdes ont une activité antioxydante. En effet, il peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition et par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ERO comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (12). Les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (13). Les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein). Cependant, leur teneur dans les lipoprotéines est mal connue, à la différence d'autres antioxydants incorporés dans les lipoprotéines tels que l' α -tocophérol et le β -carotène. (13)

I.1.1.2. Les acides phénoliques et tanins hydrolysables

Parmi les acides phénoliques, on distingue les dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1,2), ceux de l'acide cinnamique (plus leurs dérivés estérifiés) et des coumarines, tous possédant une structure du type (C6-C3). (4)

- Les acides hydrobenzoïques : leurs structures chimiques varient suivant les hydroxylations et méthoxylations sur le cycle phénolique aromatique.
- Les acides hydroxycinnamiques : qui peuvent exister sous une forme estérifiée par l'acide quinique.
- Les coumarines : possèdent une structure de base dérivant des acides ortho-hydrocinnamiques : elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexique.
- Les tanins hydrolysables : qui sont des esters d'acide phénolique, associés à un polyol. Ils sont divisés en ellagitannins et gallotannins. (4)

I.1.1.3. Les stilbènes

Plus de 30 stilbens et glycosides de stilbenes sont présents naturellement dans le règne végétal, la structure chimique de base des stilbens est composée de deux cycles aromatiques, joints par un pont méthylène. Les deux formes isomères de stilbenes (cis et trans) ont des propriétés chimiques et biologiques différentes. (4)

I.1.1.4. Lignines et subérines

Les lignines et subérines sont des précurseurs de polymères pariétaux des plantes constituant des facteurs de défense contre les agents pathogènes, chimiquement les lignines sont des polymères d'alcools coniféryliques, synapiliques et p-coumariliques. Par contre les subérines sont des polyesters des acides féruliques et p-coumariques.

I.1.2. Propriétés thérapeutiques des polyphénols

En plus de leurs rôles physico-chimiques, et physiologique dans les plantes ; les polyphénols se caractérisent par des propriétés de traitement extrêmement vaste dans le domaine thérapeutique. Parmi celle-ci :

- **Protection cardiovasculaire** : les flavonoles et les flavonoïdes sont à l'origine d'un effet cardioprotecteur via leur effet antioxydant (protection contre l'oxydation des LDLs), l'inhibition de l'activité plaquettaire et leurs propriétés vasodilatatrices . **(4)**
- **Activité anti-cancérogène** : Le xanthohumol qui est un type des polyphénols agit sur les trois stades de la cancérogenèse et peut exercer un effet chimopréventif, par inhibition de l'initiation et la croissance des tumeurs .
- **Activité anti-inflammatoire** : Les flavonoïdes altèrent la synthèse des éicosanoïdes (médiateurs de l'inflammation) ils diminuent le rapport leucotriènes / prostacyclines en modifiant l'activité lipoxigénase . **(4)**
- **Activité oestrogénique** : les prénylflavanones ont surtout été étudiés pour leur activité oestrogénique très puissante dans la stimulation de la synthèse des oestrogènes. leurs autres recommandations sont leurs applications dans la prévention ou le traitement des symptômes de la post(ménopause).

I.1.3. Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelles, renferment du carbone, de l'hydrogène et, en plus spécialement, de l'azote .la plupart possèdent une activité biologique marquée qui a suscité de longue date un intérêt thérapeutique .leur dénomination fait référence à leur caractère « alcalin » ou basique. **(14)**

II. Botanique et systématique des plantes médicinales : *Ruta montana* et *Onopordum acanthium*

II.1. La plante « *Ruta montana* »

II.1.1 Définition : c'est la rue des montagnes (synonymes : *Ruta legitima* Jacq. ; *Ruta tenuifolia* Gouan) ou bonne rue (15), appelée vulgairement en Algérie : *fidjlet el-djbel* ou *Fidjela*, a une odeur fétide très intense, se trouve sur les coteaux arides et dans les endroits secs et pierreux de la région méditerranéenne (16)

II.1.2. Description botanique

Plante vivace glabre; gris vert, à odeur forte (17), de 30 à 60 cm de hauteur à tige rameuse dans sa partie supérieure, semi-ligneux. Les feuilles, glauques finement découpées en segments linéaires, lancéolées ou souvent très allongées, enroulées en dessous par leur bord, leurs faces supérieures sont couvertes de pustules sécrétant une essence extrêmement malodorante (18). Les fleurs, petites de 4 à 5 mm, de couleur jaune, à pétales concaves, denticulés sur les marges (18, 19), calice persistant. Elles comportent 4 à 5 carpelles libres, multi-ovulés, à style soudé. A maturité, le fruit est une capsule globuleuse, s'ouvrant en deux valves et laissant apparaître une graine globuleuse noire et brillante (18). La floraison dans la période située entre Mai et Juillet. (20) (figure 4).



Figure4. Photos montrant les différents aspects de la plante *Ruta montana* ; écorces, plante entière et fleurs(A.B.C)

II.1.3. Air de répartition et habitat

Ruta montana pousse spontanément dans les rochers, les lieux arides (19), de la région méditerranéenne : Provence, Languedoc, Roussillon, Espagne, Portugal, Italie, Grèce, Turquie, Asie Mineure et Caucase (20), vieux murs et collines sèches (19). En Algérie, elle est rencontrée dans les zones montagneuses de l'intérieur sur l'Atlas Saharien et les pelouses arides (18, 19).

II.1.4. Systématique de la plante

Règne: *plantae*

Sous règne: *Tracheobionta* (plantes vasculaires)

Super division: *Spermatophyta* (plantes à graines)

Division: *Magnoliophyta* (plantes à fleurs)

Sous division: *Angiospermae*

Classe: *Magnoliopsida* (Dicotylédons)

Sous classe: *Rosidae*

Super ordre: *Rutanae*

Ordre: *Rutales*

Sous-ordre: *Rutineae*

Famille: *Rutaceae*

Sous-famille: *Rutoidées*

Genre: *Ruta montana*

Espèce: *Montana*

Nom vulgaire : Fidjel Eldjabal (19).

II.1.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Ruta montana très utilisée dans la pharmacopée traditionnelle (17). En règle générale, les différentes parties de la plante sont utilisées fréquemment comme abortif, antirhumatismal, antispasmodique, antiparasitaire et antalgique. (18)

II.2. La plante « *Onopordum acanthium* »

II.2.1. Définition

Le chardon aux ânes, ou onopordon fausse-acanthe (*Onopordum acanthium*) ; est une grande plante épineuse, de la famille des Astéracées. (21)

II.2.2. Description botanique

C'est une grande plante à cycle de végétation bisannuel, pouvant atteindre 2 m de haut. Plante acaule la première année, en forme de rosette de feuilles, elle produit la deuxième année de grandes tiges florifères, raides, très ramifiées. La racine du type pivotant est épaisse et très développée. (Figure 5)

Les feuilles sont grandes, oblongues, profondément divisées. Leur bordure épineuse se prolonge à la base le long de la tige. Elles sont vert blanchâtre, très cotonneuses surtout sur la face inférieure.

