



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abbes Laghrou Khenchela

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique LMD

Filière : Sciences biologiques

Option: Biochimie appliquée

Thème

Contribution à l'exploration phytochimique et l'évaluation *in vitro* des activités biologiques d'une plante médicinale locale «*Artemisia campestris L*»

Par

Sabeg khawla et Tamrabet Khaoula

Soutenu le :07/07/2019

Devant les membres de jury

Présidente: Dr. KHADOUMA Asma MCB Université Abbes Laghrou Khenchela

Promotrice : Dr. DOUAOUYA Lilia MCB Université Abbes Laghrou Khenchela

Examineur : Dr. FELLOUS Samir MCB Université Abbes Laghrou Khenchela

Promotion: 2019

Remerciements

Tout d'abord nous tenons à remercier Allah tout puissant de nous avoir donnés le courage et la volonté de terminer ce travail.

*Un grand merci à Dr. KHADOUMA Asma qui nous avons honorés en acceptant d'être président de ce jury.
Hommages respectueux.*

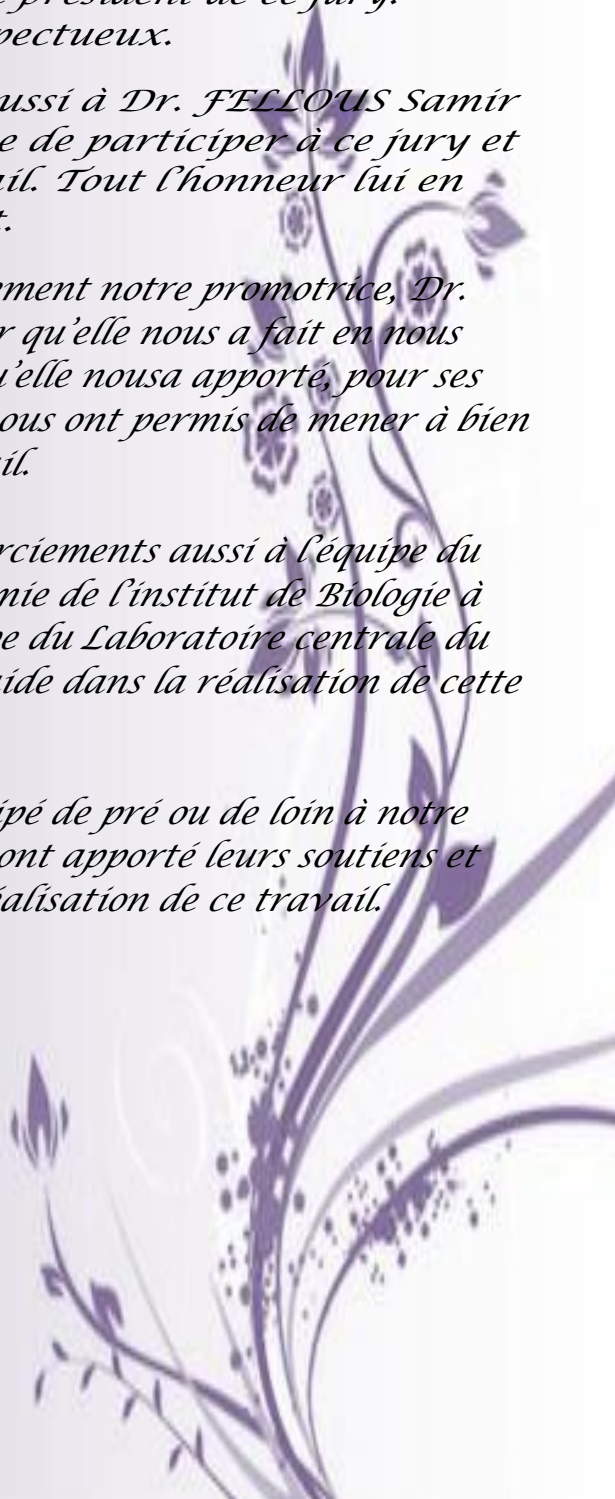
Nos remerciements s'adressent aussi à Dr. FELLOUS Samir de nous avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin ce travail. Tout l'honneur lui en revient.

Nous remercions tous particulièrement notre promotrice, Dr. DOUAOUYA Lilia pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'elle nous a apporté, pour ses remarques et ses conseils avisés, qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nous adressons nos profonds remerciements aussi à l'équipe du laboratoire pédagogique de Biochimie de l'institut de Biologie à l'université de Khenchela et L'équipe du Laboratoire central du Hôpital Ahmed Ben Balla pour leur aide dans la réalisation de cette étude.

Et A toute personne ayant participé de pré ou de loin à notre formation et à tous Ceux qui nous ont apporté leurs soutiens et encouragements durant la réalisation de ce travail.

Khawla S et Khaoula T



Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à :

A mes chers parents.

*Qui m'avez dirigé et suivi pendant toute mes études, leurs
conseils m'ont suivi permis d'atteindre le bout de chemin.*

Soient fiers de moi aujourd'hui.

A mes frères : Také edine et Djalal .

A ma soeur Imen.

A mes enseignants de la spécialité de biochimie

Appliqué

A Ma binôme.

A tous mes camarades de promotion .

A tous mes amis.

T. Khaoula

Dédicace

Je dédie Ce modeste travail :

*A DIEU, pour m'avoir donné la force dans les moments
difficiles et d'éditer ce mémoire.*

*A mes très chers parents : Aziz (اللهم اسكنه فسيح جناتك) et
Hakima qui ont donné sens à mon existence, en
m'offrant une éducation digne de confiance qui m'ont
soutenu nuit et jours durant tout mon parcours.*

A ma grand mère : Rabia

A Mes cousins : Massoud et Tarak

A ma binôme : Khaoula

*A tout les étudiants de la promotion Biochimie
applique 2018/2019*

Khawla S

Résumé

Dans le but de valoriser les plantes médicinales Algérienne, nous sommes intéressés dans cette étude d'une part, à la caractérisation qualitative et quantitative des extraits aqueux et méthanolique brut d'une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle récoltée de la région de Khenchela (*ArtemisiacampestrisL*), et d'autre part, à la détermination des activités biologiques.

Le screening phytochimique réalisé a permis de mettre en évidence la présence des saponines, des tanins, des alcaloïdes des composés réducteurs et les flavonoïdes surtout de type flavones et flavonones. Ainsi, l'étude qualitative par CCM des extraits a révélé une diversité remarquable des composés flavonoïques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalciu et par la méthode du trichlorure d'aluminium respectivement, a dévoilé la richesse de l'extrait méthanolique brut par rapport à l'aqueux en polyphénols et flavonoïdes avec des teneurs égales à $60,72 \pm 3,1 \mu\text{g EAG/mg}$ et $40,22 \pm 4,6 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.

L'activité antioxydante obtenue a été évaluée *in vitro* via le test de piégeage de radical libre DPPH: cependant, l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par l'EMB avec une IC50 égale à $0,15 \text{mg/ml}$ suivi par l'EAq avec IC50 égale à $2,4 \text{mg/ml}$.

L'activité antihémolytique et anticoagulante ont été avérées intéressantes pour les deux extraits notamment l'EMB.

Les activités biologiques obtenues ont été dépendantes et en bonne corrélation avec la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes qui constituent des puissants agents antioxydants.

En conclusion; *Artemisia campestris L* est doué d'une activité antioxydante, antihémolytique et anticoagulante remarquables. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle afin d'atténuer les complications du stress oxydant associé ou déclenchant des maladies cardiovasculaires.

Mots clés : Activité anticoagulante, Activité antihémolytique, Activité antioxydante, *ArtemisiacampestrisL*, Flavonoïdes.

Abstract

In order to promote the Algerian medicinal plants, we are interested in this study on the one hand, the qualitative and quantitative characterization of the aqueous and crude methanolic extracts of a medicinal plant of the traditional pharmacopoeia harvested from the Khenchela region (*Artemisia campestris* L), and on the other hand, to the determination of biological activities.

The phytochemical screening carried out made it possible to highlight the presence of saponins, tannins, alkaloids of reducing compounds and flavonoids, mainly flavones and flavonones. Thus, the qualitative study by TLC extracts revealed a remarkable diversity of flavonoid compounds likely to express the desired activity.

Quantitative analysis of total polyphenols and flavonoids by the Folin-Ciocalteu reagent and the aluminum trichloride method, respectively, revealed the richness of the crude methanolic extract with respect to aqueous polyphenols and flavonoids with contents equal to $60.72 \pm 3.1 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ and $40.22 \pm 4.6 \mu\text{g EQ} / \text{mg}$ of extract.

The antioxidant activity obtained as evaluated *in vitro* via the DPPH free radical scavenging test: however, the oxidation of DPPH is effectively inhibited by the EMB with an IC₅₀ equal to 0.15 mg / ml followed by the EAQ with IC₅₀ equal to 2.4 mg / ml.

The antihemolytic and anticoagulant activity were found to be interesting for the two extracts, in particular the EMB.

The biological activities obtained were dependent and in good correlation with the content of total polyphenols and that with flavonoids which constitute powerful antioxidant agents.

In conclusion; *Artemisia campestris* L is endowed with remarkable antioxidant, anti-hemolytic and anticoagulant activity. As a result, it can be a natural resource to mitigate the complications of oxidative stress associated with or triggering cardiovascular disease.

Key words: Anticoagulant activity, Antihemolytic activity, Antioxidant activity, *Artemisia campestris* L, Flavonoids.

المخلص

بههدف تقييم اهمية النباتات الطبية التقليدية في الجزائر، ركزنا في دراستنا من جهة على الخصائص النوعية والكمية للمستخلص المائي والكحولي الخام للنبذة الطبية والتقليدية المنتقاة من ولاية خنشلة (نبات الشيخ الحقلي) ومن جهة اخرى اكتشاف بعض الوظائف الحيوية .

وقد كشف الفحص الكيميائي النباتي عن ثراء هذه النبذة بمواد الايض الثانوي والتي نذكر منها :

فلافونويد بانوعه, السابونين, التانين, الالكالويدات, المركبات المرجعة, الكومارين.....الخ

في حين كشفت الدراسة النوعية بواسطة الكروماتوغرافيا CCM للمستخلصات وجود مختلف انواع الفلافونويدات القادرة على التعبير عن النشاط المطلوب .

كشفت التحليل الكمي لمحموع البوليفينول والفلافونويدات باستعمال كاشف الفولين-سيكاليو وعن طريق ثلاثي كلوريد الالمنيوم على التوالي, عن ثراء المستخلص الكحولي الخام بالمقارنة مع المحلول المائي بكمية من البوليفينول والفلافونويدات والتي قدرت ب 3.1 ± 60.72 ميكروغرام مايكافى حمض الغاليك/مغ و 3.1 ± 40.22 ميكروغرام مايكافى كرسيتين /مغ من المستخلص على التوالي.

أكد النشاط المضاد للاكسدة بطريقة ارجاع الجذور الحرة باستعمال الجذر DPPH فعالية تثبيط اكسدة DPPH بالنسبة للمستخلص الكحولي الخام اذ قدر التركيز المثبط ل50% ب 0.15 مغ/مل بينما المستخلص المائي ب 2.4 مغ/مل.

النشاطين ضد الانحلال والتخثر الدموي تم تاكيدها بصفة واضحة للمستخلصين وبالاخص المستخلص الكحولي الخام النشاطات الحيوية المتحصلة لها علاقة وطيدة بمحتوى البولي فينول الاجمالي وكذا مركبات الفلافونويد .

وفي الاخير نستنتج ان نبذة الشيخ الحقلي لديها نشاط مضاد للاكسدة والانحلال وكذا التخثر الدموي وهذا ما يؤهلها لتكونم صدرا طبيعى للتخفيف من حدة المشاكل التي يسببها النشاط التاكسدي المرتبطة بامراض القلب والاعوية الدموية.

الكلمات المفتاحية : النشاط المضاد التحلل الدموي ,النشاط المضاد للتخثر الدموي, النشاط المضاد للاكسدة الفلافونويد, نبات الشيخ الحقلي.

Liste des abréviations

- + A. *campestris* : *Artemisia campestris*
- + Abs : absorbance
- + Ac As : acide ascorbique
- + ABTS : 2,2 azinobis-3-éthyl benzthiazoline-6-sulphonique
- + ADN: Acide Désoxyribonucléique.
- + AHDP : acide hexahydroxydiphénique
- + AlCl₃: Le chlorure d'aluminium
- + BHA : butylhydroxyanisole
- + BHT : butylhydroxytoluène
- + OH : groupement hydroxyle
- + CM : Chloroforme / Méthanol
- + CO: monoxyde de carbone
- + DPPH: Diphenylpicryl-hydrazyl.
- + EMB : extrait méthanolique brut
- + EOA : Espèces Oxygénées Activées
- + ERO: Espèces réactives d'oxygène.
- + FeCl₃: Trichlorure de fer
- + GABA : Acide α aminobutyrique
- + GPX : Glutathion peroxydase
- + GS° : Radical thiyle
- + GSH: Glutathion.
- + GSHPX : Glutathion peroxydase et réductase
- + GSSG : Glutathion Disulfure
- + H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
- + H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
- + HCl: Acide chlorique
- + HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- + I%: Inhibition des radicaux libres en pourcentages.
- + I₂: Diiode.
- + IC 50: Concentration inhibitrice à 50 %
- + KI : Iodure de potassium
- + LDL : Lipoprotéines de faible densité

- + LDL : Low-density lipoprotein
- + MeOH : Méthanol
- + µgEAG/mg : Microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait
- + µgEQ/mg : Microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait
- + Na₂CO₃ : Carbonate de sodium
- + Na₂HPO₄: Hydrogénophosphate de sodium.
- + NADPH oxydase : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase.
- + NaHPO₄: Dihydrogénophosphate de sodium.
- + NaPO₄: Phosphate trisodique
- + ND : Non déterminé

- ✚ **NH₄OH**: Ammoniaque.
- ✚ **NO** :Monoxyde d'azote
- ✚ **NO**:Oxydenitrique
- ✚ **NO°** : Oxydenitrique
- ✚ **NO₂**: Nitriquedioxyde
- ✚ **O₂⁻** :Radical superoxyde
- ✚ **O₂** :Oxygènesingulet
- ✚ **O₂°** : Le radical anion superoxyde
- ✚ **OH** :Radical hydroxyle
- ✚ **ONOO⁻** : Peroxynitrite
- ✚ **P₄₅₀** : Cytochrome P₄₅₀
- ✚ **PBS** : Phosphate buffered saline
- ✚ **PG** :Gallatepropylée
- ✚ **PH** : Potentiel d'hydrogène
- ✚ **Pp** : Poids de la poudre en gramme (g)
- ✚ **Ps** : Poids de l'extrait sec en gramme (g)
- ✚ **Rf**: Rapport frontal.
- ✚ **RMN** : Résonancemagnétique nucléaire
- ✚ **RNS** : Radicaux libres azotés
- ✚ **RO°** : Alcoyles
- ✚ **ROO°** :Peroxyle
- ✚ **ROOH** :Hydroperoxydes
- ✚ **ROS** :Radicaux libres oxygénés
- ✚ **SD**: Standard Déviation
- ✚ **SH**: Groupement thiol
- ✚ **SOD** : Superoxyde dismutase
- ✚ **TBHQ** : tétrabutylhydroquinone
- ✚ **TLC** : Thin-layer chromatography
- ✚ **TRx** : Thiorédoxines
- ✚ **TRxR**: Thiorédoxine réductase-
- ✚ **UV**: Rayonnement ultraviolet

LISTE DES FIGURES

N° de figure	TITRE	N° de page
N°01	Structure de base des acides benzoïque et cinnamique	06
N°02	Structure de base des flavonoïdes	07
N°03	Représente la structure des deux groupes du tannins.	09
N°04	Structure générale des coumarines.	10
N°05	Représente la structure des alcaloïdes.	11
N°06	Représente la structure des saponosides.	11
N°07	Photo présentatrice de la plante <i>Artemisia campestris</i> de la région M'toussa-Khenchela	15
N°08	Répartition géographique d' <i>Artemisia campestris</i> dans le monde	16
N°09	Voies de la coagulation	31
N°10	La carte géographique Khenchela montrant le lieu de récolte.	35
N°11	Photo du Rotavapeur utilisé pour sécher l'extrait méthanolique brut.	37
N°12	Réduction du DPPH [•] par un antioxydant	42
N°13	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).	52
N°14	Histogramme représente la teneur des extraits en polyphénols	53
N°15	Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).	54
N°16	Histogramme représente la teneur des extraits en flavonoïdes	54
N°17	Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits EMB et EAq par chromatographie sur gel silice (révélation à UV (365 nm))	56

N°18	Courbes présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits fonction de leur concentration en comparaison avec le controle positif	57
N°19	Histogramme représente les concentrations inhibitrices à 50% le radical DPPH des extraits.	58
N°20	Evolution de l'effet antihémolytique des extraits de l' <i>Artemisia campestris L</i> en	59
N°21	Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.	61
N°22	Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endoogène	62

LISTE DES TABLEAUX

N° de Tableau	TITRE	N° de page
N°01	Représente la structure de base des principaux flavonoïdes.	08
N°2	Teneur en polyphénols, de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i>	17
N°3	Etude ethno pharmacologique d' <i>Artemisia campestris</i> (selon la médecine traditionnelle).	18
N°04	Facteurs de coagulation	32
N°05	Rendement et caractéristiques des extraits issus d' <i>Artemisia campestris</i>	47
N°06	Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait méthanolique brut (EMB) d' <i>Artemisia campestris L</i>	48
N°07	Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait aqueux (EAg) d' <i>Artemisia campestris L</i>	50
N°08	CCM de l' EMB	56
N°09	CCM de l' EAg	56

Table des matières

Remerciements	
Dédécace	
Résumés	I
Liste d'abréviation	IV
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	IX
INTRODUCTION	1

PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La phytothérapie

I. La phytothérapie	3
I.1. Définition	3
I.2. La phytothérapie en Algérie	3
II. Les plantes médicinales	3
II.1. L'histoire des plantes médicinales en Algérie	3
II.2. Définition des plantes médicinales	4
II.3. Les principes actifs des plantes médicinales	4
III. Les substances naturelles des plantes et leurs activités biologiques	5
III.1. Les métabolites primaires	5
III.2. Les métabolites secondaires	5
III.2.1.1 Classification de polyphénole	5
III.2.1. Les Polyphénols	5
III.2.2. Les alcaloïdes	10
III.2.3. Les terpènes	11
IV. Importance des plantes médicinales	12
V. La toxicité des plantes médicinales	12

V.1. la toxicité intrinsèque des constituants	12
V.2. L'identification imprécise des composants	13
V.3. Les altérations	13
V.4. Les contaminations	13

Chapitre II : La plante médicinale sélectionnée : *Artemisia campestris L*

I. <i>Artemisia campestris L</i>	14
I.1. Généralités	14
I.1.1. La famille des Astéracées	14
I.1.2. Le genre <i>Artemisia</i>	14
I.2. Taxonomie	14
I.3. Description botanique	14
I.4. Nom vernaculaire	15
I.5. Distribution géographique	16
I.6. Composition chimique	16
I.7. L'utilisation traditionnelle	17
II. Activités biologiques	19
II.1. Effet insecticide	19
II.2. Activité antioxydante	19
II.3. Propriétés allélopathique	19
II.4. Propriétés antifongiques	20
II.5. Effet hypoglycémiant	20
II.6. Activité antibactérienne et antivirale	20
II.7. Effet antipoison	20
III. Toxicité de la plante	21

Chapitre III : Les activités biologiques

I.Activité antioxydante	22
I.1.Le stress oxydatif	22
I.2. Origines de stress oxydatif	22
I.3.Les radicaux libres	22
I.4.La production des radicaux libres	22
I.5.Les espèces réactives de l’oxygène	23
I.6.Mécanismes d’oxydation des radicaux libres	24
I.7.Les antioxydants	24
I.8.Les conséquences du stress oxydatif	26
II. Activité anti hémolytique	26
II.1.L’hémolyse	26
II.1.1.Type des hémolyses	26
II.1.2.Les signes biologiques de l’hémolyse	28
II.1.3.Les signes cliniques	29
II.1.4.Traitement de l’hémolyse pathologique	29
III. L’activité anti coagulante	30
III.1. Hémostase	30
III.1.1.L’hémostase primaire	30
III.1.2.Définition de la coagulation	30
III.1.3.Fibrinolyse	34

PARTEI 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I: Matériel et méthodes

I. Matériel	35
I.1. Matériel biologique	

I.1.1. Matériel végétal	
I.1.2. Echantillons du sang	35
I.2. Médicaments	36
I.3. Réactifs chimiques et instrumentations	36
II. Méthodes	36
II.1. Préparation de l'extrait méthanolique brut	36
II.2. Préparation de l'extrait aqueux	37
II.3. Détermination du rendement d'extraction	37
II.4. Screening phytochimique	37
II.5. Etude quantitative	39
II.5.1. Dosage des polyphénols totaux	39
II.5.2. Dosage des flavonoïdes	40
II.6. Etude qualitative	40
II.6.1. Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince(CCM)	40
II.7. Étude <i>in vitro</i> des activités biologiques	41
II.7.1 Evaluation de l'activité antioxydante: Test scavenger du radical libre DPP	41
II.7.2. Evaluation de l'activité antihémolytique	43
II.7.3. Evaluation de l'activité anticoagulante	45

Chapitre II : résultats et discussion

I. Résultats et discussion	47
1. Rendement de l'extraction	47
2. Test phytochimiques	48
3. Analyse quantitative	52
3.1. Dosage des polyphénols totaux	52
3.2. Dosage des flavonoïdes	53
4. Etude qualitative de la chromatographie sur couche mince	55

5. Étude in vitro des activités biologiques d'Artemisia campestris L	57
5.1. Evaluation de l'activité antioxydante : Test scavenger du radical libre DPPH	57
5.2. Evaluation de l'activité antihémolytique	59
5.3. Evaluation de l'activité anticoagulante	60
5.3.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène	60
5.3.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène	61
Conclusion et perspective	63
Références	
Annexe	

Introduction

Introduction

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Presque toutes les civilisations et les cultures de l'antiquité ont dépendu entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité et la faible toxicité qui est liée à la dose de certaines substances (**Koudaly, et al., 2014**). Ces substances actives, dites métabolites secondaires, ne sont pas produites directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Elles sont classées en trois groupes essentiels: Les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (tanins, coumarines, lignine et flavonoïdes). Par exemple les polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence des groupements phénoliques. Ces composants présentent différentes activités biologiques et pharmaceutiques importantes telles que l'activité anti-inflammatoire, anticancéreuse et anti-oxydante dues à la présence de groupements hydroxyle qui ont la capacité d'éliminer les radicaux libres. Mais, le développement du domaine chimique a orienté les chercheurs vers la synthèse de principes actifs d'une manière abondante et hâtive. Néanmoins, le traitement avec ces molécules chimiques, a laissé apparaître des effets secondaires au niveau de l'organisme (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**).

Les dommages oxydatifs provoqués par le stress oxydant sont impliqués dans l'étiologie du cancer, des maladies cardiovasculaires et d'autres maladies dégénératives. Au cours de ces dernières années, un nombre croissant de rapports confirment que beaucoup de fruits et légumes peuvent offrir une protection contre certaines maladies chroniques causées par le stress oxydatif (**Sun, et al., 2009**). Les complications pathologiques des maladies thrombotiques artérielles ou veineuses et hémolytiques sont les raisons pour lesquelles les chercheurs sont focalisés sur la recherche des anticoagulants naturels pour traiter ces pathologies (**Labioud, 2016**).

Il existe environ 300 000 espèces de plantes à fleurs sur terre, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques, ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré (**Aron et Kennedy, 2008**).

La flore algérienne compte près de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (**Matés, et al., 1999**).

Dans ce travail, on a visé à démontrer la richesse de notre plante *Artemisia campestris L* en flavonoïdes et en polyphénols, et déterminer *in vitro* l'activité antioxydante, anti coagulante et anti-hémolytique des extraits aqueux et organiques.

C'est dans ce contexte, que s'inscrit la présente étude dont ce manuscrit s'articule autour de deux parties: Outre l'introduction et la conclusion générale, la première partie est une synthèse bibliographique dans la quelle ont abordés trois chapitres: la phytothérapie et les plantes médicinales, *Artemisia campestris L* et les activités biologiques étudiées.

La deuxième partie est expérimentale divisée en deux chapitres; le premier présente le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour les extractions, leur identification par CCM, étude de leurs teneurs en flavonoïdes et polyphénols et l'évaluation *in vitro* du pouvoir anti-oxydant, anti-coagulant et anti-hémolytique des extraits aqueux et organique, le deuxième chapitre expose les résultats obtenus suivis de la discussion.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

La phytothérapie

I. La phytothérapie

I.1. Définition

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ». la phytothérapie désigne la médecine basée sur les extraits des plantes et les principes actifs naturels (Fetayah, 2015).

Phytothérapie : Emploi de plantes ou des substances végétales pour traiter des maladies. (Lori. et al., 2005). Elle fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces. (Strang, 2006).

La phytothérapie est une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de partie de plantes ou de préparation à base de plantes. Ce n'est ni une thérapeutique « spéciale », ni une médecine « alternative », car elle fait partie intégrante de la thérapeutique (Wichtl. et al., 2003). La phytothérapie traditionnelle, était et reste actuellement sollicitée par la population ayant confiance aux usages populaires et n'ayant pas les moyens de supporter les conséquences de la médecine moderne. Ceci sans omettre l'important retour actuel vers la médecine douce (Salhi. et al., 2010).

I.2. La phytothérapie en Algérie

En Algérie les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle, qui, elle-même est largement employée dans divers domaines de la santé.

Dans les dernières années, la phytothérapie est très répandue, des herboristes sont partout et sans aucune formation spécialisée ou connaissance scientifique sur la phytothérapie, ils prescrivent des plantes et des mélanges pour toutes les maladies : diabète, rhumatisme, minceur et même les maladies incurables.

Des chiffres recueillis auprès du Centre national du registre de commerce, montrent qu'à la fin 2009, l'Algérie comptait 1926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales, dont 1393 sédentaires et 533 ambulants (Belguitar, 2015).

II. Les plantes médicinales

II.1. L'histoire des plantes médicinales en Algérie

Chaque culture a une histoire d'utilisation des plantes médicinales pour guérir les maladies. En Algérie l'usage de plantes médicinales est une tradition de mille ans. Les premiers écrits sur les plantes médicinales ont été faits au IX^{ème} siècle par **Ishâ-Ben-**

Amran et **Abdallah-Ben-Lounès** né à Oran, et qui décrit l'usage de beaucoup de plantes médicinales, mais la plus grande production de livres a été réalisée au dix-septième et au dix-huitième siècle.

Même pendant le colonialisme Français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie a été publié en 1942 par **Fourment et Roques** où ils ont mentionné décrit et étudié 200 espèces. La plupart d'entre elles étaient du Nord de l'Algérie et seulement 6 espèces ont été localisées au Sahara. Le travail le plus récent publié sur les plantes médicinales algériennes est reporté dans les ouvrages de **Bloued(1998)** et **Baba Aissa(1999)**.

Avec une superficie de 2 381 741 km², l'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays.

Parmi les plantes médicinales qui ont acquis une très grande importance. Les plantes de la famille des Astéracées, cette espèce connue sous le nom de « Tgouft ». l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille; c'est le genre *Artemisia* qui contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces. (**Mucciarelli and Maffei., 2002**).

II.2. Définition des plantes médicinales

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schauenberg.et al. ,2006**).

Les plantes médicinales sont les plantes utilisées en phytothérapie pour leurs principes actifs. (**Ramli, 2013**).

Il existe une définition officielle des plantes médicinales, c'est ceux qui ont une inscription à la pharmacopée. Selon le code de la santé publique la pharmacopée les considère comme médicaments, leur vente est le monopole des pharmaciens et des herboristes. Donc on appelle une plante médicinale toute plante ayant des propriétés thérapeutiques. Actuellement et grâce aux progrès scientifiques la thérapeutique a beaucoup évolué et a utilisé la plante comme matière première pour la production des médicaments (**Chevallier, 2001**).

II.3. Les principes actifs des plantes médicinales

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants naturellement présents dans cette plante ; ils lui confèrent son activité thérapeutique (**Zeghad.N, 2008**). Ces composants se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais de manière inégale. Tous les

principes actifs d'une même plante n'ont pas les mêmes propriétés biologiques. (Benghanou.M,2009).

III. Les substances naturelles des plantes et leurs activités biologiques

Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires :

III.1. Les métabolites primaires

Les premiers produits de la photosynthèse sont des substances à basse molécularité appelés métabolites primaires : les saccharides (sucres), puis les acides aminés, les acides gras, des alcools, des vitamines (B2 et B12), des polyols, des acides organiques, ainsi que des nucléotides (inosine-5'-monophosphate et guanosine-5'-monophosphate) (Yezza. S, 2013; Bouchama. S,2013). Elles sont indispensables pour leur accroissement (Krief.S,2003).

III.2. Les métabolites secondaires

Ces métabolites secondaires végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes. (Tirichine,2010). Les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures (Khiri et Lalaoui, 2007). Les métabolites secondaires sont responsables des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie des plantes (Nkhili.E,2009) telles que la communication intercellulaire, la défense et la régulation des cycles catalytiques (Guillaume.M, 2008). On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (Nkhili.E,2009). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief.S, 2003).

III.2.1. Les Polyphénols

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulière (Nkhili,2009). Les polyphénols sont des molécules composées d'au moins un groupe benzénique (six atomes de carbone liés en un hexagone, et chaque atome de carbone lié en outre à un atome d'hydrogène), dont certains hydrogènes peuvent être remplacés par des groupes hydroxyles OH (Cheynier et Sarni-Manchado, 2006).

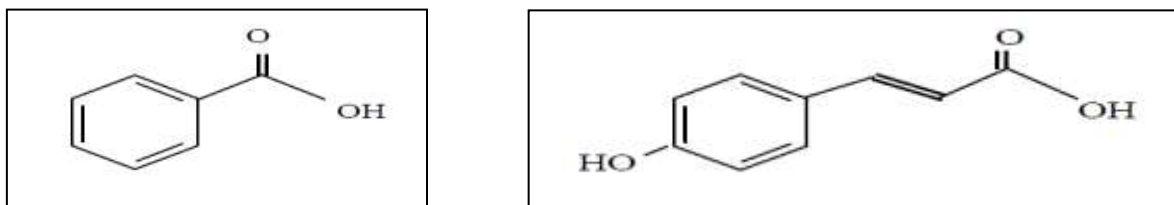
Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principale à la vie de plante, à la défense contre les pathogènes; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes et la protection contre les rayonnements UV; sachant que tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements solaires(Sarni-manchado et Sheynier, 2006).

III.2.1.1. Classification des polyphénols

a. Les acides phénoliques

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires (Zichtl et Anton, 2009).

La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques, certains auteurs sont cependant plus restrictif : ils n'utilisent le terme d'acide phénolique pour dérivés en C6-C incluant les dérivés cinnamique dans le groupe plus large, des phényl-propanoïde(Bruneton 2009).



Acide benzoïque Acide cinnamique

Figure1 : Structure de base des acides benzoïques et cinnamiques(Bruneton, 2009).

b. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances antibactériennes efficaces contre une large gamme de bactéries (Ghedira, 2005). Cette activité antibactérienne des flavonoïdes peut être due à leur capacité à inhiber la synthèse des acides nucléiques, la fonction de la membrane cytoplasmique ou le métabolisme énergétique (Cushnie et Lamb, 2005).

On les trouve d'une manière générale dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux (Milane, 2004).

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Même si le terme flavonoïde signifie jaune en latin, les couleurs des flavonoïdes varient et dans certains cas quand la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la coloration n'est perçue que par les insectes (Bruneton, J. 1999).

Ce sont des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C). Ce sont des dérivés du noyau flavane (noyau de base) portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3.

La chaîne en C3 formant un hétérocycle après condensation avec un OH phénolique du noyau A. La structure chimique des flavonoïdes reportée dans la figure 14 contient un squelette C15 constitué par un noyau chromane et un noyau aromatique placé en position 2, 3 ou 4.

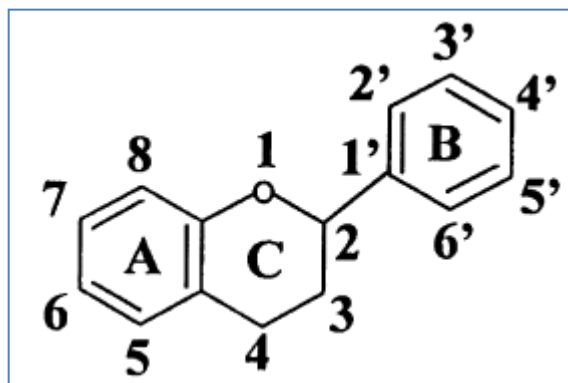
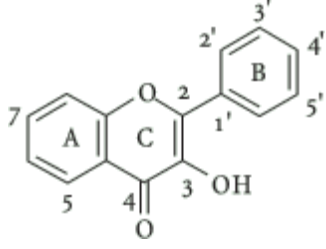
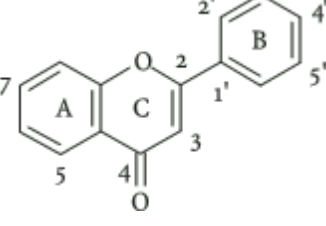
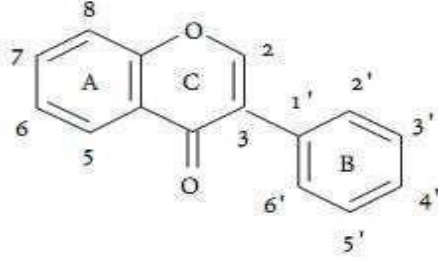
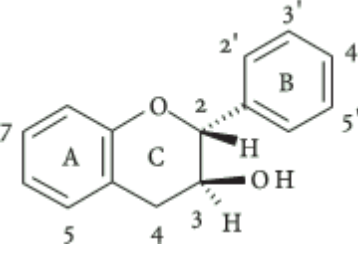
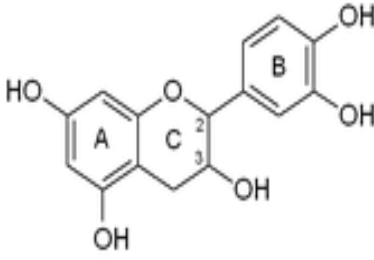
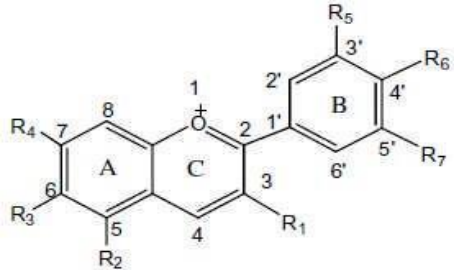


Figure 2: Structure de base des flavonoïdes (Marfak, 2003).

On distingue un grand nombre de flavonoïdes, selon le degré d'oxydation de la chaîne à trois carbones ainsi qu'à leur degré d'insaturation. La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permet de distinguer les différentes classes des flavonoïdes. Différents groupes ont été identifiés dont six sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanols, les flavonols et les anthocyanidines qui sont représentés dans le tableau 01 (Heim. *et al.*, 2002; Chira. *et al.*, 2008).

Tableau 1: Structure de base des principaux flavonoïdes.

Sous classe	Structure
Flavonoles	
Flavones	
Isoflavones	
Flavanones	
Flavan-3-ol	
Anthocyanes	

c. Les tannins

Ce sont des composés phénoliques complexes largement distribués chez les plantes supérieures, obtenus à partir de la condensation des phénols simples et se caractérisent par des propriétés astringentes prononcées (Macheix. *et al.*, 2005; D'Archivio. *et al.*, 2007).