Les fleurs, pourpres, sont réunies en capitules globuleux de 3,5 à 5,5 cm de diamètre, à réceptacle charnu, à involucre cotonneux, qui s'épanouissent de juin à septembre. Les fruits, des akènes, sont surmontés d'une aigrette de poils plumeux de couleur roussâtre. (21)

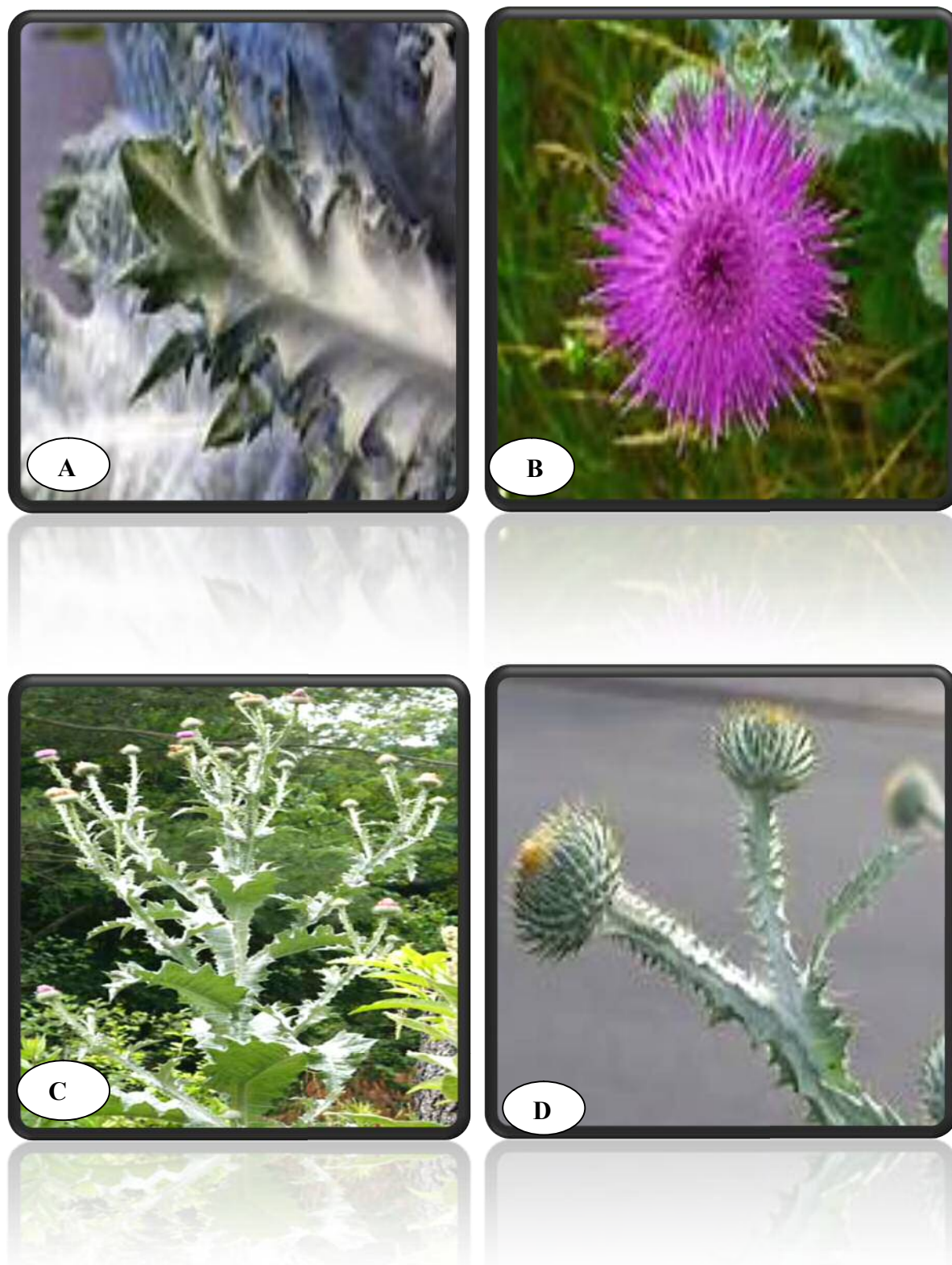


Figure 5 : photos montrant les différentes parties : feuilles, fleurs ,plante entière et tiges d'*Onopordum acanthium*(A,B,C,D)

II.2.3. Aire de répartition et habitat

Coton chardon est originaire d'Europe et d'Asie. La plante préfère les habitats avec des étés secs, tels que la région méditerranéenne, la croissance meilleure en sable, argile sableuse et les sols calcaires qui sont riches sels de inammonium(22). Il pousse dans les endroits rudéraux, ainsi que les pâturages secs et les champs perturbés. Ses habitats préférés sont les espaces naturels, sites perturbés, bords de routes, les champs, et en particulier des sites avec des sols fertiles, les zones agricoles, la gamme, prairies, les zones riveraines, gommage, arbustives vallées et les plaines le long des cours d'eau. Température et l'humidité, plutôt que les concentrations de nutriments du sol déterminent la performance écologique des espèces *Onopordum*.(23)

En Europe, la plante a tendance à coloniser les pâturages perturbés. Dans son aire de répartition naturelle, coton chardon est considéré comme un concurrent faible qui a besoin lacunes de régénération pour développer et maintenir des stands; les populations ont tendance à se replier quand la perturbation cesse. La plante a été largement introduite dans les latitudes moyennes à travers une grande partie de l'Amérique du Nord.

II.2.4. Systématique de la plante

Nom bionominal (Espece): *Onopordum acanthium*

Synonym : Acanthe sauvage , Onoporde, Chardon aux ânes, pet d'âne , Chardon écossais, Artichaut sauvage, Fausse acanthe , Chardon acanthi...

Regne : *Plantae*

Sous-regne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Sous –famille : *Carduoideae*(23)

Tribu: *Cynareae*

Genre : *Onopordum acanthium*

II.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Elle est cultivée comme plante ornementale pour son feuillage gras et de grandes fleurs (15). Elle a été utilisée pour traiter les cancers et les ulcères et de diminuer les rejets de muqueuses. Le réceptacle a été mangé dans les temps anciens comme un artichaut. Les poils cotonneux sur la tige ont été recueillis à l'occasion d'oreillers de trucs. Huile de graines a été utilisée pour la gravure et la cuisine.(22)

III. Rappels sur les activités biologiques étudiées

III.1. Stress oxydant cellulaire, radicaux libres et antioxydants

III.1.1. Définition

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces Réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. (25)

III.1.2. Les radicaux libres

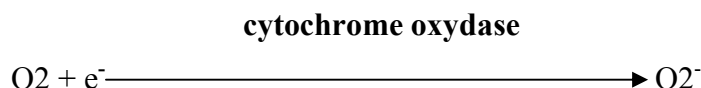
Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (26), cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre(27).

III.1.3. Les espèces réactives de l'oxygène

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$). (26,28)

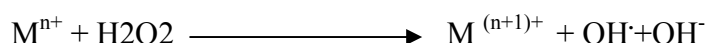
III.1.3.1. Le radical superoxyde

L'origine principale du radical superoxyde est sans conteste la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, ce système permet la production du radical superoxyde par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial.(29)



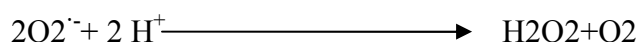
III.1.3.2. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est une espèce radicalaire hautement réactive. Il est principalement formé lors de réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont décrites sous le nom de réactions de Fenton: (26)



III.1.3.3. Le peroxyde d'hydrogène

Il se forme par une réaction de dismutation du radical superoxyde, catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).



Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante. (26)

III.1.4. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. Les principales cibles radicalaires sont:

III.1.4.1.L'oxydation de l'ADN

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN.

Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN protéines **(30)**
L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, ce qui donne naissance à un grand nombre de bases modifiées.

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. **(30)**

Les radicaux libres peuvent aussi attaquer les protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réparation) la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin **(31)**.

III.1.4.2.L'oxydation des protéines

L'action des radicaux libres a lieu sur les chaînes latérales de certains acides aminés comme le thiol des cystéines. A proximité des sites de liaison d'ions métalliques peuvent se dérouler des réactions d'oxydation qui produisent des acides aminés anormaux. Les radicaux libres sont également responsables de la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport). **(26)**

III.1.4.3.L'oxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. **(32)**

Cette réaction appelée peroxydation lipidique (**Figure.6**) se déroule en plusieurs étapes:

➤ **L'initiation**

Dans cette étape un acide gras polyinsaturé est attaqué au niveau d'un carbone situé entre deux doubles liaisons par un radical hydroxyle avec arrachement d'un atome d'hydrogène qui laisse un électron non apparié. L'acide gras subira alors une suite de réarrangements des doubles liaisons. (32)

➤ **La stabilisation**

Dans l'étape de la stabilisation, il se produit une formation d'un diène conjugué RO_2^* par coordination avec une molécule d'oxygène. (32)

➤ **La propagation**

Les alkoxy et peroxy-radicaux propagent l'oxydation par l'intermédiaire de RO_2 . (32)

➤ **La terminaison**

Les hydroperoxydes subissent plusieurs transformations, ils sont soit réduits par la glutathion peroxydase, soit ils l'oxydation continue et dans ce cas ils se fragmentent en aldéhydes toxiques. Cette réaction en chaîne se termine soit par l'intervention d'un composé antioxydant, soit par l'interaction de deux radicaux pour former une molécule stable. (32 ;33)

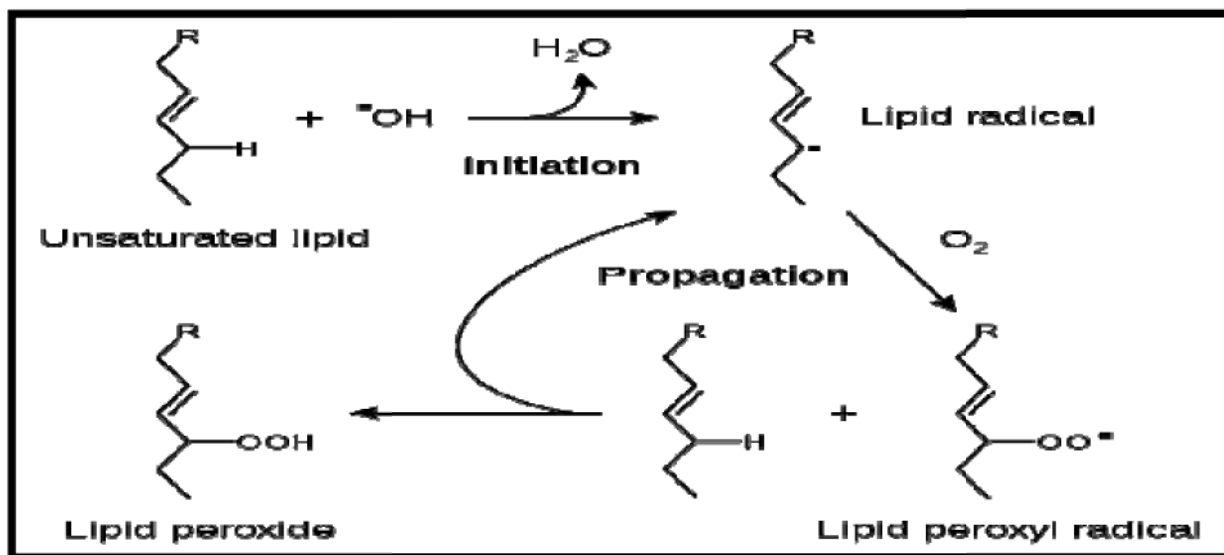


Figure.6.Mécanisme de la peroxydation lipidique

III.1.5. Les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion.

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule: (20)

III.1.5. 1. Les antioxydants endogènes « enzymatique »

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) et Thioredoxines (22). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (20).

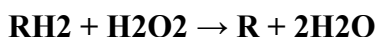
III.1.5.1.1. Superoxydes dismutases

La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Il existe trois isoformes de SOD chez les mammifères. Une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc, une forme mitochondriale associée au manganèse et une forme extracellulaire. Pour cette raison, cette enzyme représente une partie importante du système de défense contre les radicaux libres (34).

III.1.5.1.2. Catalase

La catalase est présente dans de nombreux tissus et particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. C'est un tétramère dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH sur la catalase augmente son efficacité et la protège contre l'inactivation (35).

Chez les mammifères, la catalase est particulièrement présente dans les peroxysomes. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en H₂O et O₂ empêchant ainsi la formation de radical hydroxyl. La catalase permet également de détoxifier différents substrats, tels que les phénols et les alcools par un couplage avec la réduction d'hydrogène :



III.1.5.1.3. Glutathions peroxydases

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Elle est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Elle assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type **LOOH** en **LOH** (35).

III.1.5.1.4. Thiorédoxines

Les thiorédoxines font l'objet de nombreux travaux concernant leurs capacités antioxydantes (34). Chez les Mammifères, elles sont localisées dans les mitochondries, le cytosol, et les peroxysomes, elles sont associées aux noyaux et aux membranes. Grâce à leur activité peroxydase, elles neutralisent le peroxyde d'hydrogène, le peroxy-nitrite et de nombreux hydroperoxydes. Malgré une activité plus faible que les GPx ou la catalase, elles pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes, du fait de leur quantité importante (0,1 à 0,8 % de protéines soluble cellulaire) et de leur large distribution dans la cellule (31).

III.1.5. 2. Les antioxydants exogènes « non enzymatique »

De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines, nutriments, composés naturels, ... etc. sont considérés comme des antioxydants. Notons à titre d'exemples, les plus courants: Antioxydants d'origine végétale : les vitamines (E, C), (36).

III.1.5. 2.1. Antioxydants d'origine végétale

Plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés antioxydantes remarquables. Les fruits et les légumes contiennent une grande variété d'antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes, les oligoéléments et surtout les polyphénols (36).

➤ **Vitamine E**

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂(37).

➤ **Vitamine C**

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (37).

➤ **Antioxydants phénoliques**

La propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger le radical libres : radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3OH) fortement réactif (38). Ils peuvent également protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidique.

➤ **Sélénium**

Le sélénium est un constituant de la glutathion peroxydase, enzyme qui joue un rôle intracellulaire antioxydant, voisin de celui de la vitamine E. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire. Cet effet de détoxification serait responsable des effets anti-cancéreux et antiveillessement, attribués au sélénium(39).

➤ **Zinc**

Cet oligo-élément est l'un des cofacteurs essentiels de la SOD. La prise de zinc conduit à long terme à l'induction de protéines antioxydantes comme les métallothionéines. Le zinc protège également les groupements thiols des protéines. Le zinc peut inhiber partiellement les réaction de formation des ROS induites par le fer ou le cuivre (40).

III.1.6. Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (42 ; 43).

III.2. L'inflammation

III.2.1. Définition

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. C'est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation(44).

Ce processus comprend :

- **des phénomènes généraux**, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable, le plus souvent par de la fièvre et éventuellement une altération de l'état général.
- **des phénomènes locaux** : l'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation. (44).