A la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tanins en 2 groupes:

➤ Tannins hydrolysables

Polymères à base de glucose dont un radical hydroxyle forme une liaison d'ester avec l'acide gallique (HOPKINS, 2003). Ils sont facilement hydrolysables par les acides ou les enzymes (tannases) en ose et en acide phénolique, selon la nature de celui-ci, on distingue les gallotannins (fig3) et les ellagitannins(Bennick, 2002; Oszmianski. *et al.*, 2007).

➤ Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols

Ce sont des polymères ou oligomères flavoniques avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités. L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons C-C, ou par ramification grâce à des liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes. (Macheix *et al.*, 2005).

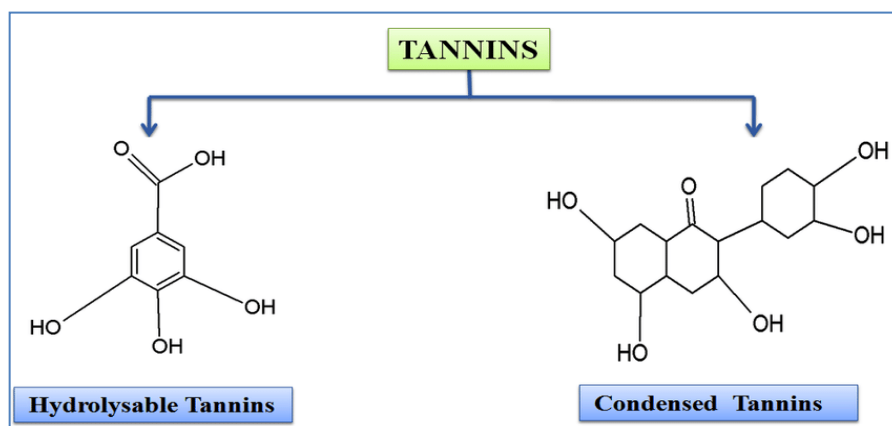


Figure3: Structure des deux groupes des tannins.

d. Les Lignines

Composés qui s'accumulent au niveau des parois cellulaires (tissus sclérenchymes ou le noyau des fruits), au niveau de sève brute qu'ils permettent la rigidité des fibres, ils sont le résultat d'association de trois unités phénoliques de base dénommées monolignols de caractère hydrophobe.(Sarni-Manchadoet Cheynier, 2006).

e. Les coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique. (Macheix.*et al.*, 2005). Les coumarines sont substituées par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles, la majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. Selon la nature des substituant sur leurs structures. (Ford. *et al.*, 2001).

Elle constituer trois types : les furanocoumarines, les pyranocoumarines et les

hydroxycoumarines. Ils présentent une large gamme d'activité spasmolytique, antifongique,

anti thrombotique, et vasodilatatrices, anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire

anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique

(Brooker.*et al.*, 2008).

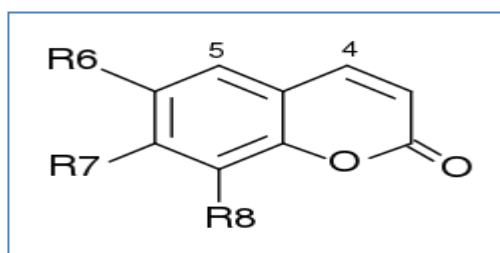


Figure4: Structure générale des coumarines.

f. Stilbène

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Crozier. *etal.*, 2006).

III.2.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes tout d'abord, ont des effets bénéfiques sur la plante synthétisante, parmi ces effet, selon Da Conceicao(2010): ils régulent la croissance et le métabolisme interne végétaux, ils désintoxiquent et transforment les substances nocives au végétal, ils protègent la plante contre les rayons ultraviolets comme ils ont des effets contre les herbivores (Mauro,2006).

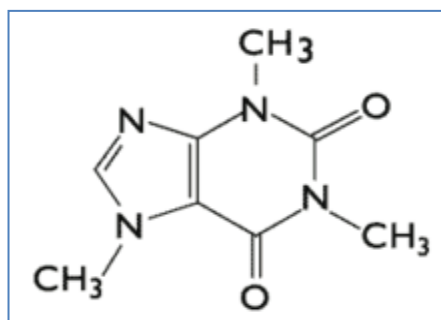


Figure 5: Structure des alcaloïdes.

III.2.3. Les terpènes

Ce sont des métabolites secondaires qui ont un rôle vital dans la maintenance de l'intégrité structurale de la plupart des structures membranaires des organismes, ils assistent aussi dans la régulation de la perméabilité de ces membranes aux différents ions, et les eucaryotes les synthétisent pour leur diététique (Benaïssa, 2011; Yezza et Bouchama, 2013).

a. Structure des terpènes

Constituent un vaste groupe de métabolites secondaires qui sont des molécules à 30 carbones composés de 6 unités (C5) isoprènes, sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte et dont l'un des produits de dégradation sont les stéroïdes qui peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins trois méthyles leur formule brute est $(C_5H_X)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc) (Benaïssa, 2011; Yezza et Bouchama, 2013).

1) Les saponosides

Le terme saponosides est dérivé de mot savon, sont des terpènes glycosylés comme ils peuvent aussi se trouver sous forme aglycones, ils ont un goût amer et acre (Hopkins, 2003). Ils existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpénoïdes. (Iserin. et al., 2001).

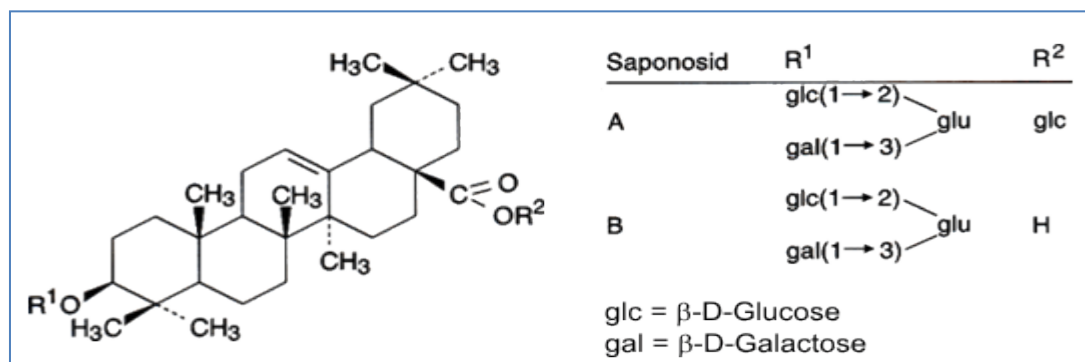


Figure 6: Structure des saponosides.

2) Les huiles essentielles

Ce sont des molécules à noyau aromatique, sont des mélanges complexes oxygénés et hydrocarbures de formule générale $(C_5H_8)_n$. Ils possèdent caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique et on les trouve dans les organes sécréteurs (**Iserin. et al., 2001**). Jouent un rôle de protection des plantes contre un excès de lumière et attirer les insectes pollinisateurs (**Dunstan. et al., 2013**).

Ils sont utilisées pour soigner des maladies inflammatoires telles que les allergies, eczéma, favorise l'expulsion des gaz intestinales comme les fleurs frais ou séchées de plante "camomille" (**Iserin. et al., 2001**).

IV. Importance des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constitutions des plantes sont utilisés directement comme agent thérapeutique, mais aussi comme matière première pour la synthèse de médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaco logiquement actifs (**Ameenah, 2006**).

Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs ou certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments, déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plante (**Chaabi, 2008**).

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaires et leurs substances elles utilisent la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées comme médicaments, une croyance bien réponde est que toute plante soigne (**Salhi. et al., 2010**).

V. La toxicité des plantes médicinales

La toxicité des plantes médicinales peut être expliquée par :

V.1. la toxicité intrinsèque des constituants

Les plantes médicinales sont des mélanges complexes de molécules diverses. Leur composition, souvent mal définie, est formée de molécules pourvues d'une activité biologique notoire, entre autres des hétérosides, des alcaloïdes, des anthocyanes, des tannins et des stéroïdes. Comme toutes les molécules bioactives, ces constituants peuvent, à un certain degré de concentration, présenter une toxicité intrinsèque. Telle la composition des produits

végétaux, qui varie de multiples façons, la teneur de ces constituants peut « naturellement » varier d'une préparation à une autre.

V.2. L'identification imprécise des composants

Une préparation à base de plantes peut devenir toxique lorsqu'un de ses constituants, qui est susceptible d'avoir des effets toxiques graves, n'est pas identifié ou est mal identifié : En 1991 et 1992, la substitution de *Stephaniatetrandra* par *Aristolochafangchi* dans une préparation amaigrissante a été la cause des néphropathies graves chez des consommatrices.

V.3. Les altérations

La toxicité peut être aussi liée à la présence de composants qui altèrent chimiquement les préparations à base de plantes, qu'il s'agisse de végétaux ou de substances chimiques médicamenteuses.

V.4. Les contaminations

Les produits à base des plantes médicinales peuvent contenir des contaminants toxiques, tels les pesticides et les métaux lourds, ainsi que des pollens, des champignons microscopiques et des moisissures susceptibles de causer des réactions allergiques et/ou toxiques (**Mohamed. Z, 2008**).

Chapitre 2

La plante médicinale sélectionnée

I. La plante médicinale sélectionnée: *Artemisia campestris* L.

I.1. Généralités

I.1.1. La famille des Astéracées

Cette famille (anciennement appelées Composées) est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend plus de 1500 genres et plus de 25000 espèces. On les rencontre dans le monde entier (Sell et Murrell, 2005).

Les *Astéracées* ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est à dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourée d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre (Simpson, 2010).

I.1.2. Le genre *Artemisia*

Il appartient à la famille des Astéracées : c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille ; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces (Mucciarelli et Maffei, 2002). Diverses réparties principalement dans les zones tempérées d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Nord. Ces espèces sont pérennes, herbes bisannuelles et annuelles ou petits arbustes (Watson. et al., 2002 ; Mehrdad. et al., 2007)

Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquinic, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (Kundan et Anupam., 2010).

I.2. Taxonomie

Selon Caratini (1971), la plante *Artemisia campestris* est classée dans :

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Spermatophyta*

Sous embranchement : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Sous famille : *Asteroideae*

Tribu : *Anthemideae*

Sous Tribu : *Artemisiinae*

Genre : *Artemisia*

Espèce : *Artemisia campestris L.*

I .3.Description botanique

A.campastris L est un sous-arbrisseau vivace, que mon atteindre 30-150cm de hauteur, avec des tiges ramifiées et ascendantes qui d'une forme panicule, il est généralement brunâtre -rouge et glabre, et acquiert une forme lignifiée dans la partie inférieure et un en haut, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (David. Hervé., 1994; Ozenda, 1983).



Figure 7 : Photographie présentatrice de la plante *Artemisia campestris L* récoltée de la région M'Toussa-Khenchela (originale)

I .4.Nom vernaculaire

Taguq, tguft, degoufet, tadjuq, tedjok, alala, hellala, tamemmayt, umnefsa (**Benchelah et al.,2004; Boudjelal.et al., 2013**). Armoise champêtre, Aurone des champs, Armoise rouge (**Lombard et Bajon, 2000**).

I .5. Distribution géographique

L'espèce *Artemisia* est distribuée dans l'hémisphère nord, en particulier sur la côte méditerranéenne de l'Europe, sud-ouest de l'Asie et de l'Afrique (**Ferchichi. L et al .,2006**), certaines en Afrique du Sud et dans l'Ouest de l'Amérique du Sud (Many. 2008). Dans le nord-ouest de l'Italie, cette espèce utilisée dans des boissons alcoolisées en parfumerie et dans une gamme d'applications alimentaires.(**Mucciarelli. M et al .,1995**).



Figure 8 : Répartition géographique d'*Artemisia campestris* dans le monde.(4)

I .6.Composition chimique

De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (**Joao. et al.,1998; Juteau. et al., 2002**).Ces métabolites secondaires sont consignés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Teneur en polyphénols, de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* L(Djeridane et al.,2007).

Métabolites secondaires	Molécule identifiée	Référence
Polyphénols	Flavonoïdes (flavones, ,flavanone) Polyphénols Tanins	Ghlissi et al 2016
Huiles essentielles	Monoterpènes, sesquiterpènes	Belhattab et al 2011
Coumarines	Hydroxycoumarines, esculetin	Masotti. V et al. 2012
des alcaloïdes, des saponines		(Naili et al .,2010).

Plante	Phénols totaux	Flavonoïdes	Dérivés hydrox cinnamiques	Dérivés hydrox benzoïques
<i>Artemisiacampestris</i>	103.4	5	95	0

I .7.L'utilisation traditionnelle

Artemisa campestris L est largement utilisée en médecine traditionnelle grâce à ses propriétés bactéricides, antifongiques, anti-inflammatoires, antihelminthiques, anti venins et analgésiques (carvalho et al, 2011 ; Ghlissi et al, 2016).

En usage local *Artemisia campestris* est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles (Dob et al.,2005). Elle est également utilisée dans le traitement de diabète (Sefi et al.,2010).

La partie aérienne est utilisée dans le traitement de brûlures, de la diarrhée, les morsures de

Serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme, elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux (Ben Sassi et al., 2007).

Selon Saoudi et al (2010) la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des tiges et feuilles d'*A. campestris* permet de réduire les symptômes digestifs.

Les fleurs d'*Artemisia campestris* ont été utilisées comme agent hypoglycémique, dépurative, antilithiasique, ainsi que pour le traitement de l'obésité et pour diminuer le taux de cholestérol. (Le Floc'h, 1983).

Tableau 3 : Etude ethno pharmacologique d'*Artemisia campestris*(selon la médecine traditionnelle).

Nom scientifique	Indication	Partie utilisée	Mode d'utilisation
<i>Artemisia campestris</i> (Ouldelhaj. M, 2003)	Emménagogue, vermifuge, vulnérable, Règles douloureuses, Cicatrisante, Maud'estomac, Bronchites.	Les feuilles et les sommités	Infusion, décoction, macération, cataplasme
Espèces <i>Artemisia</i> (M. Mucciarelli et al; 19950)	Toniques Stomacales Antiphlogistiques Antiseptiques teintures appliquées pour soulager les rhumatismes Antivenin,	Les feuilles et les sommités	/
<i>Artemisia campestris</i> L. (Akrou, Aetal., 2001)	Anti-inflammatoire, Antirhumatismal et Antimicrobien	Les feuilles	Décoction

II .Activités biologiques

En plus de leurs utilisations traditionnelles, *Artemisia campestris* possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on cite les plus importantes.

II.1.Effet insecticide

L'*Artemisia campestris* (l'extrait méthanolique de la partie aérienne) a été testé pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique *Culex quinque fasciatus*. Cet extrait a montré un degré de répulsion très intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria. (Pavela, 2009).

II.2.Activité antioxydante

L'activité antioxydante significative est présentée par la partie aérienne d'*Artemisia campestris*. Les composés qui sont responsables de cette activité antioxydantes sont : les flavonoïdes, les polyphénols et les tannins. Ils exercent ses actions antioxydantes en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, comme ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (Bruneton, 1999).

L'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*Artemisa campestris* a été testée par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-1-1-picrylhydrazyl), les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux possède une activité antioxydante élevée (Aniya et al, 2000)

Huile essentielle, extrait aqueux et l'extrait éthanolique 50% sont des 03 extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*. Akrouf et al (2011) ont étudié l'activité antioxydante de ses trois extraits en utilisant trois méthodes différentes : la méthode de DPPH, la technique de décoloration du β -carotène et la méthode d'ABTS (2,2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ils ont trouvé que l'huile d'*Artemisia campestris* possède une faible activité antioxydante, alors que les extraits aqueux et organique montrent une activité antioxydante importante en comparaison à celle de l'huile essentielle.

II.3. Propriétés allélopathique

Les plantes du genre *Artemisia* possèdent des propriétés allélopathiques par inhibition de la croissance et la germination de certaines plantes de l'entourage. Ces propriétés sont dues probablement à la présence d'acide phénolique et d'autres composants polaires (Kyeong et al., 2007).

II.4. Propriétés antifongiques

Artemisia campestris possède des propriétés antifongiques. **Kyeong et al.,**

(2007) ont étudié l'effet antifongique de l'extrait aqueux des racines d'*Artemisia campestris* sur des champignons de mycorhize. Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux possède un potentiel antifongique.

Les plantes du genre *Artemisia* contiennent un sesquiterpène lactone appelé Artemisinine. Ce composé constitue le métabolite secondaire le plus important chez toutes les espèces *Artemisia*. Il est considéré comme une drogue antimalariale très efficace contre le parasite qui cause la malaria : le *Plasmodium falciparum* (**Donrop et Day, 2007**).

II.5. Effet hypoglycémiant

Les feuilles d'*Artemisia campestris* (l'extrait aqueux), diminuent le taux de glucose dans le plasma des rats chez lesquels le diabète est induit par l'alloxane monohydrate. Ils ont trouvé également que la diminution de la concentration de GLU s'accompagne, d'une part, d'une diminution des taux de triglycérides et des Lipoprotéins de faible densité (LDL) et, d'autre part, d'une augmentation du niveau de l'insuline, ce qui peut prévenir les complications du diabète. (**Sefi et al., 2010**)

II.6. Activité antibactérienne et antivirale

Artemisia campestris est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaires. **Naili et al., (2010)**, ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris*. Ils ont trouvé que l'activité de cet extrait a été plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que les bactéries Gram négative (*Escherichia coli*). **Ben Sassi et al., (2007)** ont étudié l'activité antibactérienne de quatre extraits organiques (méthanol, acétate éthylique, acétone, chloroforme) de 23 plantes médicinales, dont

Artemisia campestris, contre 14 bactéries Gram positif et Gram négatif. Les résultats ont montré que l'extrait d'acétone est le seul qui montre une action inhibitrice contre trois types de bactéries *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* et *S. aureus*.

II.7. Effet antipoison

Les extraits d'acétate d'éthyle, éthanol, méthanol et de dichlorométhane, des feuilles d'*Artemisia campestris* ont été testés pour leurs capacités de neutralisation de venin de scorpion et de vipère. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique, inhibe l'activité de dégradation des globules rouges contre le venin du scorpion *Androctonus*

australis garzoni. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'extrait de dichlorométhane pour la neutralisation de venin de la vipère *Macrovipera lebetina* (Memmi et al., 2007).