III.2.2. Les causes majeures de l'inflammation

Le phénomène de l'inflammation peut dater de plusieurs causes qui sont multiples et représentent les agents pathogènes, Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- **infection** contamination par des micro-organismes (bactérie, virus, parasites, champignons)

- **agents physiques** : traumatisme, chaleur, froid, radiations
- **agents chimiques** : caustiques, toxines, venins
- **corps étrangers** : exogènes ou endogènes
- **défaut de vascularisation**: réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie.
- **agression dysimmunitaire** (anomalie de la réponse immunitaire, allergies, autoimmunité...)(44).

III.2.3. Les médiateurs et le déroulement de la réaction inflammatoire

L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, des modifications de la matrice extra-cellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou antiinflammatoires (**Figure 7**), et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire. Quel que soit son siège et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, l'organe où elle se déroule, le terrain physiologique de l'hôte : tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel(44).

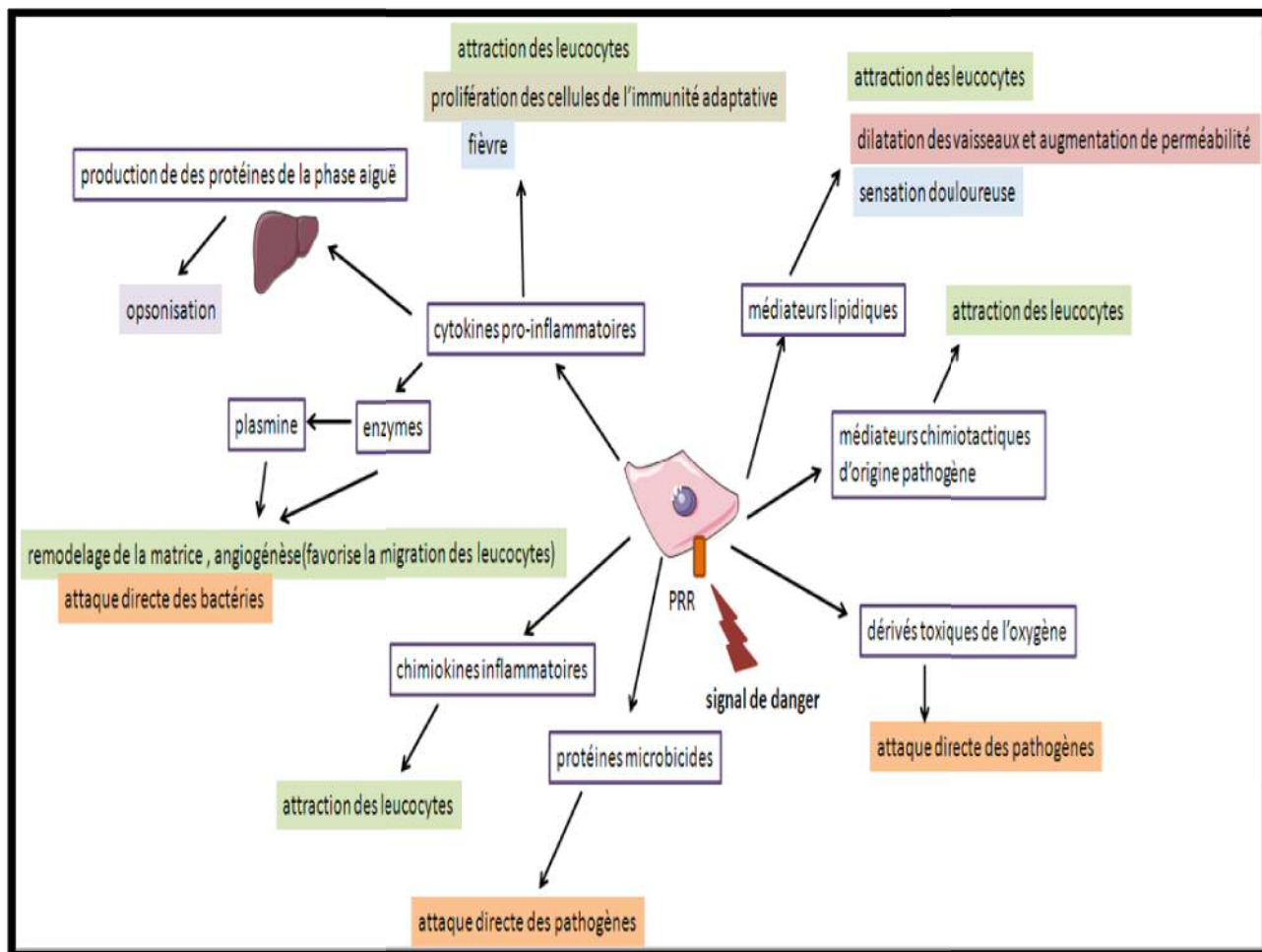


Figure 7 : Les médiateurs de l'inflammation

III.2.4. Type d'inflammations

III.2.4.1. Inflammations aiguës

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante. (44)

III.2.4.2. Inflammations chroniques

Inflammations n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques :

- les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus (détersion incomplète) ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le

même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées. (44)

- Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes, ou d'affections où les mécanismes dysimmunitaires sont prépondérants (exemple : hépatite chronique active secondaire à une infection par virus de l'hépatite B ou C). (44)

III.2.5. Les anti-inflammatoires intervenants lors des mécanismes inflammatoires

III.2.5.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (ATS)

➤ Les corticoïdes

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse. Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes (GR) du cytoplasme de la cellule (45). Après quoi, le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes (**Figure 8**).

Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2 (45).

Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la transactivation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire (46).

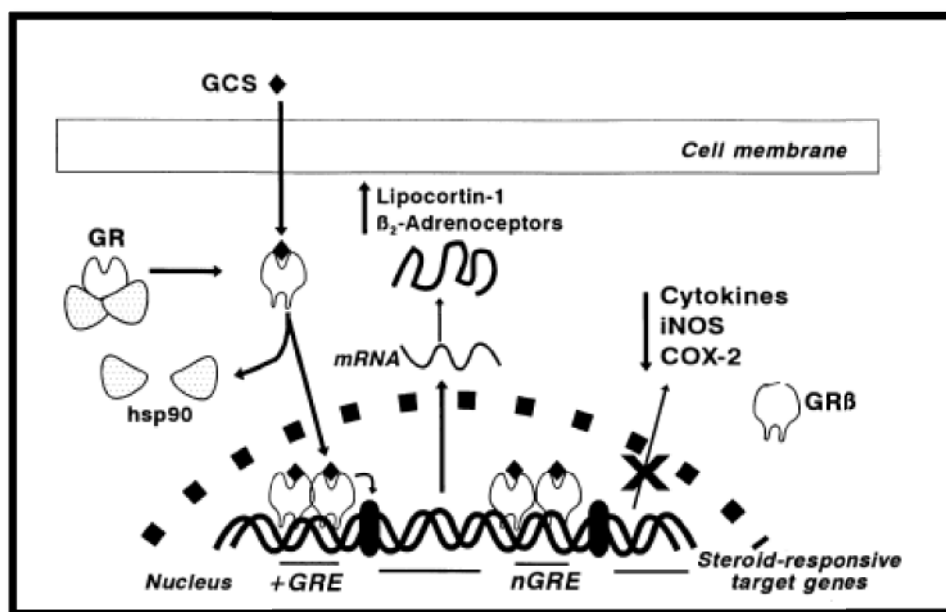


Figure 8 : Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (45)

III.2.5.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sur le marché mondial.

Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971 (**Figure 9**), il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation (**Figure 9**). Même si d'autres modes d'action existent, cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques des prostaglandines (47). Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier).

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères (48).

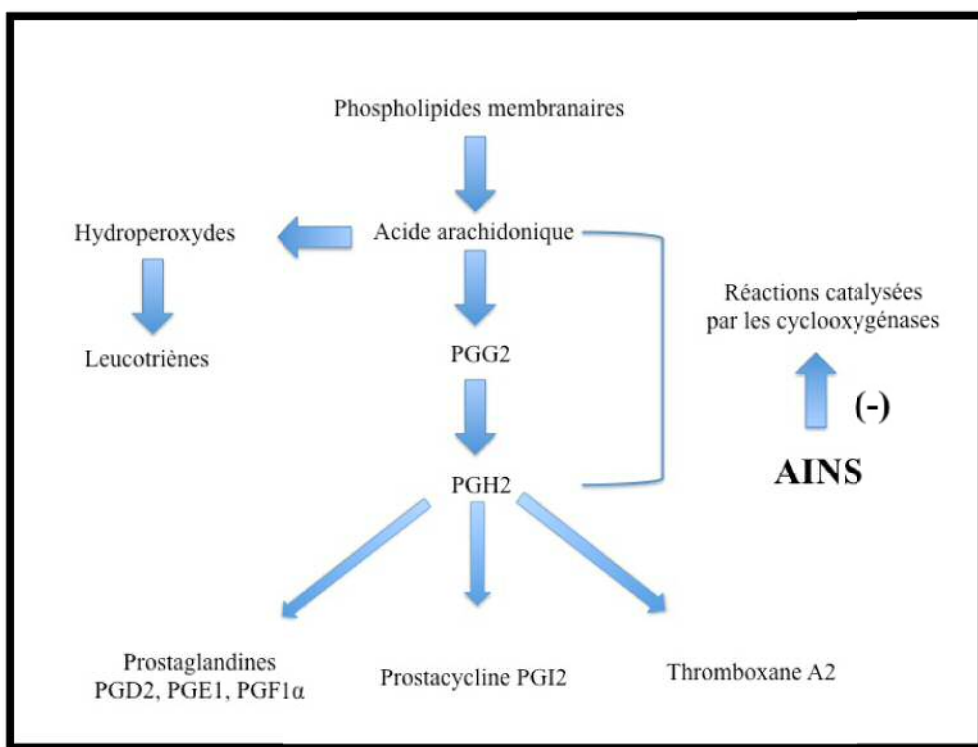


Figure 9 : mécanisme d'action des AINS (47)

III.2.5.3. Les anti-leucotriènes.

Leur développement est directement lié à la mise en évidence du rôle de ces médiateurs dans l'inflammation. En effet, ils ont un rôle important sur le recrutement des cellules de l'inflammation (LT B4 surtout) et sur la vasodilatation et l'extravasation plasmatique au site de l'inflammation (LTC4, D4 et E4). Au niveau des bronches, ils ont aussi un effet de stimulation des sécrétions et ce sont de puissants bronchodilatateurs. Les anti-leucotriènes actuellement utilisés en clinique agissent en bloquant les récepteurs cellulaires des cysteinyl-leucotriènes (LTC4, D4 et E4). Ils sont indiqués dans le traitement de fond de l'asthme où ils ont une action complémentaire des corticoïdes inhalés. D'autre voie de blocage, par inhibition de la synthèse, sont à l'essai ainsi que le développement d'inhibiteurs spécifiques du LTB4 qui pourraient être utiles dans d'autres pathologies où les polynucléaires neutrophiles sont impliqués. (47)

III.2.5.4. Les inhibiteurs des cytokines pro-inflammatoires

Ils sont directement issus des progrès des connaissances quant au rôle de différentes cytokines dites pro-inflammatoires, en particulier du TNF α et de l'IL-1. Les molécules utiles au blocage de ces cytokines sont essentiellement représentées par des anticorps monoclonaux ou des protéines recombinantes.

III.2.6. Pathologies inflammatoires

Les anomalies inflammatoires sont un groupe de troubles qui sous-tendent une grande variété de maladies humaines. Le système immunitaire est souvent impliqué dans les troubles inflammatoires, ont manifesté dans les deux réactions allergiques et certaines myopathies, avec de nombreux troubles du système immunitaire résultant de l'inflammation anormale. Les maladies non-immunes avec origines étiologiques dans les processus inflammatoires incluent le cancer, l'athérosclérose et la maladie cardiaque ischémique. (49)

III.2.6.1. L'Athérosclérose

Autrefois considérée comme une maladie de stockage de lipide fœde, implique en fait une réponse inflammatoire en cours. Les progrès récents de la science fondamentale ont établi un rôle fondamental pour l'inflammation dans la médiation de toutes les étapes de cette maladie de l'initiation par la progression et, finalement, les complications thrombotiques de l'athérosclérose. Ces nouveaux résultats fournissent des liens importants entre les facteurs de risque et les mécanismes de l'athérogenèse. Des études cliniques ont montré que cette biologie émergeant de l'inflammation dans l'athérosclérose applique directement à des patients humains. Altitude dans les marqueurs de l'inflammation prédit les résultats des patients atteints de syndromes coronariens aigus, indépendamment des lésions myocardiques. (50)

III.2.6.2. Allergies

Une réaction allergique, officiellement connu comme hypersensibilité de type 1, est le résultat d'une réponse immunitaire inappropriée déclenchant l'inflammation. Un exemple courant est la fièvre des foin, qui est causée par une réaction d'hypersensibilité par les mastocytes de la peau à des allergènes. Mastocytes sensibilisés pré répondent par dégranulation, libérant des produits chimiques vasoactives telles que l'histamine. Ces produits chimiques se propagent une réponse inflammatoire excessive caractérisées par une dilatation

des vaisseaux sanguins, la production de molécules pro-inflammatoires, la libération de cytokines, et le recrutement de leucocytes (51), réponse inflammatoire sévère peut mûrir dans une réponse systémique connu comme l'anaphylaxie.

III.2.6.3. Myopathies

Myopathies inflammatoires sont causés par le système immunitaire inappropriée attaquer les composants de muscle, ce qui conduit à des signes d'inflammation musculaire. Ils peuvent se produire en association avec d'autres troubles immunitaires, comme la sclérose systémique, et inclure la dermatomyosite, la polymyosite, la myosite et de corps d'inclusion (51).

III.2.6.4. Cancer

Inflammation orchestre le microenvironnement autour des tumeurs, contribuer à la prolifération, la survie et la migration(28). Les cellules cancéreuses utilisent sélectines, des chimiokines et de leurs récepteurs pour l'invasion, la migration et les métastases(52). D'autre part, de nombreuses cellules du système immunitaire contribuent à l'immunologie du cancer, en supprimant le cancer(53), intersection moléculaire entre les récepteurs d'hormones stéroïdes, qui ont des effets importants sur le développement cellulaire, et les facteurs de transcription qui jouent des rôles clés dans l'inflammation, tels que NF-kB, peut médier certains des effets les plus critiques de stimuli inflammatoires sur les cellules cancéreuses (54). Cette capacité d'un médiateur de l'inflammation pour influencer les effets des hormones stéroïdes dans les cellules, est très susceptible d'affecter la carcinogenèse d'un côté.; d'autre part, en raison de la nature modulaire de plusieurs récepteurs d'hormones stéroïdes, cette interaction peut offrir des moyens pour interférer avec la progression du cancer, en ciblant un domaine de protéine spécifique dans un type cellulaire spécifique.