III. Toxicité de la plante

Les toxines sont répartis à travers toute la plante, mais les feuilles et les tiges en contiennent les concentrations les plus élevées, la plante compte 0,04% d'huiles essentielles.

Elle est contient 58-65% de α -Pinene et 30% de β -Pinene Elbahri et al., (1997), d'autre résultat obtenu lors du test réalise sur des rats Wistar albinos et des souris de laboratoire, malgré d'une dose très élevée (20ml/kg) aucun mortalité n'a été enregistrée après 23 jours d'administration (Moussaoui, 2010).

Chapitre 3

Les activités biologiques

III. Les activités biologiques

I. L'activité antioxydante

I.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les Pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, avec conséquences l'apparitions des dégâts irréversibles par la cellule à concentration plus élevées (**Pincemilet *al.*, 1999**).

I.2. Origines de stress oxydatif

Lors d'un stress oxydant, les EOR non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules cellulaires (les lipides, les protéines, l'ADN) qui due aux dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine et catécholamines). Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant ((**Pincemilet *et al.*, 2002**), (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**)).

I.3. Les radicaux libres

Il s'agit d'un atome ou d'une molécule qui contient un (ou plusieurs) électron(s) non apparié(s), comme conséquence de la perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électron(s)(**Berger, 2006**). La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O₂) présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre, en raison de ses deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales de plus grande énergie (**Rezaire, 2012**).

Les radicaux peuvent réagir avec des composants cellulaires (ADN, lipides, protéines...) aboutissant à des lésions cellulaires irréversibles, mais dans des conditions physiologiques agissent comme des substances de signal importantes en plus de l'utilité dans la défense chez les bactéries (**Chahine, 2014 ; Jdidi, 2015**).

I.4. La production des radicaux libres

Les radicaux libres, dérivés du métabolisme, sont produits dans toutes les cellules, même si certaines en fabriquent des quantités plus importantes (par exemple les macrophages pendant la phagocytose). Les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment les cellules humaines. Ces derniers sont présents en oxydent les molécules

(molécules se trouvant à l'intérieur des cellules, en particulier des lipides), ce qui provoque la mort des cellules. Toutefois le corps humain possède des mécanismes de défense contre les effets des radicaux libres ; Ce sont les enzymes qui dégradent les peroxydes, les métaux de transition (**Hubert et al., 1998**).

La principale source des ERO (les espèces réactives de l'oxygène) est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire, elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires. Il existe de nombreuses autres sources parmi lesquelles l'auto-oxydation des petites molécules, Les cyclooxygénases et lipooxygénases, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes (**Mohammedi, 2013**).

I.5. 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^-), le radical hydroxyle ($-OH$), le monoxyde d'azote (NO^*), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde

d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (**Jacques et André., 2004 ; Gutteridge, 1993**).

I.5.1. Les espèces oxygénées réactives radicalaires

L'anion radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe^3+), l'ascorbate et surtout le superoxyde dismutase. Plus réactif que le précédent, le radical perhydroxyle HO_2^{\bullet} est obtenu après protonation de ce dernier à pH inférieur à 4,8 ($pK_a (HO_2^{\bullet}/ O_2^{\bullet-}) 4,8$) (**Rezaire, 2012**)

La réduction mono électronique du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 donne naissance au radical hydroxyle HO^{\bullet} et à l'anion basique non radicalaire OH^- en présence d'un catalyseur (réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + Fe^{3+} + OH^-$). Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (**Hennebelle, 2006**).

I.5.2. Les espèces oxygénées non radicalaires

L'oxygène singulet $1O_2$, qui est la forme diamagnétique 19 de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (**Choe et Min, 2005 ; Hennebelle, 2006**).

Sous sa forme moléculaire, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques Fe^{2+} et Cu^{+} , lors de réactions de type « Fenton » (**Wardman et Candeias, 1996**).

I.6. Mécanismes d'oxydation des radicaux libres

Les ROS d'une part leur structure électronique instable peuvent attaquer les composants cellulaires, ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (phénomène de lipoperoxydation des membranes cellulaires), ils agressent également sur les protéines, les microfibrilles de collagène, l'acide hyaluronique, les acides nucléiques des chromosomes et l'ADN lui-même est transformé entraînant l'apparition d'une série d'anomalie dont le risque de cancérisation ; Qui résulte par la suite des lésions de la membrane cellulaire, qui peuvent aboutir à des dérèglements d'intensité variable, conduisant éventuellement à la mort cellulaire et l'apparition des maladies (**Barreto, 2002**).

I.7. 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 (**Favier, 2003**).

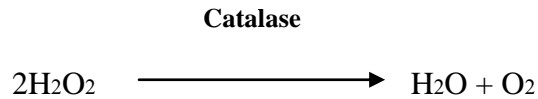
On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule :

I.7.1. Les antioxydants endogènes

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (**Avissar et al., 1989**). 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 (**Marfak, 2003**).

a. La catalase

Le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction de dismutation peut subir une réaction de fenton. Il ne faut pas donc qu'il s'accumule, c'est le rôle de la catalase, elle transforme deux molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui sont des composés stables (Jacques et André., 2004).

**b. Les chélateurs de métaux**

Plusieurs protéines qui circulent dans le sérum peuvent prendre en charge des ions métalliques libres qui sont potentiellement toxiques, il s'agit de la transferrine et de la lactoferrine pour le fer et la céruléoplasmine pour le cuivre. Elles agissent comme des chélateurs et maintiennent les ions métalliques sous forme inactive par rapport à la combinaison possible avec le peroxyde d'hydrogène (Jacques et André., 2004).

c. La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (Ganther, 1999).

I.7.2. Les antioxydants exogènes

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: les vitamines (E et C), antioxydants d'origine végétale.

a. Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardès-Albert et al., 2003).

I.8. Les conséquences du stress oxydatif

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles (**Rahman, 2002**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés. Ainsi, ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, cancer, Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (**Mohammedi, 2013**).

II. Activité anti hémolytique

II. 1. L'hémolyse

L'hémolyse (hemo: sang, lyse : perturbation) c'est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal, (**Thomas, 2013**).

L'hémolyse peut être causée par des facteurs extrinsèques tels une réponse anormale du système immunitaire, la formation de caillots dans les petits vaisseaux sanguins, certaines infections et les effets secondaires de certains médicaments (céphalosporines, anti-inflammatoires non stéroïdes, la pénicilline et ses dérivés, phenazopyridine, quinidine, lévofloxacine) (**Mintzer M et al, 2009**). La destruction des érythrocytes est un phénomène normal qui a lieu dans la rate lorsque les globules rouges, en fin de vie, y sont détruits et éliminés (**Olivier Pet al, 2010**).

II.1.1. Types des hémolyses

a. Hémolyse physiologique

a.1. Hémolyse intra-tissulaire

Les GR âgés, après une durée de vie normale de 120 jours, sont phagocytés par les macrophages du système des phagocytes mononuclées. Chez le sujet normal, la majorité des GR sont détruits dans les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50%). Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie. Cette phagocytose porte sur des GR dont le vieillissement s'est traduit par:

✓ Des modifications biochimiques : diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaires, phénomènes oxydatifs.

✓ Des modifications morphologiques (tendance à la sphérocité par réduction de la surface membranaire et/ou hyperhydratation).

✓ Des modifications de la plasticité (diminution de la déformabilité des GR entraînant une stagnation dans les capillaires. (**Aguilar_M , 2007**))

Ce type d'hémolyse se caractérise par :

✓ Hyperbilirubinémie non conjuguée (>17mmol/L).

✓ Libération d'Hb.

✓ Chute de l'haptoglobine modérée.

✓ Les (GR) vieillissent disparaissent du torrent circulatoire par un mécanisme intratissulaire de (85%) (**Marc D, 2013**).

a.2.Hémolyse intravasculaire

Une faible partie de l'hémolyse physiologique se déroule au sein même de la circulation sanguine. Dans ce cas, l'Hb est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec l'haptoglobine, synthétisée par le foie. Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'Hb est dégradée. La taille du complexe haptoglobine-Hb ne lui permet pas de traverser le glomérule rénal (**Aguilar_M, 2007**).Ce type d'hémolyse se caractérise par :

✓ Chute de l'haptoglobine et hémoglobinémie et hémoglobinurie.

✓ Élévation des LDH.

✓ Élévation inconstante de la bilirubine non conjuguée.

b. Hémolyse pathologique

C'est la destruction précoce et exagérée des GR circulants sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être intrinsèque (Hémolyse corpusculaire) ou extrinsèque (Hémolyse extra-corpusculaire). Ce processus peut être congénital ou acquis, il affecte toujours un des constituants vitaux du GR : membrane, enzyme, Hémoglobine (Hb)(**Beaumont et Hergaux., 2005**).

b.1. Hémolyse d'origine corpusculaire

Les causes sont ,là encore, multiples, l'origine héréditaire (constitutionnelle) étant la règle.

- ✓ Par anomalie de la membrane du GR.
- ✓ Sphérocytose héréditaire (maladie de Minkowski-chauffard).
- ✓ Elliptocytose héréditaire.

Elle est caractérisée par l'existence sur les frottis de >15% des GR avec une forme ovale, l'anémie est variable ; si elle existe, on peut observer une augmentation de la fragilité osmotique des GR aux solutions hypotoniques et de l'auto-hémolyse spontanée des GR (Arocket *al .*, 2008).

b.2. Hémolyse d'origine extracorporelle

Elles peuvent être de causes multiples généralement acquises:

- ✓ hémolyse d'origine mécanique: l'hémolyse est intravasculaire, les GR sont détruits ou fragmentés du fait d'obstacles mécaniques ou de turbulences hémodynamiques (prothèses cardiaques, circulation extracorporelle). L'anémie est généralement d'intensité modérée et se caractérise par la présence de schizocytes sur le frottis:

- ✓ Hémolyse d'origine infectieuse: une hémolyse parfois massive peut se rencontrer au cours d'infections bactériennes (*Clostridium perfringens*, *Streptocoque*, *Staphylocoque*) ou parasitaire comme le paludisme (*Plasmodium falciparum*) ;

- ✓ Hémolyse d'origine toxique: industrielle (aniline, nitrobenzène...), animale (venins), végétale (champignons) .

- ✓ Hémolyse d'origine immunologique : Parmi les causes les plus fréquentes l'hémolyse extracorporelle, on trouve :

- Anémie hémolytique auto-immune liée à la présence dans le sérum d'autoanticorps dirigés contre des déterminants antigéniques présents à la surface des GR ;
- Anémie hémolytique d'origine médicamenteuse faisant intervenir ,là encore, un mécanisme immunologique.
- anémie hémolytique après accident transfusionnel (Arocket *al .*, 2008).

II.1.2. Les signes biologiques de l'hémolyse

Selon Guitton (2008), la destruction prématurée des GR (hémolyse) induit par :

- Une augmentation de la bilirubine libre ou indirecte ou non conjuguée (catabolisme de l'hémoglobine).
- Un effondrement de l'haptoglobine.

➤ Une augmentation des LDH (permet de quantifier le degré d'hémolyse intravasculaire).

➤ Une augmentation des réticulocytes (souvent > 150 000/mm³).

➤ Hémoglobinurie, hémosidérinurie : uniquement dans les hémolyses intravasculaires

II.1.3. Les signes cliniques

➤ La pâleur, Asthénie, Dyspnée (essoufflement), Vertiges, Céphalées, Tachycardie, ictère, fièvre).

➤ Arthralgies (douleurs dans les articulations).

➤ Douleurs dans l'abdomen.

➤ Hypotension artérielle.

➤ Vomissements, diarrhée.

➤ Urines rouges (bon signe sous anesthésie générale).

Un état de choc (déficit de fonctionnement de certains organes) en cas d'hémolyse importante s'accompagnant d'une anurie (absence d'urine), ou d'une diminution de la quantité des urines. (**Benjamin B, Marc Z, 2006**).

II.1.4. Traitement de l'hémolyse pathologique

Les traitements d'une hémolyse pathologique sont aussi nombreux qu'il y a de

Formes différentes d'anomalies hémolytiques :

➤ Une supplémentation en acide folique notamment pour les patients avec une anémie hémolytique chronique.

➤ Une transfusion sanguine si nécessaire.

➤ Dans certains cas, une ablation de la rate (splénectomie).

➤ Chez les personnes splénectomisées, la vaccination est recommandée afin de minimiser le risque infectieux chez des patients aux défenses immunitaires basses.

➤ Des corticoïdes, des immunoglobulines ou des immunosuppresseurs lorsque l'anémie est auto-immune ou à composante inflammatoire. **(3)**

III. Activité anticoagulante

III.1.Hémostase

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes qui s'opposent aux saignements ou aux thromboses spontanées. Elle permet à la fois l'arrêt d'une hémorragie et la reperméabilisation des vaisseaux après une effraction vasculaire. L'hémostase résulte de trois processus complémentaires :

- L'hémostase primaire
- La coagulation
- La fibrinolyse

III.1.1. L'hémostase primaire

L'hémostase primaire est l'ensemble des phénomènes qui contribuent à l'arrêt du saignement par formation d'un caillot ou clou plaquettaire. Elle fait intervenir la paroi vasculaire, les plaquettes et deux facteurs plasmatiques, le facteur de Von Willebrand (vWF) et le fibrinogène (**Harif, 2007**). Le clou plaquettaire (thrombus blanc) ainsi constitué est instable et doit être consolidé par l'activation de la coagulation (**Nonne, 2007**).

III.1.2. Définition de la coagulation

La coagulation est un phénomène essentiel à la protection du système vasculaire. C'est elle qui empêche les saignements excessifs en cas de coupure.

La coagulation doit suivre un équilibre : si elle est insuffisante, elle peut être à l'origine de saignements spontanés (hémorragies). Au contraire, lorsqu'elle est excessive, elle peut être associée à la formation de caillots sanguins. Ceux-ci peuvent voyager à travers les vaisseaux vers le cœur, les poumons ou le cerveau et avoir des conséquences graves (thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire, crise cardiaque). La coagulation est le processus qui aboutit à la formation de fibrine nécessaire à la consolidation du clou plaquettaire. Il s'agit d'une séquence de réactions enzymatiques permettant l'activation de facteurs plasmatiques inactifs en protéases actives (**Plaziat D, 2009**).

Elle est divisée en deux voies, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, suivie d'une voie commune après l'activation du Facteur X (FX) (**De Caterina et al., 2012 ; Pierce et al., 1999**). Elle nécessite l'intervention de nombreux facteurs plasmatiques, nommés de I à XIII. Ces facteurs sont présents sous forme de précurseurs inactifs dans le sang. Lorsqu'ils sont activés par protéolyse, on leur adjoint la lettre « a ». Les facteurs sont synthétisés par le foie (**Penche, 2015**).

a. Voie extrinsèque ou voie tissulaire

Voie extrinsèque ou voie tissulaire Elle utilise les facteurs tissulaires libérés lors de la lésion vasculaire. En présence de calcium et du facteur tissulaire lié aux phospholipides des membranes cellulaires, le facteur VII s'active en devenant la convertine (VIIa). Le VIIa lié au facteur tissulaire permet d'activer le facteur X lorsque le facteur tissulaire est en excès. Mais, en présence de peu de facteur tissulaire, le facteur VIIa pourra activer le facteur IX (**Pench, 2015**).

b. Voie intrinsèque ou voie cellulaire

Elle est ainsi dénommée car toutes les protéines nécessaires à cette voie se trouvent dans le plasma (**Harif, 2007**). Cette voie nécessite l'intervention du système contact. Il comprend quatre facteurs (XII, XI, prékallikréine et kininogène de haut poids moléculaire). L'activation du système contact peut être déclenchée par le contact du facteur XII avec une surface chargée négativement mouillable ou certains composés biochimiques. Le facteur IX activé en présence du facteur VIII activé permet l'activation du facteur X. La distinction de ces deux voies reste utile pour le diagnostic des pathologies de la coagulation et de leur exploration. Toutefois les travaux récents ont montré que la voie tissulaire est prépondérante in vivo. La voie intrinsèque venant renforcer ou suppléer cette voie dans certains cas. (**Pench, 2015**).

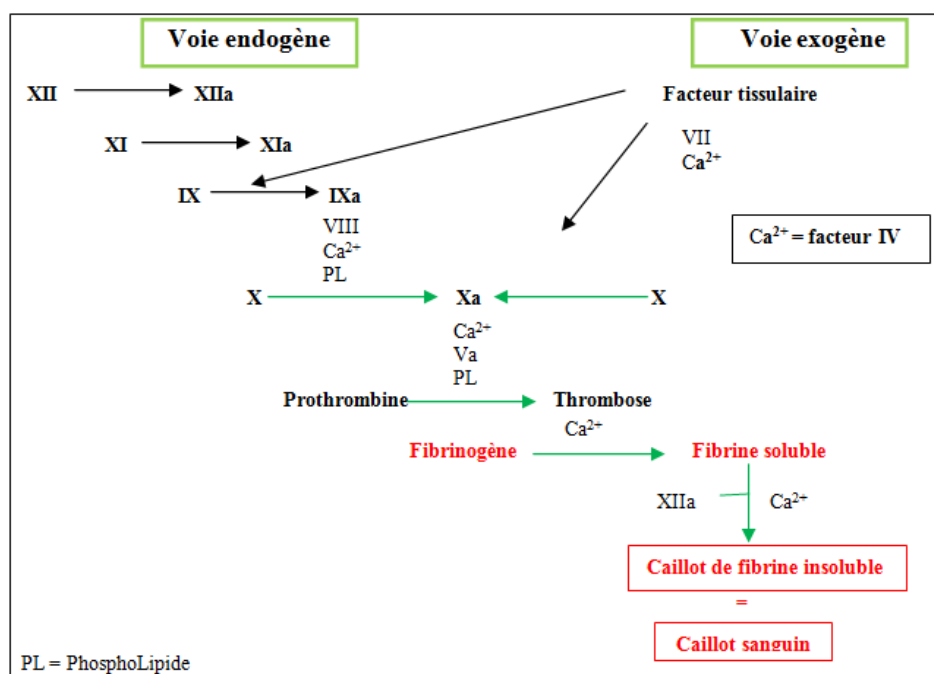


Figure 9: Voies de la coagulation (**Lemaoui, 2011**).

c. Voie commune

Cette voie correspond aux réactions enzymatiques conduisant à la formation de fibrine à partir du fibrinogène. Dans un premier temps il y a une activation de la prothrombine en thrombine par le complexe formé par le facteur Xa, le facteur Va, le Calcium et les phospholipides plaquettaires. La thrombine convertira le fibrinogène en monomères de fibrines qui vont former le caillot de fibrine par des liaisons électrostatiques. Ce caillot reste soluble. Le facteur XIII activé par la thrombine va agir sur le caillot pour le rendre insoluble par la transformation des liaisons entre les monomères de fibrine en liaisons covalentes (Harif, 2007).