III.3. Infections bactériennes et substances antimicrobiennes

Une infection bactérienne est une maladie provoquée par une bactérie, un organisme unicellulaire dépourvu de noyau. Il existe un très grand nombre d'infections bactériennes pouvant toucher l'être humain. En fonction du type de bactérie, telle ou telle région de l'organisme sera infectée, par exemple la gorge (angine bactérienne), la vessie (cystite) ou encore le coeur(endocardite bactérienne). Si certaines infections bactériennes sont très bénignes, d'autres au contraire peuvent être mortelles(55).

III.3.1. Les substances antimicrobiennes

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antimicrobiennes. Quel que soit leur origine. (antibiotiques et autres) Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique)(55).

III.3.1.1. Résistance aux antimicrobiens « antibiotique »

On parle de résistance d'une bactérie à un antibiotique lorsque cette bactérie est capable de continuer à se développer en présence de l'antibiotique en question. Il existe une grande variété de mécanismes d'action que l'on peut regrouper dans les grandes catégories suivantes :

➤ **La mutation de la cible de l'antibiotique.**

Chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise dans la cellule : paroi, ribosome... La présence d'une modification consécutive à une mutation modifie le site de fixation et empêche ainsi la liaison de l'antibiotique.

➤ **La modification de la cible de l'antibiotique.**

Une enzyme spécifique effectue une modification chimique covalente de la cible, par exemple une méthylation, ce qui inhibe la fixation de l'antibiotique, comme dans le cas précédent, mais sans qu'il y ait altération du génome. Ce type de mécanisme est rencontré dans la résistance aux macrolides, où il existe une méthylase qui confère la résistance en modifiant l'ARN ribosomique au niveau du site de liaison de l'antibiotique. (56)

➤ **La sur-expression de la cible de l'antibiotique.**

En produisant davantage de la macromolécule ciblée, la bactérie arrive à maintenir suffisamment d'activité biologique pour se développer, malgré la présence de l'antibiotique.

➤ **Le contournement métabolique.**

La bactérie active une voie métabolique alternative qui prend le relais de la voie métabolique bloquée par l'antibiotique. La fonction biologique est ainsi maintenue. (56)

➤ **La modification de l'antibiotique.**

De nombreuses souches résistantes fabriquent une enzyme qui modifie ou qui clive la molécule d'antibiotique, la rendant inactive. C'est le mécanisme principal de résistance aux β -lactamines (famille de la pénicilline et des céphalosporines) qui implique les enzymes de la famille des β -lactamases.

➤ **La réduction de la perméabilité membranaire.**

La bactérie « ferme » les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Ces pores sont normalement constitués par des protéines qui forment de canaux et que l'on appelle des porines. Les bactéries résistantes réduisent leur nombre de porines (56)

➤ **L'efflux des antibiotiques.**

Les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par pompage actif hors de la cellule, qui « recrache » littéralement les composés toxiques au dehors. C'est l'un des principaux mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales.

➤ **Défense altruiste.**

Des bactéries très résistantes sont capables de synthétiser l'indole en très grande quantité pour subvenir aux besoins des bactéries sensibles. Ce composé organique possède une double fonction de résistance : efflux des antibiotiques et activation d'une voie métabolique empêchant la synthèse de radicaux libres qui peut être favorisée par l'antibiotique (57).

III.3.2. Activité antimicrobienne des extraits des plantes

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien acceptés par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) (58).

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenouil (*Foeniculum vulgare*), menthe (*Mentha piperita*), thym (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (59). D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (60).

III.3.3. Description de souches bactériennes étudiées

III.3.3.1. *Escherichia coli* :

Un bacille à gram négatif (61) ,de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm (62).

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. (62).

➤ Classification

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma Proteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Escherichia*

Non binominal : *Escherichia coli*

III.3.3.2. *Staphylococcus aureus* (sensibles et résistante)

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré. *S. aureus* représente est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (62).

➤ Classification

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Non binominal : *Staphylococcus aureus*

III.3.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 μm de long et 0.5 à 0.8 μm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ». *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3^{ème} rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires (63).

➤ **Classification**

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma Proteobacteria*

Ordre : *pseudomonadales*

Famille : *pseudomonadaceae*

Genre : *Pseudomonas*

Non binominal : *Pseudomonas aeruginosa*

III.3.3.4. *Proteus mirabilis*

Est une bactérie de type bacille à Gram négatif appartenant aux entérobactéries et au genre *Proteus*. Elle est commensale du tube digestif des animaux et peut être responsable d'infections essentiellement urinaires et cutanées. Cette bactérie est habituellement sensible aux antibiotiques actifs sur les entérobactéries, à l'exception de la colistine et des cyclines.

➤ **Classification**

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma Proteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Proteus*

Non binominal : *Proteus mirabilis*

III.3.3.5. *Salmonella ssp*

Les *salmonelles* (*Salmonella*) forment un genre de protéobactéries appartenant à la famille des entérobactéries. Elles mesurent 0,7 à 1,5 µm de diamètre, pour 2 à 5 µm de longueur avec un flagelle. Elles provoquent des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la toxi-infection alimentaire.

➤ **Classification**

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma Proteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Salmonella ssp*

III.4.L'hyperthermie et fièvre

L'hyperthermie est l'élévation locale ou générale de la température du corps au-dessus de la valeur normale (37 à 37,5 °C chez l'humain), en raison de l'accumulation de chaleur exogène.

(64)

Elle peut résulter :

- d'une exposition à la chaleur du soleil : c'est l' « insolation » appelée parfois, depuis 1919 « coup de bambou » **(64)**.
- d'une exposition à la chaleur ambiante (canicule, ambiance industrielle, incendie) : c'est le « coup de chaleur classique »
- d'un effort intense avec une mauvaise évacuation de la chaleur (à cause d'une ambiance trop chaude et humide ou de vêtements trop isolants) : c'est le « coup de chaleur d'exercice » ou « d'effort ».

Chez l'être humain, il y a risque de décès au-delà de 41,5 °C (complications cérébrales irréversibles).

Il faut noter la différence entre fièvre et hyperthermie : la fièvre est une des composantes de la réaction inflammatoire primaire. Le « thermostat » central indique une valeur de référence plus élevée qu'à l'accoutumée pour faciliter la "lutte" contre les "agresseurs". Libération des substances pyrogènes, exogènes d'origine bactériennes ou virales. L'élévation de la température corporelle est produite par le corps. Par contre l'hyperthermie résulte de l'accumulation de chaleur exogène c'est-à-dire issue de l'environnement et non pas produite par le corps. Bien que les deux mots soient souvent pris comme synonymes, utiliser hyperthermie au lieu de fièvre est impropre. (64)

III.4.1.Mécanisme de la fièvre

Relevons en premier lieu que la fièvre est souvent un symptôme (et non une maladie) caractéristique d'un problème de l'organisme et qui peut être associé à d'autres symptômes que la fièvre comme par exemple des douleurs musculaires ou osseuses, de la fatigue, des maux de tête ou encore des douleurs. La fièvre est au début habituellement accompagnée de frissons en raison de la production de chaleur par le corps.(64)