Tableau 4: Facteurs de coagulation (Palta et al., 2014).

Numéro des facteurs de coagulation	Nom des facteurs de coagulation	Fonction
I	Fibrinogène	Formation du caillot
II	Prothrombine	Activation de I, V, VII, VIII, XI, XIII et plaquettes
III	TF	Cofacteur du VIIa
IV	Calcium	Facilite la liaison des facteurs aux Phospholipides
V	Pro-accélélerine	Co facteur de la X-prothrombinase Complexe
VII	Proconvertine	Activation des facteurs IX et X
VIII	Facteur antihemophilique A	Cofacteur du complexe IX-tenase
IX	Facteur	Activation de X

	antihémophilique B	
X	Facteur Stuart	Prothrombinase complexe avec le facteur V qui active le facteur II
XI	Facteur Rosenthal	Active le facteur IX
XII	Facteur Hageman	Activation des facteurs XI et VII
XIII	Facteur de stabilisation de la fibrine	Liaison des fibrines

d. Régulation de la coagulation

La coagulation est sous le contrôle d'inhibiteurs spécifiques, l'antithrombine III (AT III) et le système protéine C-protéine S. Ces inhibiteurs évitent l'extension anormale du thrombus et la survenue d'une thrombose. L'AT III est un inhibiteur de sérine protéase. Elle inhibe majoritairement la thrombine (IIa) et dans une moindre mesure les facteurs Xa et IXa. La protéine C, est une protéine vitamine K dépendante qui circule sous forme inactive. Elle est activée par la thrombine lorsque cette dernière est liée à une protéine de la surface endothéliale, la thrombomoduline. La protéine C activée dégrade par protéolyse les facteurs Va et VIIa avec l'aide de son cofacteur, la protéine S.

e. Les anticoagulants

Les médicaments intervenant au niveau de la cascade de la coagulation sont appelés « anticoagulants ». Ils agissent à différents niveaux mais empêchent tous la formation du caillot de fibrine.

- Les héparines agissent en potentialisant l'effet de l'AT III sur les facteurs IIa et Xa.
- Le fondaparinux potentialise l'action de l'AT III mais seulement sur le facteur Xa.
- Les antivitamines K interviennent en inhibant la formation des facteurs II, VII, IX et X, vitamines K dépendants.
- Les inhibiteurs directs de thrombine agissent à la fois sur la thrombine circulante et celle liée à un thrombus indépendamment de l'AT III. Ils sont représentés par les dérivés de l'hirudine (désirudine, bivalirudine et lépirudine) mais également par des dérivés synthétiques (mélagatran, ximélagatran, dabigatran).

➤ Les inhibiteurs directs du facteur Xa, nouvelle classe médicamenteuse, représentée par le rivaroxaban (XAREL TO®) (**Amandine, 2009**).

III.1.3. Fibrinolyse

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

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

La libération des activateurs du plasminogène est stimulée par les dépôts de fibrine et par la thrombine. Il existe des inhibiteurs endogènes du t-PA et de l'u-PA appelés plasminogenactivatorinhibitor (PAI) qui, en inhibant les activateurs, réduisent la transformation du plasminogène en plasmine et donc l'activité fibrinolytique. **(1)**

Partie expérimentale

Chapitre 1

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet l'investigation phytochimique et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante, antihémolytique et anticoagulante des extraits aqueux et organiques de la plante médicinale. *Artemisia campestris* L. La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie à l'université Abbes Laghrour – Khenchela.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

Il est constitué de la partie aérienne (feuilles et tiges) de la plante *Artemisia campestris* L, récoltée au cours du mois de mars 2019 de la région M'toussa-AinTouila-Khenchela (Latitude 35°35'58"N Longitude 7°14'42"E) et identifiée par Dr. Zeraeb Azzeddine maître de conférences à la faculté de sciences de la nature et de la vie, Université Abbés Laghrour - Khenchela. La plante fraîchement récoltée a été séchée dans un endroit sec et aéré à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil puis pulvérisée au broyeur pour obtenir une poudre fine, cette dernière est conservée dans un flacon en verre bien hermétique jusqu'à son utilisation.

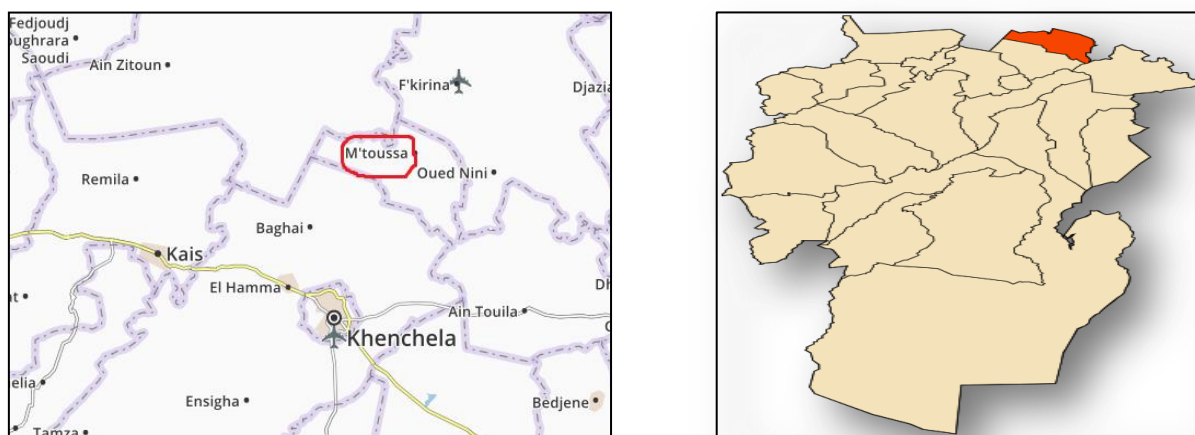


Figure10 : La carte géographique Khenchela montrant le lieu de récolte.(4).

1.1.2. Echantillons du sang

Six échantillons du sang ont été recueillis à partir des personnes saines pour l'évaluation de l'activité antihémolytique et anticoagulante des extraits.

I.2. Médicaments

Deux médicaments ont été utilisés comme contrôle positif pour l'évaluation des activités antihémolytique et anticoagulante.

- Le médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI pour l'activité anticoagulante ;
- Le médicament antihémolytique « Dicynone » de concentration 250 mg pour l'activité antihémolytique.(Annexe 1)

I.3. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl₃, HCl, acide acétique, NaOH, NH₄OH, KI, I₂,NaCl, AlCl₃, diméthylsulfoxyde (DMSO), quercétine, chloroforme, toluène, acétone, éthanol, dichlorométhane, hexane, Folin-Ciocalteu, trichlorure de fer, Diphénylpicryl-hydrazyl, carbonate de sodium, toluène, trichlorure d'aluminium, méthanol, n-butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, acide sulfurique, ammoniacque, tampon phosphate, acide ascorbique, acide gallique, acide acétique, acide chlorique, Wagner et des plaques CCM.; proviennent tous de Sigma-Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Rota vapeur (HAHNVAPOR), Spectrophotomètre (spectrum SP-UV 2005), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (VILBER LOURMAT), Bain Marie (nive bath, MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), Vortex (VELP), Balance analytique (OHAUS), Balance (KERN PCB), Centrifugeuses (EZ Swing 3K, Rotofix 32 A), Réfrigérateurs (Liebherr), Plaque chauffante (LabTech), Autoclave (Raypa) et pH mètre (Hanna instruments).(Annexe 2)

II.Méthodes

II.1. Préparation de l'extrait méthanolique brut

150 g de la poudre de la partie aérienne de la plante médicinale plante *Artemisia campestris* L mises à macérer dans un mélange méthanol /eau (7:3) pendant 24 heures à température ambiante. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. L'extrait hydroalcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange dont le méthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite via un rotavapeur à la température 45°C (**figure11**) permet tant ainsi d'obtenir l'extrait méthanolique brut qui est conservé à -4°C(**Tadegat al,2005**).



Figure 11 : Photographie du Rotavapeur utilisé pour sécher l'extrait méthanolique brut.

II.2. Préparation de l'extrait aqueux

Elle est basée sur la préparation d'une infusion, en mettant 50 g de la poudre végétale dans 500 ml d'eau distillée bouillante pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, le filtrat récupéré est évaporé à sec dans l'étuve à 50°C (Boubacar Souley, 2005).

II.3. Détermination du rendement d'extraction

Le résidu ou la poudre obtenue des extraits est pesée pour la détermination du rendement selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \text{Ps} / \text{Pp} \times 100$$

Où : **Ps** : Poids de l'extrait sec en gramme (g)

Pp : Poids de la poudre en gramme (g).

II.4. Screening phytochimique

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 qualitatifs sont réalisés sur les deux extraits et les résultats obtenus sont évalués comme suit:

+ : Positif ; - : Négatif ; ND : Non déterminé.

II.4.1. Recherche des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 2%, sont ajoutées à 2 ml de chaque extrait. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes. Le test est considéré positif s'il y a l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité.

II.4.2. Recherche des saponosides

- Test 1 : 5 ml de chaque extraits 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. (Karumiet al,2004).

- 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. (Edeogaet al, 2005).

II.4.3. Recherche des coumarines

Les résidus secs sont dissous dans l'eau distillée par chauffage. Après refroidissement, la solution obtenue été répartie dans 2 tubes à essai. Le premier sert de témoin et on ajoute 05ml de NH₄OH 10% dans le 2eme tube. L'apparition d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV 365 nm indique la présence des coumarines.(Ciulei,1982; Wagner et Blatt,1996).

II.4.4. Recherche des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des quelque fragment de FeCl₃ et 5 ml d'acide sulfurique contenant des fragments de FeCl₃ 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) (Yrjönen, 2004)

II.4.5. 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.(Mohammedi, 2006).

II.4.6. Recherche des flavonoïdes

5 ml de chaque extrait ont traités avec quelques gouttes d'AlCl₃ (1%). La présence des flavonoïdesestconfirméeparl'apparitiond'unecouleurjaune.(Benmehdi,2001).

II.4.7. Recherche des anthocyanes

2 ml d'extrait a été traités avec 2ml de HCl (2N) et quelques gouttes de NH₄OH. Un test positif est révélé par une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée (Mellouk, 2013).

II.4.8. Recherche des flavonols

0,5 ml du HCl concentré ont été additionnés à 5 ml d'extrait. La couleur rouge pourpre après incubation dans un bain marie pendant 30 minutes, à température entre 80 – 90 C° indique la présence des flavonols (Guessoum et Lecheheb, 2015).

II.4.9. Recherche des flavones

Quelques gouttes de KOH ont été ajoutées à un 1 ml d'extrait. La couleur orange indique la présence des flavones (Mellouk, 2013).

II.4.10. Recherche des flavonones

Quelques gouttes de FeCl₃ ont été ajoutées à un 1 ml d'extrait. La couleur rouge violacé indique la présence des flavonones. Si le résultat est négatif cela indique la présence de chalcone ou isoflavone (Mellouk, 2013).

II.5. Etude quantitative

II.5.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode de Wong (2006).

1) Principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif Folin) dans une solution alcaline. (Vuorela *et al*, 2005).

Brièvement 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 10%. Les solutions ont été mélangées et incubés pendant 4 minutes. Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (7,5g /l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

2) Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-2 μ g/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAGmg).

II.5.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) cité par **Djeridane 2006** est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

1) Principe

1ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol).Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

2) Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75-40 μ g/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon .Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μ gEQ/mg).

II.6. Etude qualitative

II.6.1. Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince(CCM)

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en général un mélange des solvants, adapté au type de séparation recherchée, 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 des structures.

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silice a gel, sur support rigide en aluminium 20/20 cm dont chaque extrait a été déposé à l'aide d'une micropipette

(2 μ l) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque.

Les plaques sont ensuite placées dans les cuves de développement, à environ 0,5 cm de hauteur dans lesquelles se trouve la phase mobile dont les systèmes de migration utilisés aux

extraits sont :

Extrait méthanolique brut : Butanol/acide acétique/l'eau distillée (20 :5 :25)

Extrait aqueux : Acétate d'éthyle/acide acétique glacial /acide formique /l'eau distillée (25 :3 :3 :7)

Après développement, les plaques sont séchées, puis visualisées séparément par une révélation physique sous lampe UV à 264 et 365nm.

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant sur la distance parcourue par le solvant et les rapports frontaux des spots sont comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants des deux extraits (Vuorelaet *al*, 2005) .

II.7. Étude *in vitro* des activités biologiques

II.7.1.Evaluation de l'activité antioxydante : Test scavenger du radical libre DPP

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par l'activité du balayage des radicaux libres en employant le radical libre stable DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants(Bastos et al, 2007).

1) Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2.2 diphenyl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 diphenyl 1 picrylhydrazyl de couleur jaune(Maataouiet *al*, 2006).L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

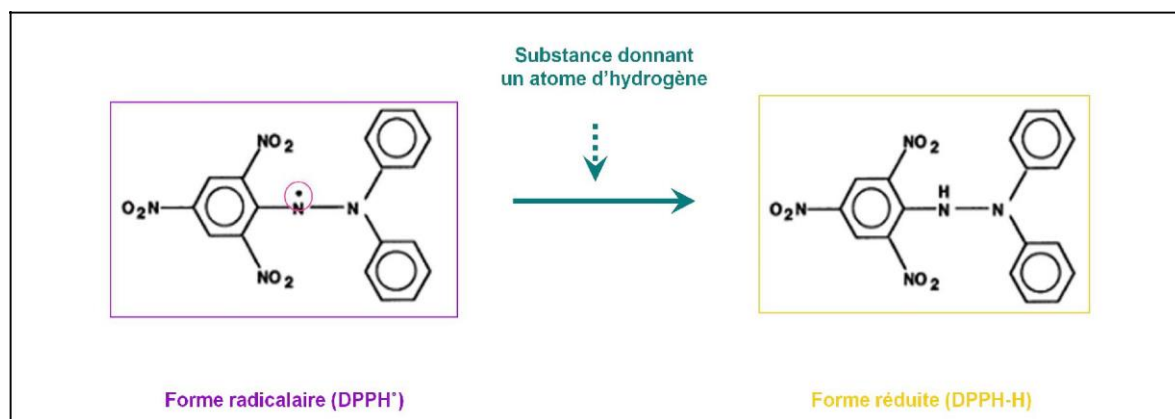


Figure 12. Réduction du DPPH[•] par un antioxydant (Molyneux, 2004).

2) Méthode

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,3 mM. Dans des tubes on introduit 15 µl de chaque extrait (A partir d'une solution méthanolique mère de C₁=1 mg/ml de chaque extrait est solubilisé dans le méthanol, les dilutions suivantes ont été préparées : C₂ = 8 mg/ml, C₃ = 6 mg/ml, C₄ = 4 mg/ml, C₅ = 2 mg/ml). Et on ajoute 1.5ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 3 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 1.5 ml de la solution méthanolique de DPPH et de 15µl de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

3) Expression des résultats

En présence d'un antioxydant, l'intensité d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (Bastos *et al*, 2007). Les résultats sont exprimés en tant que l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante (Wang *et al*, 2006):

$$I\% = \frac{[(\text{Abs Control négatif} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Control négatif}] \times 100}{1}$$

La valeur IC₅₀ est définie comme étant la concentration de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH(couleur), les valeurs IC₅₀ moyennes ont été calculées par les régressions linéaires de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration de l'extrait testé et l'ordonnée par l'activité antioxydante en

pourcentage(Mensoreta.,2009).

II.7.2. Evaluation de l'activité antihémolytique

L'effet antihémolytique des extraits a été réalisé selon la méthode de **Yang et al,(2005)**

:

II.7.2.1. Préparation des globules rouges

5 ml de sang d'une personne saine ont été recueillis dans des tubes traités à l'EDTA, puis centrifugés pendant 5 min à 3000 tr/min.

Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé trois fois avec du tampon phosphate saline (PBS) (0,2 M et pH 7,4) (Annexe03) puis remis en suspension dans une solution saline (4 %).

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

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

II.7.2.2. Préparation de l'extrait

Différentes concentrations des extraits (2 mg/ml, 1,5mg/ml, 0,5 mg/ml) ont été préparés dans le PBS.

II.7.2.3. Protocole expérimentale : Les différentes étapes de l'essai sont :

➤ Mettre dans des tubes 1 ml de la solution érythrocytaire préparée avec 0,5 ml des extraits (dilué avec le PBS) à différentes concentration initiales ;

➤ Incuber les tubes à 37 °C pendant 20 min.

➤ Ajouter 0,5 ml de la solution de NaCl (2 %) dilué avec le PBS au mélange réactionnelle.

➤ Centrifuger les tubes à 1000 tr/min pendant 10 min.

➤ Récupérer le surnageant.

➤ Lire l'absorbance du surnageant (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

➤ L'hémolyse relative a été évalué en comparaison avec l'hémolyse induit par NaCl en absence des extraits (contrôle négatif).

➤ Un médicament antihémodolytique (Dicynone 250 mg) dissout dans le tampon PBS et en absence des extraits a été utilisé comme contrôle positif.

➤ Chaque série d'expérience a été effectuée en triplicata et le % d'inhibition de l'hémolyse par les extraits a été calculé.

II.7.2.4. Expression des résultats

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

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

A_c : absorbance du control négatif.

A_{ext} : absorbance de l'extrait.

II.7.3. Evaluation de l'activité anticoagulante

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

II.7.3.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaquetté

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

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

II.7.3.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène

L'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène de la coagulation à été évalué en utilisant un test de coagulation de Quick (TK) ou le temps de prothrombine (TP) qui permet une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation (Brummel et al., 2002).

1) Principe de l'essai

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

2) Protocole expérimentale

Effet des extraits sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon les étapes suivantes; 10 µl de chaque extrait (0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml) préparé dans le DMSO ont été additionné à 90 µl du plasma standard, le mélange a été incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200 µl de thromboplastine pré incubé à 37 °C pendant 15 min. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide du chronomètre.

II.7.3.3. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

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

1) Principe de l'essai

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

2) Protocole expérimentale

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

10 µl de chaque extrait (0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml) préparé dans le DMSO ont été additionné à 90 µl du plasma pauvre en plaquettes qui est ensuite incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, 100 µl d'une solution de céphaline Kaolin ont été additionnés puis le mélange est réincubé à 37 °C pendant 3 min et la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100 µl d'une solution aqueuse de 0,025 M CaCl₂

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

Un médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI dissout dans le DMSO a été utilisé comme contrôle positif.

Chapitre 2

Résultats et discussion

I. Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante, antihémolytique et anticoagulante de l'extrait méthanolique brut (**EMB**) et l'extrait aqueux (**EAq**) de la partie aérienne de la plante médicinale locale «*Artemisia campestris L.*».

1. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction, la couleur et l'aspect des extraits sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : Rendement et caractéristiques des extraits issus d'*Artemisia campestris L*

La plante	Extrait	Couleur	Aspect	Poids de l'extrait (g)	Rendement
<i>Artemisia campestris L</i>	EMB	vert	visqueux	16	10.66%
	EAq	vert	Pâteux	41	82%

L'opération de l'extraction des flavonoïdes à partir du matériel végétal *Artemisia campestris L* a permis d'obtenir des résidus dont le poids de l'extrait méthanolique brut est de 16 g et l'extrait aqueux avec 41g qui correspond respectivement aux rendements 10,66% et 82 %.





L'extraction des polyphénols à partir des plantes est influencée par la méthode d'extraction, la nature du solvant, le diamètre des particules de l'échantillon, la durée et les conditions de stockage ainsi que la présence de substances interférentes (**Naczk et Shahidi, 2004**).

L'extrait méthanolique brut (**EMB**) a été préparé à partir de la poudre de la partie aérienne de notre plante en utilisant la méthode de macération à froid dont le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée **Mohammedi Z, (2013)** et l'extrait aqueux obtenu (**EAq**) est le résultat d'une simple infusion à 10%, suivant la méthode de **Drissa et ses collaborateurs (2004)**. En effet, le rendement n'est pas relatif; il varie en fonction de la localisation géographique de l'espèce végétale, le degré de maturité, la génétique, le climat, la période de récolte, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité. **Bagad, Y.(2011)**.

2. Test phytochimiques

Le screening phytochimique réalisé sur **EMB** et **l'EAq** consiste à détecter les différentes familles de composés qui existent dans les feuilles et les tiges d'*Artemisia campestris L* par des réactions de précipitation ou de coloration, en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés, les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 06 et 07.

Tableaux 06 : Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait méthanolique brut (**EMB**) d'*Artemisia campestris L*

Tests phytochimiques			Résultats		
saponosides	Test 1	Test de la mousse	(+)	Formation d'une mousse persistante après 15 min	
	Test 2		(+)	Apparition d'une coloration rouge marron	
Flavonoïdes		AlCl_3	(+)	Apparition d'une coloration jaune	
Tanins		FeCl_3	(+)	Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3 min	






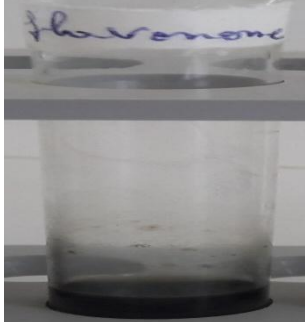

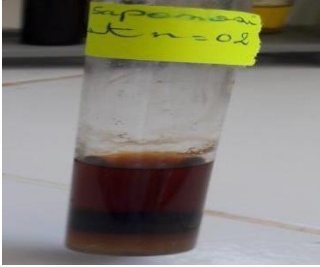





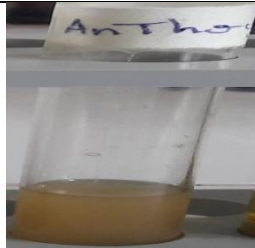

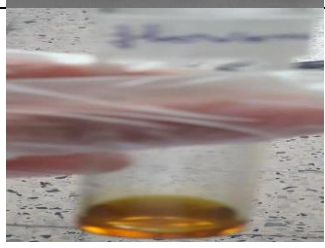

Composés réducteurs	Acide sulfurique Acide acétique FeCl ₃	(+)	Apparition de 2 phases: brune- rouge et bleue-verte	
Coumarines	NH ₄ OH 10%	(+)	presence d'une fluorescence bleue ou verte sous lampe UV	
Anthocyanes	HCl (2N) NH ₄ OH	(-)	Absence du virage de couleur au bleu – violace	
Flavonols	HCl concentré	(-)	Absence de la couleur rouge pourpre	
Flavones	KOH	(+)	Apparition d'une couleur orange	
Flavonones	FeCl ₃	(+)	Apparition d'une couleur rouge violacée	

Tableau 07: Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait aqueux (EAq) d' *Artemisia campestris L*

Tests phytochimiques			Résultats		
Saponosides	Test 1	Test de la mousse	(+)	Formation d'une mousse persistante après 15 min	
	Test 2		(+)	Apparition d'une coloration rouge marron	
Flavonoïdes		AlCl ₃	(+)	Apparition d'une coloration jaune	
Tanins		FeCl ₃	(+)	Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3 min	
Composés réducteurs		Acide sulfurique Acide acétique FeCl ₃	(+)	Absence de l'apparition de 2 phases: brune- rouge et bleue-verte	

Alcaloïdes	Wagner	(+)	Précipitation	
Coumarines	NH ₄ OH 10%	(+)	presence d'une fluorescence bleue ou verte sous lampe UV	
Anthocyanes	HCl (2N) NH ₄ OH	(-)	Absence du virage de couleur au bleu – violace	
flavonols	HCl concentré	(-)	Absence de la couleur rouge pourpre	
Flavones	KOH	(+)	Apparition d'une couleur orange	
Flavonones	FeCl ₃	(+)	Apparition d'une couleur rouge violacée	

Les résultats sont exprimés selon:

- Réaction positive (+)
- Réaction négative (-)

La présence de ces métabolites permet de justifier l'utilisation d'*Artemisia campestris L* comme substance anti-allergique, antioxydante, anti-inflammatoire et anti-spasmodique (Nsemi M, 2010; Hamza et al., 2015).

3. Analyse quantitative

3.1. Dosage des polyphénols totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax +b$) réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations (**Figure13**) dont la teneur en polyphénols totaux des deux extraits (**figure14**) est exprimée en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG /mg}$).

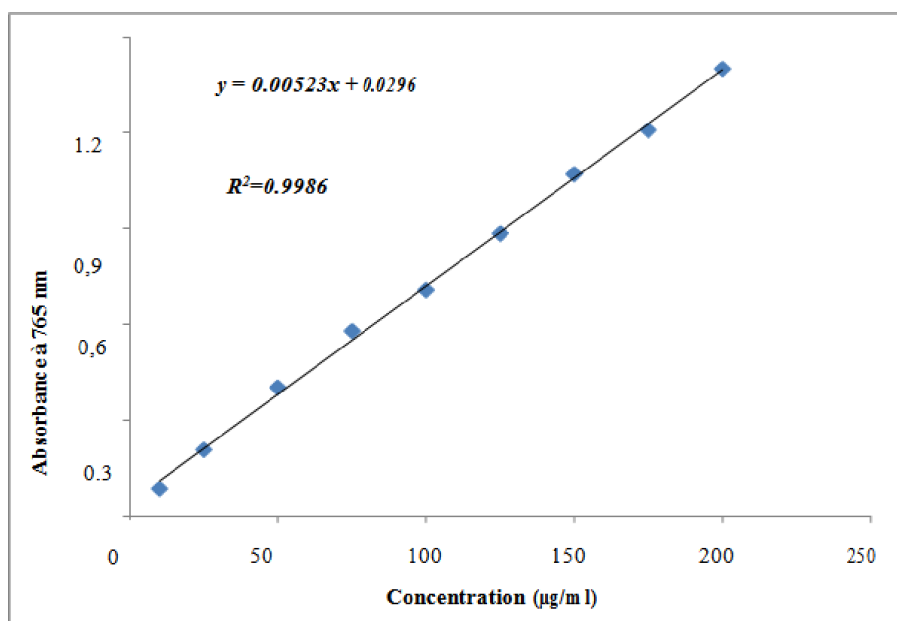
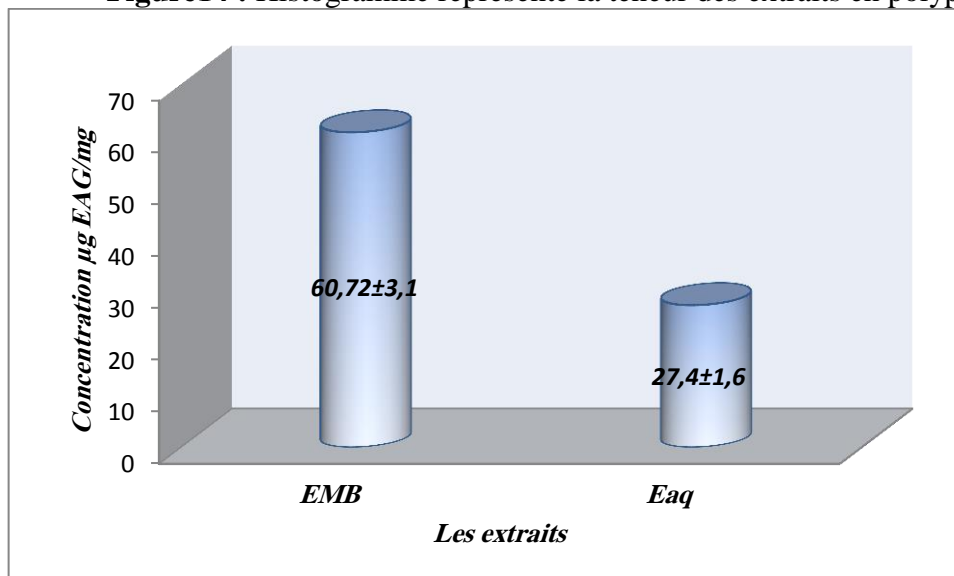


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).

Le dosage des polyphénols totaux des extraits d'*Artemisia campestris L* a été effectué selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et les nourritures (Blasa et al, 2007). L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisutthisakulet al, 2008).

Figure14 : Histogramme représente la teneur des extraits en polyphénols

Une vue d'ensemble de la représentation graphique nous laisse remarquer que les teneurs en phénols totaux de *Artemisia campestris L* sont comprises entre $27,4 \pm 1,6 \mu\text{g}$ équivalent acide gallique/mg d'extrait (**Eaq**) et $60,72 \pm 3,1 \mu\text{g}$ équivalent acide gallique /mg d'extrait (**EMB**).

Une étude qui a été effectuée par **Djeridane** et ses collègues(**2006**), ces derniers ont trouvé des valeurs très inférieures à nos résultats soient seulement de $7,63 \pm 0,61 \text{mg EAG/g}$ d'extrait sec et cela en utilisant l'éthanol 70%, cette différence peut ainsi être expliquée par le solvant utilisé, la région de la récolte qui est la ville de Laghouat (sahara), la période de récolte (juin) et enfin la délipidation de l'extrait de manière à ne doser que les polyphénols, car le follin-Ciocalteu n'est pas spécifique qu'aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce dernier et donner un taux apparent élevé en polyphénols (**Tawaha. Et al., 2007**).

3.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des composés flavoniques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) réalisée par une solution étalon (la quercétine) à différentes concentration (**figure15**) dont la teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent squercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

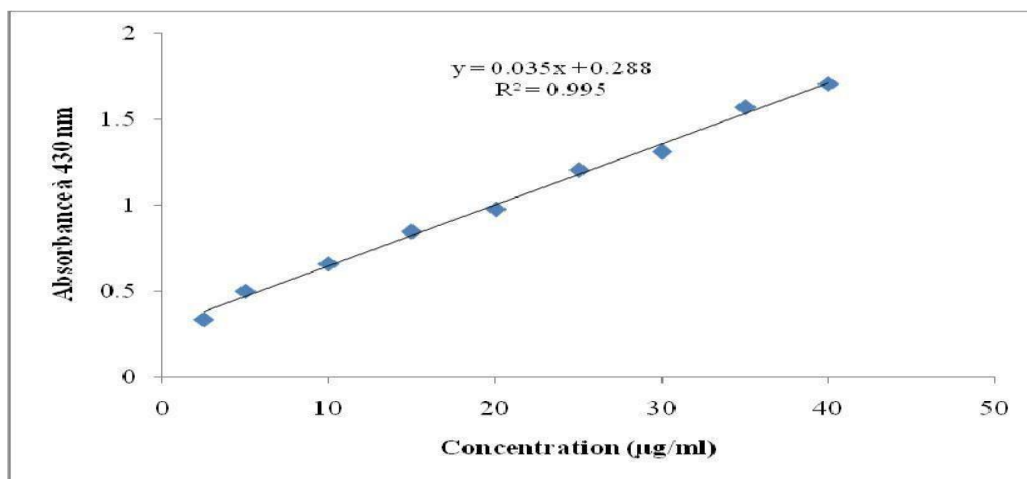


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).

La raison principale pour laquelle, on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al*, 2006).

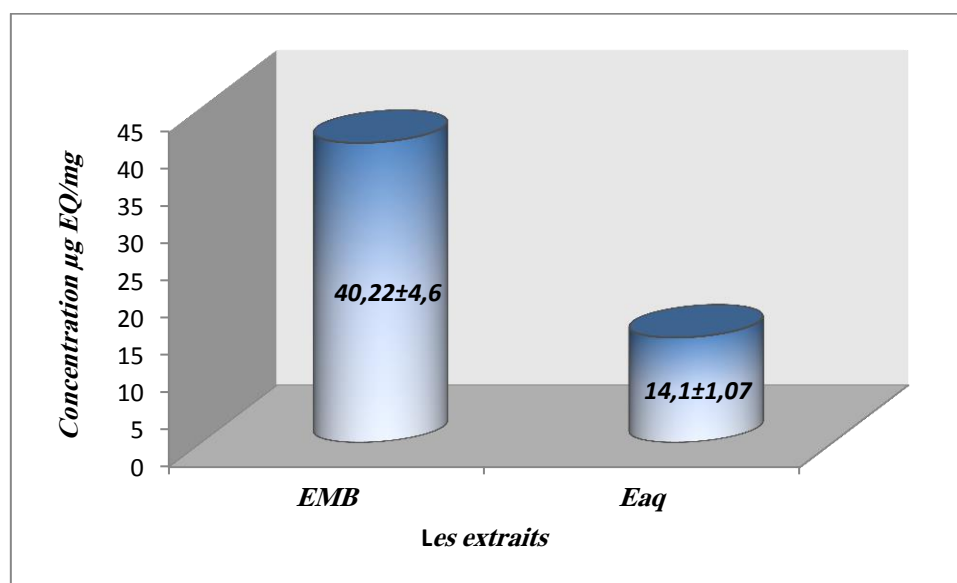


figure 16: Histogramme représente la teneur des extraits en flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure révèle une richesse de l'extrait EMB avec un taux de $40,22 \pm 4,6 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait par rapport à l'extrait aqueux avec une teneur faible à raison de $14,1 \pm 1,07 \mu\text{gEQ/mg}$ d'extrait (**figure 16**)

Les flavonoïdes sont des pigments naturels largement répandus chez les plantes. Ils protègent l'organisme contre les dommages oxydatifs tels que les rayons ultraviolets, la pollution de l'environnement, les produits chimiques, etc. (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Ce groupe est l'un des groupes ubiquitaires le plus largement distribués chez les végétaux et les antioxydants extraits des plantes sont en majeure partie des composés phénoliques dont les flavonoïdes, les tannins et les acides phénols (Poblocka-Olech *et al.*, 2016).

L'étude réalisée par Djeridane *et al.*, 2007 a montré que 98% des polyphénols totaux de la partie aérienne de *Artemisia campestris L* sont des flavonoïdes, ceci serait évident étant donné que c'est la partie aérienne qui joue un rôle important dans la protection contre les rayonnements solaires (Ryan *et al.*, 2002) et que ce groupe de composés phénoliques intervient dans la coloration des feuilles et des pétales des fleurs (Havsteen, 2002 ; Gervaise, 2004).

4. Etude qualitative de la chromatographie sur couche mince

Le développement de la méthode pour la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, dimension de la chambre de développement et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation (Yrjönen, 2004). La CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques des différents extraits dont l'identification des composés était basée sur la comparaison des R_f et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur la plaque en utilisant plusieurs systèmes d'éluion de polarité différente.

Suivant la révélation des plaques, les spots ont été visualisés sous une lampe UV à la longueur d'onde 365 nm, dont elle révèle les taches fluorescentes et visible et les **tableaux 10** résument les résultats du CCM.

Tableau10 : CCM de l'EMB

Système solvant : B

Acétate d'éthyle/ acide acétique glacial /acide formique /l'eau distillée (25 :3 :3 :7)

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Bleu fluorescent	0.5	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol
Bleu fluorescent	0.58	
Bleu fluorescent	0.75	Acide phénol

Tableau11 : CCM de l'EAq

Système solvant A

Acétone/ l'eau distillée (10 :10)

Couleur sous UV 365(nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Bleu	0.41	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu	0.66	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu	0.83	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol



A

B

Figure17 : Photographies des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits. EMB et EAq par chromatographie sur gel silice (révélation à UV (365 nm))

5. Étude *in vitro* des activités biologiques d'*Artemisia campestris L*

5.1. Evaluation de l'activité antioxydante : Test scavenger du radical libre DPPH

Plusieurs méthodes sont utilisées expérimentalement pour la détermination *in vitro* de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP (Ferricreducingantioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidantcapacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6 sulphonate) et DPPH⁺ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Georgievaet al, 2010).