Le mécanisme de la fièvre peut être comparé à un thermostat d'une maison pour signaler et régler la température. En effet lorsque la fièvre augmente (par exemple au début d'un refroidissement) le corps émet des substances qui augmentent la température du "thermostat" du cerveau. De ce fait le corps croit que la température normale est supérieure à 37°C par exemple à 39°C. C'est pourquoi on peut ressentir des frissons au début de l'apparition de la fièvre, car le corps a froid (vu qu'il est en dessous de la valeur du "thermostat" du cerveau) et va donc réagir en augmentant progressivement la température du corps jusqu'à la valeur de 39°C (pour cet exemple). .(64)

A l'inverse lorsque la fièvre descend (par exemple après avoir pris des médicaments) on transpire et on a chaud, car le thermostat revient à 37°C mais la température du corps étant toujours à 39°C, il devra ainsi transpirer pour évacuer cette chaleur. Dans ce cas pour accélérer la diminution de la fièvre un bain froid est tout à fait conseillé et justifié. En général la fièvre disparaît après quelques jours.(64)

III.4.2. Température corporelle

La température normale du corps ne correspond pas à une valeur particulière mais plutôt à une plage de températures. Elle ne correspond donc pas à une valeur particulière. Elle dépend de la personne, de l'âge et de l'endroit où elle est mesurée. Des facteurs comme l'activité physique et le moment de la journée peuvent également la modifier. **.(64)**

Tableau 1 : montrant les valeurs normales de la température corporelle.(64)

Partie du corps	Plage de températures normales
Rectum	36,6°C à 38,0°C (97,9°F à 100,4°F)
Oreille	35,8°C à 38,0°C (96,4°F à 100,4°F)
Bouche	35,5°C à 37,5°C (95,9°F à 99,5°F)
aisselle	34,7°C à 37,3°C (94,5°F à 99,1°F)

III.4.3. Les antipyrétiques

Les **antipyrétiques** sont des médicaments dont le but est de lutter contre un symptôme, la fièvre.

Un objectif de traitement basé sur la tolérance est préférable, étant donné qu'un antipyrétique est un traitement de confort. Les médicaments à privilégier sont le paracétamol et l'ibuprofène. Des mesures simples sont généralement associées, comme l'hydratation et le déshabillage, en fonction de leur tolérance.

Exemples d'antipyrétiques : paracétamol, classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens , acide acétylsalicylique (aspirine) , ibuprofène, quinine. **(64)**



Chapitre II

Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Notre travail expérimental ayant pour objet l'étude de l'activité biologique des extraits bruts de deux Plantes médicinales *Ruta montana* et *Onopordum acanthium*. L'étude expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire de Biochimie, Université Abbès Laghrour - Khenchela.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique (Echantillonnage)

I.1.1. Matériel végétal

Il est constitué d'extraits organiques de la partie aérienne de la plante médicinale *Ruta montana* récolté dans la région de Mila en Mai 2012 et identifiée par Mm Kabouche Z professeur au Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST) de phytochimie, à l'université Mentouri Constantine et des extraits organiques d' *Onopordum acanthium* qui a été récoltée de la région d' El Hamma. Khenchela en 10 Juin 2011 et identifiée par Pr :Benaayache.

I.1.2. Les souches microbiennes testées

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antimicrobienne des extraits *Ruta montana* et *Onopordum acanthium* sont les suivantes :

- *Pseudomonas Aeruginosa*(ATCC 27853)
- *Staphylococcus Aureus subp Rosenbach*(sensible), (ATCC 25923)
- *Staphylococcus Aureus subp Rosenbach*(résistante), (ATCC 43300)
- *Echerichia Coli*, (ATCC 25922)
- *Proteus Mirabilis spp*
- *Salmonella ssp*

Elles ont toutes été fournies par le laboratoire de microbiologie

I.1.3. Matériel animale

L'activité antipyrétique de l'extrait méthanolique a été réalisée sur des rats Wistar albinos mâles provenant de l'institut Pasteur d'Alger, Algérie. Les animaux sont répartis en 4 lots ayant libre accès à l'eau et à la nourriture. Les animaux destinés au traitement sont préalablement mis en période d'adaptation allant de 7 à 15 jours.

I.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl_3 , acide sulfurique (H_2SO_4), HCl , acide acétique, NaOH , NH_4OH , KI , I_2 , NaCl , acide gallique, AlCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, FeCl_3 , gomme arabique, acide orthophosphorique, Quercétine, méthanol, n-butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme proviennent tous de Sigma-Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Rotavapeur, Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau, Chambre d'observation UV, Bain Marie, Etuve, Agitateurs magnétiques, vortex, Autoclave.

II. Méthodes

II.1. Méthodes concernant le matériel végétal

II.1.2. Screening chimique des plantes

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et responsables de propriétés pharmacologiques.

Les tests phytochimiques sont réalisés sur l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana* et *Onopordum acanthium*

II.1.2.1. Recherche des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 2%, sont ajoutées à 2 mL de l'extrait brut méthanolique. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes. Le test est considéré positif s'il ya l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité. (65)

II.1.2.2. Recherche des saponosides

- **Test 1** : 5 ml de l'extrait brut méthanolique sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides. (65)
- **Test 2** : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques. (66)

II.1.2.3. Recherche des flavonoïdes

5 ml de l'extrait méthanolique sont traités avec quelques gouttes d' AlCl_3 (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune. (67)

II.1.2.4. Recherche des composés réducteurs :

- Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl_3 sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique). (66)

Parmi les composés réducteurs on note les coumarines, la mise en évidence de ces dernières se fait selon la méthode décrite par **Benmehdi., 2000**. Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques minutes. Ajouter 0,5 ml de NH_4OH (10%), (1 mg/ml) . Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.

II.1.2. 5. Recherche des alcaloïdes :

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. 5 ml d'HCl (2N) sont ajoutés à l'extrait et chauffer dans un bain marie. Après la Filtration, le filtrat est traité avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels.(67)

II.1.3. Etude quantitative

II.1.3.1. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes d'extraits, méthanolique, éther de pétrole, acétate d'éthyle et butanolique de *Ruta montana* et d'extrait méthanolique, chloroforme et éther de pétrole d'*Onopordum acanthium* ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium; (68)1 ml de chaque extrait (préparés dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (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 µg / ml, chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les extraits servira à la quantification des flavonoides. La teneur en flavonoides à été exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g E).

II.1.3. 2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de *Ruta montana* et *Onopordum acontium* ont été effectué selon la méthode de bleu de Prusse (69) ,modifiée par Graham (1992). Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium (K₃Fe[CN]₆) par les polyphénols pour donner les ions ferreux (Fe²⁺), ces derniers réagissent avec le chlorure de fer(FeCl₃) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de chaque extrait (dilués dans l'eau distillée ou dans le méthanol) a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du K₃Fe(CN)₆ (0.016 M) puis 1 ml du FeCl₃ (0.02 M, dans le HCl 0.1 N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle de temps d'une minute. Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml Gomme

Arabique 1 %, 30 ml acide phosphorique 85 % et 90 ml de l'eau distillée) ont été ajoutés et l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0-200 µg / ml) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg EAG / g E).

II.1.4. Etude qualitative

II.1.4.1. Chromatographie sur couche mince

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.

II. 1.4.2. Protocole de CCM sur gel de silice

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium.

L'extrait est 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 sont 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 est effectuée par l'utilisation d'éluant suivants:

- Les extraits de *Ruta montana*
- Les extraits d'*Onopordum acanthium*

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 365 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les Rf. (70)

II.1.4.3. Calcul du Rapport frontal

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.