L'activité antioxydante des extraits EAq, EMB d'*Artemisia campestris L* vis-à-vis le radical stable DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm selon la réaction suivante: $\text{DPPH} + \text{AH} \longrightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}$

La valeur d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) est déterminé graphiquement à partir de la courbe [% inhibition = f (Concentration)] dont une valeur faible d'IC₅₀ indique une activité antiradicalaire puissante (figure18).

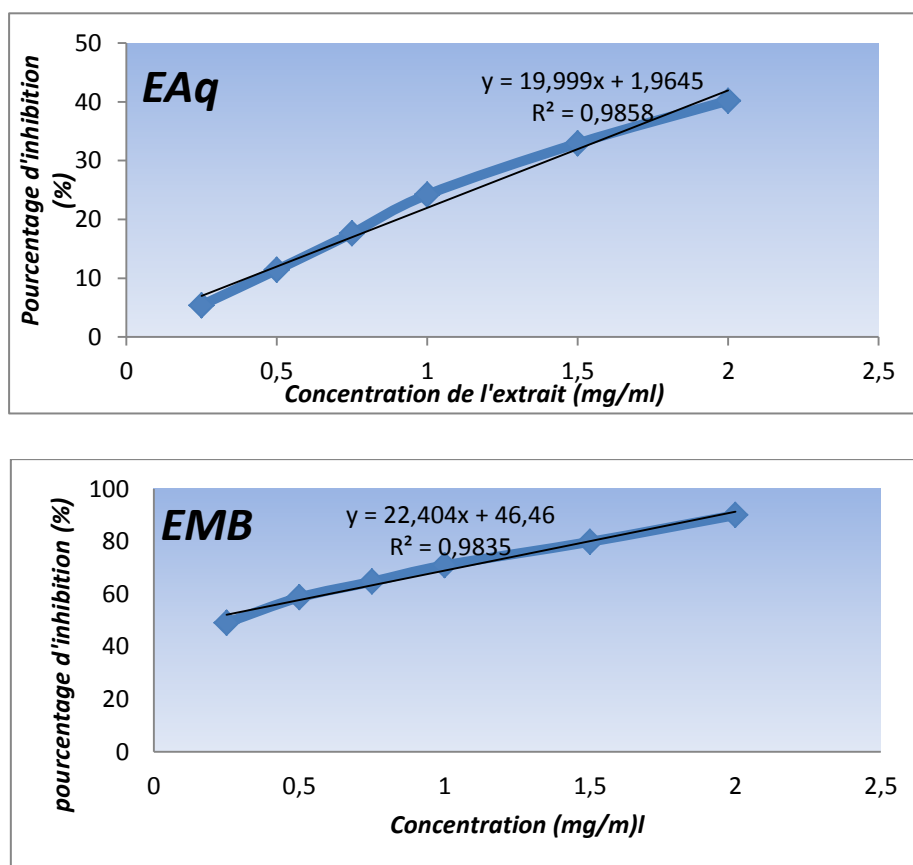


Figure 18 : Courbes présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits.

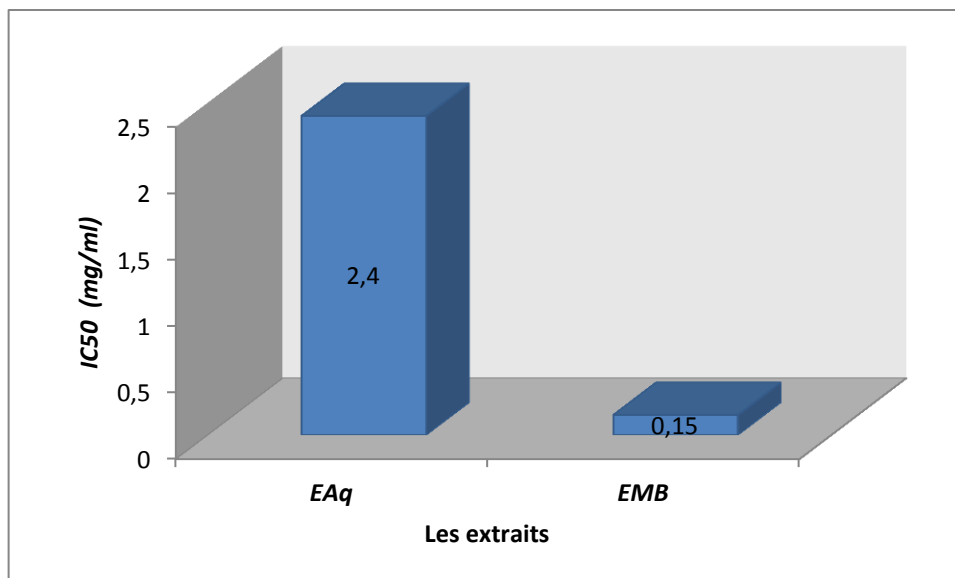


Figure 19: Histogramme représente les concentrations inhibitrices à 50% le radical DPPH des extraits.

L'activité antiradicalaire par la même façon est mesurée pour l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence. Ce dernier a manifesté *in vitro* une capacité très puissante sur le radical libre DPPH, justifiée par la valeur IC₅₀ la plus réduite obtenue expérimentalement par cette méthode (IC₅₀=1,61 µg/ml). Ce standard (ac.ascorbique) demeure le piègeur le plus efficace, dirigé contre les radicaux libres dans les systèmes biologiques hydrosolubles.

A partir de cette figure, nous constatons que les deux extraits d'*Artemisia campestris L* ont exhibé une très forte activité scavenging du radical DPPH comparativement aux pourcentage d'inhibition montré par le standard utilisé : l'acide ascorbique qui a donné une inhibition de 97.01%±0.95% à 100 µg/ml. Aussi nous déduisons que c'est l'extrait méthanolique de la partie aérienne qui a donné le pourcentage le plus élevé parce que c'est l'extrait brut.

Le DPPH est un radical libre stable, accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. Dans cet essai les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphenyl picryl hydrazine, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogène (Ardestani *et al.*, 2007). Le degré de décoloration exprime le potentiel de piégeage de l'antioxydant. Les terpèneoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes et les tannins sont considérés comme des substances potentiellement antioxydantes.

Cependant, la présence de ces substances indique que nos fractions sont dotées d'une activité antioxydante. Les piègeurs les plus efficaces du radical libre DPPH sont ceux possédant les valeurs IC50 les plus basses (Markowicz *et al*, 2007).

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006; Kouri *et al*, 2007). Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet *et al*, 1997). L'effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres, en particulier 3-OH, avec une configuration 3',4'-rthodihydroxy (Heim *et al*, 2002).

5.2. Evaluation de l'activité antihémolytique

Le choix d'étudier l'activité antihémolytique de l'extrait de la plante *Artemisia campestris L* est motivé en raison de son utilisation déclarée en médecine traditionnelle.

Les résultats relatifs de l'effet antihémolytique en fonction de concentration, dans un milieu tampon phosphate saline PBS (0,2 M et Ph 7,4) contenant une suspension érythrocytaire, incubé à 37 °C et en présence des différentes concentrations des deux extraits EMB et EAq (0,5 mg/ml, 1 mg/ml et 2 mg/ml), comparées à un témoin négatif (tube contenant le PBS, solution érythrocytaire et NaCl à 5%), et un témoin positif (tube contenant le PBS, solution érythrocytaire et un médicament antihémolytique) sont représenté dans la (Figure 20)

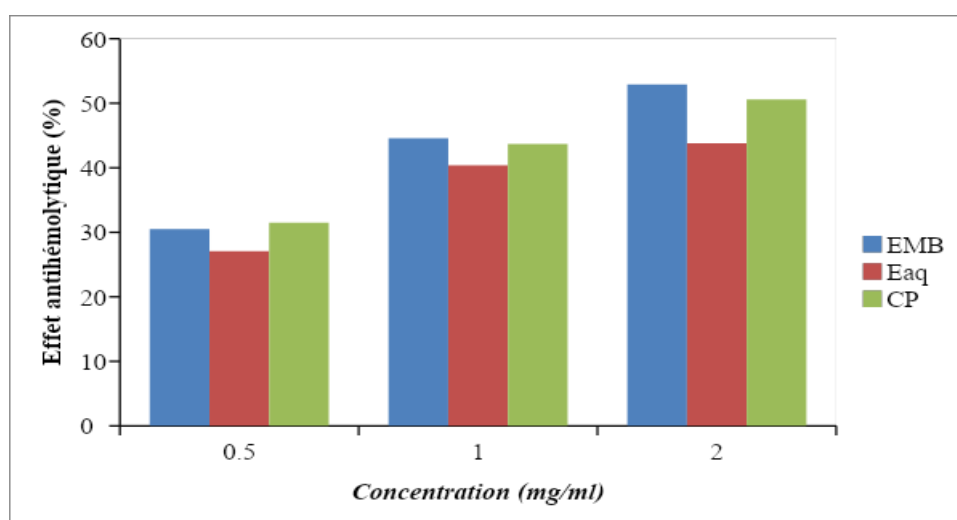


Figure 20: Evolution de l'effet antihémolytique des extraits de l'*Artemisia campestris L* en fonction de leur concentration en comparaison avec le contrôle positif.

Les résultats obtenus (Figure), montrent que les pourcentages d'effets antihémolytiques sont directement proportionnels à l'augmentation des concentrations des extraits. Il est à noter que l'extrait a présenté un effet inhibiteur d'hémolyse par toutes les concentrations étudiées comparable à celui du contrôle positif. A la concentration de 2 mg/ml et, nous avons enregistré un pourcentage d'inhibition d'hémolyse fort pour l'EMB à l'ordre de 52,93 % par rapport au contrôle positif qui donne pour la même concentration un pourcentage d'inhibition à l'ordre de 50,61 % .

Zhang et al. (1997) ont trouvé que l'activité antihémolytique pourrait être attribuée aux flavonoïdes qui possèdent une activité antioxydante importante. Selon une étude menée par Asgary et al. (2005) ; la rutine a entraîné une inhibition de l'hémolyse de 42,5% à une concentration de 10 µg/ml uniquement. De même, ils ont démontré que la quercétine a inhibé l'hémolyse de 35,5% et le kaempférol a inhibé l'hémolyse de 26,9 % à la concentration maximale (10 µg/ml).

Cette activité antihémolytique pourrait être attribuée également aux tannins ; des études ont montré que les tannins ont eu une inhibition très forte de la formation des corps de Heinz, cette même étude a révélé une corrélation élevée entre le pourcentage d'inhibition des corps de Heinz et la concentration en tannins (Chalal et Chibout, 2017).

Nos résultats sont en accord avec les résultats de Zhang A. et al. (1997), Zubair et al. (2013) ; Khenfer et Medjouel (2016) et Chalal et Chibout (2017) où les extraits de plusieurs plantes médicinales étudiées ont montrées des effets antihémolytiques contre les érythrocytes humains. C'est une justification scientifique à l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle contre certaines troubles d'hémolyse.

5.3. Evaluation de l'activité anticoagulante

Le pouvoir anticoagulant d'*Artemisia campestris L* a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie exogène et la voie endogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TQ et le TCK respectivement. Un temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante du matériel testé (Tili, 2015).

5.3.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène a été réalisée à l'aide du test de temps de Quick (TQ), qui explore la voie extrinsèque (VII) et la voie commune (X, V, II, fibrinogène) de la coagulation sanguine où le facteur tissulaire

(thromboplastine) est le déclencheur de cette voie (Manallah, 2012). Les résultats sont présentés dans la (Figure21)

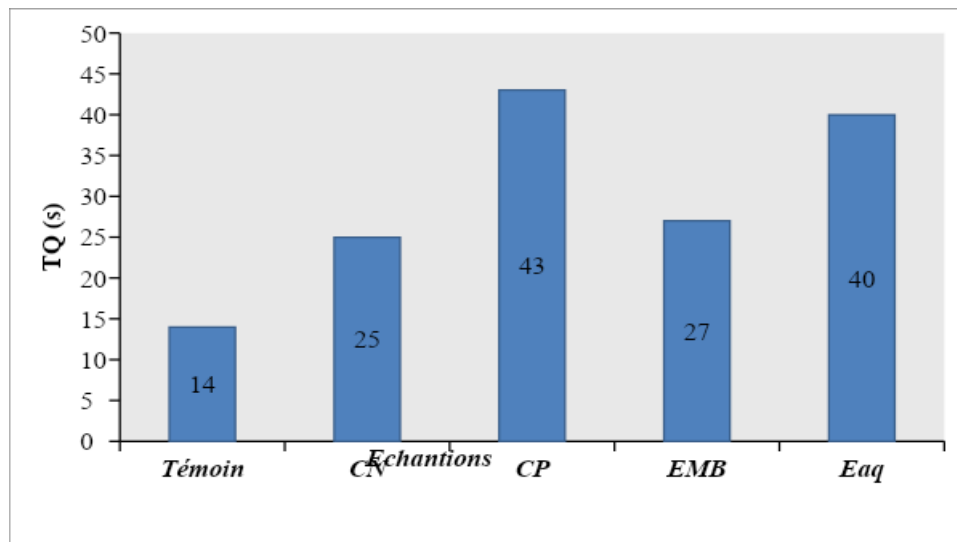


Figure 21 : Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.

La figure présente les résultats de l'activité anticoagulante, on note que les deux extraits donnent un TQ supérieur à celui du control négatif (25s) et du témoin (14) avec des TQ égaux à 27s et 40s pour l'EMB et l'EAQ respectivement. Donc, nos extraits testés ont une activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.

5.3.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène est réalisée à l'aide du test de Temps de céphaline Kaolin (TCK). Cette voie de coagulation est activée par le contact entre le facteur XII et l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif in vivo). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquence l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (Lemaoui, 2011). Les résultats sont représentés dans la fig26

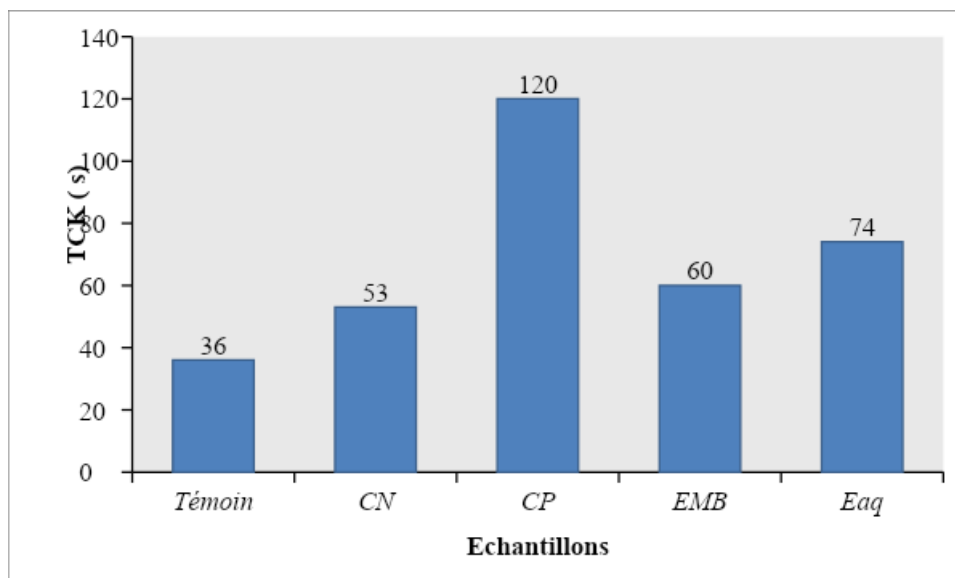


Figure 22 : Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.

A partir de la (**figure22**) Nous avons constaté une valeur à l'ordre de 60s et 74s pour le TCK de l'Eaq et EMB respectivement par rapport à celui de CN à 53s. Donc, les extraits testés ont une bonne activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.

L'évaluation de l'effet anticoagulant des extraits d'*Artemisia campestris L* à l'aide des deux tests (TQ, TCK) a montré que ces extraits ont une importante activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène et exogène par rapport au control positif. Ce dernier est appartient au groupe des héparines exactement les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM) qui forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III qui inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (**Manallah, 2012**).

L'activité anticoagulante d'*Artemisia campestris* est due à sa richesse aux flavonoïdes; ces derniers participent à la prévention des maladies cardiovasculaires; ils inhibent l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, améliorent le fonctionnement de l'endothélium la couche cellulaire et assure le bon fonctionnement du système vasculaire en réduisant les risques d'athérosclérose. De plus, les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes (Manallah, 2012). Il présente un remplaceant d'origine naturelle des anticoagulants utilisés qui sont obtenues par différents procédés chimiques ou enzymatiques (**Zandecki, 2006**).

Conclusion et perspective

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable de principes actifs, *Artemisia campestris L* est l'une de ces plantes, utilisée depuis longtemps à des fins thérapeutiques, mais les études phytochimiques de cette plante restent jusqu'à présent insuffisantes. Dans le présent travail, on s'est intéressé à l'investigation phytochimique et l'exploration *in vitro* d'éventuel effet antioxydant, antihémolytique et anticoagulant de l'extrait méthanolique brut et l'extrait aqueux de la partie aérienne de *cette plante* récoltée de la région de Khenchela, et à la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que:

- ❖ Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires dont nous avons constaté la présence des saponines, des tanins, des alcaloïdes des composés réducteurs et les flavonoïdes surtout de type flavones et flavonones. Ainsi, le criblage des extraits par la CCM a révélé la présence des différentes classes flavonoïques susceptibles d'exprimer les activités recherchées;
- ❖ L'analyse quantitative a dévoilée que l'extrait méthanolique brut est plus riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes par rapport à l'extrait aqueux.
- ❖ Quant à l'activité antioxydante, nous déduisons que les résultats ont montré que l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par les deux extraits avec des IC50 réduites; cela a été en bonne corrélation avec le contenu en flavonoïdes qui constituent des puissants agents antioxydants.
- ❖ L'estimation de l'activité anti-hémolytique *in vitro*, a révélé un pouvoir important pour l'EMB suivis par l'EAq, ce qui permet d'entrer dans une préparation thérapeutique qui sert à la guérison des maladies hémolytiques et son utilité contre les complications des maladies thrombotiques. Par contre, on a démontré un pouvoir anticoagulant puissant caractérisant l'EAq par rapport à l'EMB; cependant, cette activité ne dépend pas à la teneur en flavonoïdes mais plutôt peut être à la nature et la classe de ces métabolites.