II.2. Etude de l'activité biologique des extraits de *Ruta montana* et de *Onopordum acontium*

II.2.1. Estimation *in vitro* de l'effet Scavenger des extraits vis-à-vis du radical libre DPPH°

La capacité de l'extrait à piéger les radicaux libres est déterminée par une méthode colorimétrique, simple et rapide. La méthode de **Koleva et Coll,2002** utilise le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) qui, à l'état stable, possède une coloration violette foncée, cette dernière devient jaune pâle, à l'état réduit du radical. Ce changement de couleur est traduit par une décroissance du radical DPPH° à 517 nm.

A- Réalisation de l'essai

Le DPPH° 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) est 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 l'extrait, les dilutions suivantes ont été préparées : C_2 : 5mg/ml, C_3 : 3mg/ml, C_4 : 2mg/ml, C_5 : 1mg/ml, C_6 : 0,5 mg/ml, C_7 : 0,25 mg/ml, C_8 : 0,12mg/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 517nm 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.

B- Expression des résultats

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH° de 50% , les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du DPPH° et donnés selon la formule suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire \%} = [(A_B - A_E) / A_B] \times 100$$

A_B et A_E sont les valeurs de l'absorbance du blanc et de l'échantillon respectivement à 517 nm. Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures $\pm$ écart type.

II.2.2. Etude de l'activité antibactérienne

Dans le présent test, nous avons utilisé la technique de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri en adaptant la méthode de disques décrite par Bauer (71). Pour les résultats montrant un effet positif contre les souches bactériennes testées, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée sur milieu liquide puis l'effet bactéricide (CMB) est déterminé sur milieu gélosé.

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

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique a été identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits : de *Ruta montana* et *Onopordum acanthium* .

➤ Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure sur milieu gélosé des bactéries à tester (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9%. Bien homogénéiser la suspension bactérienne. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

➤ L'ensemencement

Le milieu de culture utilisé est Muller-Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Couler 20ml de la gélose Muller-Hinton dans chaque boîte de pétri, et laisser solidifier. Tremper un écouvillon stérile dans la

suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétri 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

NB. Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

➤ **Préparation des disques d'aromatogramme**

- Stériliser du papier Wattman n°3 coupé en disques de 6mm de diamètre à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes ;
- Imprégner les disques avec 30µl de différents extraits repris dans le méthanol pour à raison de 200 mg/ml (6mg par disque). Finalement on prépare des disques imprégnés de méthanol (le contrôle négatif). Des disques d'antibiotique ont été également utilisés comme contrôle positif pour déterminer la sensibilité de chaque souche bactérienne testée;
- Les disques imprégnés des différents extraits sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Il en est de même pour les disques de contrôle.

➤ **Incubation et lecture**

- Les diamètres des zones d'inhibition(ZI) sont mesurés autour des disques après une pré-incubation de 30minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 ou 48 heures selon le germe;
- Les expériences sont réalisées en trois répétitions et les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD (standard déviation). La souche ayant un diamètre $D < 8\text{mm}$, $9 \leq D \leq 14\text{mm}$, $15 \leq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++), extrêmement sensibles (+++).

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

Pour chaque extrait et fraction organique, on prépare par la méthode de double dilution, une gamme de concentrations stérile, allant de 80 à 0.625 mg/ml avec le méthanol. On ajoute dans des tubes à essai, 1 ml de chaque concentration et 1 ml d'inoculum bactérien et 2 ml de bouillon nutritif .La gamme de concentration de chaque extrait subit alors une

dilution de moitié et s'étale comme suit: 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 et 0,625 mg/ml. On prépare également un tube témoin de croissance contenant 2 ml de bouillon nutritif, 1 ml méthanol et 1 ml d'inoculum; puis un tube témoin de stérilité contenant 1 ml méthanol et 2ml de bouillon nutritif stérile. La gamme de concentrationensemencée, ainsi que les deux témoins sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, on examine la croissance bactérienne, dans chaque tube, qui se traduit par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe. (44)

II.2.2.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

Après la lecture de la CMI, on effectue des repiquages en strie sur une gélose Muller-Hinton correspondant aux tubes sans croissance visible. Ces repiquages sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h. La CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montre une croissance de germe inférieure ou égale à 0.01% de survivants (72).

II.2.3..Activité Anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits méthanolique de *R. montana* et *O.acanthium* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité a été effectuée avec 3 types de concentrations pour chaque extrait (100 µg/ml, 250 µg/ml et 500 µg/ml).

La méthode consiste a préparé quatre solution.(73)

- **La solution d'essai** (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SBA) 5 % et 0,05 ml d'extrait méthanolique .
- **La solution control test** (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé.
- **La solution contrôle produit** (0,5 ml) composé de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extrait méthanolique.
- **La solution standard test** (0,5 ml) compose de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 250 µg/ml.

Les échantillons ont été incubées à 37 ° C pendant 20 min, ensuit la température était augmenté pour garder les échantillons à 57°C pendant 3 min, après refroidissement des tubes,

2,5 ml de la solution phosphate tampon saline (pH 6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessus, l'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV –visible à 255nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit:(73)

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 - \frac{\text{ABS de la solution test} - \text{ABS de la solution de controle produit}}{\text{ABS de la solution controle test}} * 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparé avec le Diclofenac sodium (100 µg/ml, 250 µg/ml et 500 µg/ml).

II.2.4.Etude de l'activité antipyrétique

18 Rats wistar sont utilisés pour l'étude de l'activité antipyrétique des extraits méthanoliques de *Ruta montana* ou *Onopordum acanthium*. Les rats sont placés à jeun pendant 24 H avant l'expérience. L'hyperthermie est induite par l'injection sous-cutanée d'une suspension aqueuse de levure de bière à 20% à la dose de 10ml/kg poids corporel, Les températures rectales sont prélevées 18 H après l'injection de levure à l'aide d'un thermomètre. Les animaux qui ont montré une augmentation de 0.3 à 0.5°C ont été sélectionnés pour l'activité antipyrétique. (74)

Les rats sont répartis en 3 lots :

Lot 1 (Témoin: 6 rats) : animaux recevant l'eau saliné seulement (10ml/Kg poids corporel) par gavage.

Lot 2 (paracétamol: 6 rats) : animaux recevant par injection sous cutanée d'une suspension aqueuse de levure de bière à 20% à la dose de 10ml/kg poids corporel puis traités après 18 H par le paracétamol à la dose de 150 mg/kg/10ml dilué dans l'eau saliné par gavage.

Lot 3 (Extrait: 6rats) : animaux recevant par injection sous cutanée une suspension aqueuse de levure de bière à 20% à la dose de 10ml/kg poids corporel puis traités après 18 H par l'extrait méthanolique de *Ruta montana* ou *Onopordium acanthium* à la dose de (500 mg / kg/10ml) mg/kg par gavage.

Les températures rectales sont prélevées 18 H après l'injection de levure de bière, est ensuite 1H, 2H et 3H après l'administration des substances. . (74)

II.3. Etude statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel statistique Minitab et XL. Les expériences *in vitro* ont été faites en triple et d'autres en double, Les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type ($n = 2$ ou 3) pour chaque cas. Les résultats quantitatifs des différentes évaluations réalisées *in vivo* sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type. Ces résultats sont traités statistiquement par le test d'ANOVA.

Le seuil de signification est supérieur à 95% ($p < 0.05$), tel que :

- ($p > 0.05$) désigne un effet non significatif
- ($p \leq 0.05$) désigne un effet significatif
- ($p \leq 0.01$) désigne un effet très significatif
- ($p \leq 0.001$) désigne un effet hautement significatif

Chapitre III
Résultats et discussions