Par ailleurs, les résultats de cette étude reste préliminaire et ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, donc, de nombreuses perspectives expérimentales découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies nécessaires concluant plusieurs points à savoir:

- Caractérisation quantitative des flavonoïdes par des méthodes de séparation plus performantes (CLHP, CL/SM, CG/SM...);

- Evaluer et tester ces molécules actives pour d'autres propriétés biologiques *in vivo* dans le cadre d'application pharmacologique et industrielle ;
- Faire une étude comparative avec les autres fractions extraites à partir la même plante.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Aguilar, M (2007)**. H2-Erythrocytes_MB7 : Hématologie H2_Faculté de médecine Montelieu_Nîmes, 12 :78-89.
- **Akrout, A., Chemli, R., Chreif, I., and Hammami, M (2001)**.« Analysis of the essential oil of *Artemisia Campestris L.* » Flavour and Fragrance Journal, 16: 337-339.
- **Akrout A., Gonzalez L.A., El Jani H.J., and Madrid P.C. (2011)**.Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaehirsuta* from southern of Tunisia.*J. Food. Chem. Tox.* **49**: 342–347.
- **Amandine P.D., (2009)** le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 18: 215-220.
- **Ameenah G. F.,(2006)**. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow *Molecular Aspects of Medicine*, 27:1-93.
- **Aniya Y., Shimabukuro M., Shimoji M., Kohatsu M., Gyamfi M.A., and Miyagi C.(2000)**. Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands.*J. Biol. Pharm. Bull.* **23 (3)**:309–312.
- **Ardestani, A., and Yazdanparast, R. (2007)**.Antioxidant and free radical scavenging potential of Achilleasantolina extracts. *Food Chem.* 104: 21-29.
- **ArockM.,Chemla G.,Chemla J-P .,(2008)**.Autoformation et aide au diagnostic en hématologie avec le logiciel ADH ISBN 13:978-2-287-77135-4.
- **Aron P M., Kennedy J A., (2008)**, Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity.*Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1): 79-104.
- **Avissar N., WhitinJ.C., and Allen P.Z. (1989)**. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase.*J. Biol. Chem.* **2**: 15850-15855. Barreto, G.S., 2002. Effect of butanolic fraction of *Desmodium adscendens* on the anococcygeus of the rat.*Braz. J. Biol.* 62, 223–230.
- **Baba aissa, F. (1999)**, Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edas, 11: 368.
- **Bagad, Y.(2011)**. Investigation of anti inflammatory and analgesic activity of *Bridelia airyslawii* (Euphorbiaceae). *J pharm Res.* 4 (5):1326-1332.
- **Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A., Cunha, I. B., Carvalho, P. O., and Eberlin, M. N. (2007)**. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Cameliasinensis*) extracts. *Molecules.* 12(3):423- 432.

- **Beaumont F., Hergaux C., (2005)** .Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques ; régulation par l'hépcidine C. / *Transfusion Clinique et Biologique*.10 : 123–130.
- **Belguitar, M. (2015)**.Les plantesmedicinales de la région de Ksar Chellala, Tiaret. Mem. Master. Université de Tiaret. 11 : 60-64
- **Belhattab R. (2007)**. Composition chimique et activité antioxydante, antifongique etantiaflatoxinogène d'extraits de *Origanumglandulosum*Desfet *Marrubiumvulgare*L(Famille des Lamiaceae). Thèse de Doctorat d'état, UFA-Sétif, Algérie.17 :123-233
- **Beloued, A. (1998)**, Plantes médicinales d'Algérie. Office de Publications Universitaires, 277.
- **Benchelah, A.-C., BOUZIANE, H., et MAKKA, M.(2040)** Fleurs du Sahara, arbres et arbustes,voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie*, 2004, vol. 2, no6, p. 191-197.
- **Benghanou.M.(2009)**.La phytothérapie entre la confiance et Mefiance .Institut de formation paramédical CHETTIA, pp 6-9.
- **Benjamin B, Marc Z.(2006)** Hémolyse et son exploration : Hématologie biologique (Pr Marc Zandecki). Faculté de Médecine – CHU 49000 Angers France .15: 123-125
- **Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., and Aouni M. (2007)**.Investigation of somemedicinalplants from Tunisia for antimicrobial activities.*J.Pharmaco.Bio.* 45 (5):421–428.
- **Benaissa O., (2011)** ; Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'especes de la famille des composées, genres *Chrysanthemum*et *Rhantherium*. *Activité Biologique*, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 11 :60-63
- **Benghanou.M.(2009)**.La phytothérapie entre la confiance et Mefiance .Institut de formation paramédical CHETTIA, pp 6-9.
- **Benmehdi, A. (2001)**. Identification des principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie*. 6: 11-27.
- **Bennick A., (2002)**. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins.*CritRev Oral Biol. Med.* 13 (2):184-196
- **Berger M. M. (2006)**. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état desconnaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 :260-267.
- **Bondet, V., Brand-Williams, W., and Berset, C. (1997)**.Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH.free radical method. *LWT-Food Science and Technology*.30(6) :609 -615

- **Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* sp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*(9), 14:322-325
- **Boulanouar, Bakchiche, ABDELAZIZ, Gherib, AAZZA, Smail, et al. (2013)** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, vol. 46, 16:215-218
- **Brooker, N., Windorski, J., and Bluml, E. (2008).** Halogenated coumarin derivatives as novel seed protectants. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 73(2) :81-9.
- **Bruneton J., (1999) ;** Pharmacognosie, Phytochimie Plantes médicinales 3^{ème} Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
- **Bruneton J ; (2009).** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 4^e Ed : Lavoisier , Paris, P :1269.
- **Caratini R. (1971).** Bordas encyclopedie. Ed Bodas. Belgique. **23**: 137-195
- **Casely-Smith, J. R., R. G. et PILLER, N. B. (1993).** Etude, in vitro, de l'activité anti leishmanienne de certaines plantes médicinales locales : cas de la famille des lamiacées. Thèse du magister en Biologie appliquée : Université de Constantine. 85p
- **Chaabi M., (2008).** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines: *Euphorbia stenocla* Baill. (*Euphorbiaceae*), *Anogeissus lio carpus* Guill. Etperr. (*Combrétaceae*), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (*Plumbaginaceae*). Thèse de doctorat en pharmacochimie, Université, Louis Pasteur et Université MENTOURI de Constantine (Alger): 179, 180.
- **Chahine N., (2014) ;** Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique. Thèse en cotutelle de Docteur en physiopathologie, Université de Reims Champagne-Ardenne et l'Université Libanaise.
- **Chalchat, Jean-Claude, Cabassu, Patrick, Petrovic, S. D., et al. (2003)** Composition of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, vol. 15, no 4, p. 251-253.
- **Chalal F, Chibout M. (2017).** Effet préventif de pathologies hémolytiques liées au stress oxydatif des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Mémoire de Master. Option biochimie physiopathologie. Université A. MIRA, Bejaia. 36 p.
- **Chevalier, A. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales , Identification, Préparation, Soins, Paris, 2^{ème}, 335p
- **Chira K., Suh J.H., Saucier C., Teissèdre P.L., (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6: 75–82.

- **Ciulei, I. (1982).** Practical manuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants, Methodology for analysis of vegetable drugs Ed, ministry of Chemical industry, Bucharest. 67p.
- **Crozier A ; Clifford M.N ; Ashihara H ; (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd. Thèse Présentée Par Mme Belyagoubi Née Benhammou Nabila, vol : 13 :123-126
- **Choe, E. et D. B. Min (2005).** "Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods." Journal of Food Science ,70(9): R142-R159
- **Cowan. M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev, 12(4) ; p :564-582.
- **Cushnie T P T et Lamb A. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26, 343-356.
- **D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R.,(2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanità, 43(4): 348-361.
- **David A., Hervé M. (1994).** Flore de la suisse. Ed Du Griffon Neuchâtel. Suisse.14:426-428.
- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. (2006)** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food chemistry. 97(4):654-660.
- **Djeridane A ., Yousfi M ., Najemi B ., Vidal N ., Lesgards JF ., and Stocker P . (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic Compounds and their antioxidant activity .*Eur. Food Res. Technol.* **224**: 801-809.
- **Djidel, S., Khennouf, S., Baghiani, A., et al.(2009)** Medicinal plants used traditionally in the Algerian folk medicine for gastrointestinal disorders and hypertension: total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity. In : XIII International Conference on Medicinal and Aromatic Plants 854. p. 59-65.
- **Dob T., Dahmane D., Berramdane T., and Chelghoum C. (2005).** Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *J. Pharm. Bio.* **43**(6): 512–514.
- **Donrop A.M., Day N.P., (2007) ;** The treatment of severe malaria. trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 101: 633-634.
- **Dunstan H., Florentine S. K., Calvino-Cancela M., Westbrooke M. E., Palmer G. C., (2013).** Dietary characteristics of Emus (*Dromaius novaehollandiae*) in semi-arid New South

Wales, Australia, and dispersal and germination of ingested seeds. *CSIRO PUBLISHING*, 113: 168-176.

➤ **Edeoga, H. O., Okwu, D. E., and Mbaebie, B. O. (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*. 4(7) :685-688.

➤ **EElbahriet al., (1997)** ; *Artemisia campestris* L : a poisonous plant of north africa. *Vethumantoxicol* 39.

➤ **Favier A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans lacompréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. pp: 108-115.

➤ **Ferchichi, Loubna, Merza, Joumaa, Landreau, Anne, et al. (2006)** Occurrence of isocoumarinic and phenolic derivatives in *Artemisia campestris* L. subsp. *campestris*. *Biochemical systematics and ecology*, vol. 34, no 11, p. 829-832.

➤ **Fetayah, H. (2015).** Étude ethnobotanique des plantes médicinales à effets cardiovasculaires de la daïra de M'sila. Mémoire de master académique : Gestion d'environnement. Université de M'sila. 79 p.

➤ **Ford R A; Hawkins D R; Mayo B C; Api A M., (2001)** The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*. 39 p :153-162.

➤ **Ghedira K (2005).** Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.

➤ **Georgieva, S., Godjevargova, T., Mita, D. G., et al (2011).** Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1) :210 -278.

➤ **Gervaise Y. (2004).** Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. *Polyphénols-Euroforum*.

➤ **Ghliissi, Zohra, Sayari, Nadhim, Kallel, Rim, et al. (2016)** Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous extract in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 84, p. 115-122.

➤ **Guessoum D et Lecheheb H. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes Chez *Urtica dioica* L. Evaluation de leur Pouvoir antibactérien. Mémoire du Master. Option métabolisme secondaire et molécule bioactive. Université des Frères Mentouri-Constantine-Algérie. 46:201-210

➤ **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.

- **Guillaum.M .(2008)** .Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. En vue de l'obtention du Doctorat, spécialité : Pathologie et Nutrition. Université De Toulouse, pp 246.
- **Guillon C, Garçon L, Cynober T, Gauthier F ,Tchernia G, Delaunay J,Leblanc, Thuret I, et Bader-Meunier B.(2008)**Sphérocytose héréditaire :recommandations pour le diagnostic et laprise en charge chez l'enfant. Archives de Pédiatrie. [article in press] .
- **Gutteridge J.M. (1993)**. Free radicals in disease processes: a complication of cause andconsequence. *Free Radic. Res. Commun.* **19**: 141-158.
- **Hamza. K et Meziani. A. (2015)**. Etude de l'activité biologique de l'extrait aqueuxdes feuilles de *Zizyphus lotus L.* Mémoire de master en biochimie moléculaire etsante. Université des Frères Mentouri-Constantine. 13.18 p.
- **Harif M. (2007)**. Hémostase de la physiologie à la pathologie.Editeur Mohamed Harif, p229.
- **Havsteen B. H. (2002)**.The biochemistry and medical significance of the flavonoids.
- **Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. (2002)**. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*.13(10) :572-584
- **Hennebelle T (2006)**. "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." *Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat*: 303.
- **Hopkins, W. (2003)**. Physiologie végétale. 2éme édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris. 514p.
- **Iserin P. (2001)**. Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification,préparation, soins. Dorling Kindersiey Limited, Londres. 334 p.
- **Jacques B, and André R. (2004)**. Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.
- **Joa O.M., Vasconcelos.,Artur M.S.S and Jose A.S.C. (1998)**.Chromones and flavonesfrom*Artemisia campestrisSubspMaritima*. *Phytochemistry*.**49 (5)**: 1421-1424
- **Juteau F., Masotti V., Bessière J-M., Viano J. (2002)**.Compositional characteristics of theessential oil of *Artemisia campestris var. glutinosa*.*Bioch. Syst. Ecol.* (**30**): 1065-1070.
- **Karumi,Y., Onyeyili, P., Ogugbuaja, V. (2004)**. Identification of active principles of M.balsamina (Balsam Apple) leafextract. *J Med Sci.* 4(3):179-182.
- **Koudaly, S ., benemasoud ., left,D .,A. Essaqui, A., zerbouti,M.,AZZI,M ., benaissa,M.(2014)**.Study of antioxidant activity and anticorrosion of the methanol extracts of drawf palmleaves (*chamaeropshumilis L.*) from morocco. 5(3)887-898)

- **Kouri, G., Sierra, B. D. L. C., and Guzman, M. G. (2007).** Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Archives of virology*.30(2) :503 -506.
- **Krief S, (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.
- **Kundan S., and Anupam S. (2010).** The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *J.Pharm. Biol.*pp:1-9.
- **Lefloch, Edouard. (1983).** Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.
- **Lemaoui. A. (2011).** Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*.L. Algérienne. Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas – Sétif. 1. 23. 24. 62.
- **Lombard A., Bajon R.,(2000).Artemisia compitris L.,(1753).** In museum national d'histoire naturelle edition (2006). Conservatoire botanique national du Bassin parisien.
- **Lori, L., Devan, N. (2005).** un guide pratique des plante médicinales : pour les personnes vivant avec le VIH.54p
- **Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., and Kolodziejczyk, P. P. (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*. 69(8):1732-1738.
- **Maataoui, B. S., and Hmyene, A. et Hilali, S. (2006).** Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie *Opuntia ficus indica*. *Lebanese Science Journal*, 7(1):3-8.
- **Macheix J J, Fleuriet A et Jay-Allemand C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses.
- **Mansour, R., Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Marc D. (2013)** Tissu Sanguin : Le Globule Rouge Et Sa Pathologie. Les Principaux Types D'anémies.
- **Marfak A. (2003).** Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. pp: 6-7-10-
- **Markowitz, V. M., Ivanova, N. N., Szeto, E., Palaniappan, K., Chu, K., Dalevi, D., and Lykidis, A. (2007).** IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. *Nucleic acids research*.36(1) :534 -538.
- **Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J.M. et Tuñón M.J. (2002).** Los flavonoïdes: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17:271-278.
- **Masotti, Véronique, de jong, Laetitia, Moreau, Xavier, et al. (2012)** Larvicidal activity of extracts from Artemisia species against *Culex pipiens* L. mosquito:

Comparing endemic versus ubiquitous species for effectiveness. *Comptes rendus biologies*, vol. 335, no 1, p.19-25.

➤ **Matés J M., Pérez-Gómez C., Núñez de Castro I., (1999)**, Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8):595-603.

➤ **Manallah A. (2012)**. Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea L.* Mémoire de Magister. Option biochimie appliquée. Université Farhat Abbas-Sétif-Algérie. 1.15.20.29.30.77. 86 p.

➤ **Mauro N, (2006)**. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine. Thèse de docteur en chimie, université Joseph Fourier Grenoble I: 15-16.p: 13, 16-28

➤ **Mellouk K. (2013)**. Étude des activités antioxydante et antimicrobienne des flavonoïdes et des fractions flavoniques de la partie aérienne de *Pituranthos chloranthus* (Guezze) de la région de Biskra. Mémoire de Master. Option alimentation et nutrition. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen-Algérie. 57 p.

➤ **Memmi A., Sansa G., Rjeibi I., El ayeb M., Srairi-Abid N., Bellasfer Z., and Fekhih A., (2007)** ; Use of medicinal plants against *scorpionic* and *ophidian* venoms. *Arch. Inst. Pasteur. Tunis*. 84 (1-4): 49-55.

➤ **Milane, H. (2004)**. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Université Louis Pasteur (Strasbourg). Thèse de doctorat.

➤ **Mintzer M, Billet Shira N, and Chmielewski L. (2009)** *Drug-induced hematologic syndromes. Advances in hematology* ; p 495-863.

➤ **M. Mucciarelli, R. Caramiello and M. Maffei. (1995)** « *Essential Oils from Some Artemisia Species Growing Spontaneously in North-West Italy* ». *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 10, 25-32.

➤ **Mr. Mohamed Zekkour Né le 12 mai 1982 à Midelt** POUR L'OBTENTION DE DOCTORAT EN PHARMACIE Les risques de la phytothérapie, Monographies des plantes toxiques les plus usuelles au Maroc

➤ **Mohammedi, Z. (2006)**. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105p

➤ **Molyneux P. (2004)**. The use of the stable free radical DiPhenylPicrylHydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin. Journal of Science and Technology*. 26(2). 211 P.

- **Mucciarelli M and Maffei M. (2002).***Artemisia*: Introduction to the Genus Vol. 18 Ed Colin W.W. in Taylor & Francis. Ed. London and New York.pp: 10-16.
- **Mohammedi, Z., (2013).** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie (PhDThesis).
- **Moussaoui B.,(2010) ;** Etude de l'effet de l'extrait de la plante medicinale *Artemisiacampestris* sur les cellules tumorales et son rôle dans la protection du stress oxydatif induit par le cisplatine. Laboratoire de biologie et environnement ; Université de constantine.
- **Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical DiPhenylPicrylHydrazyl(DPPH), for estimating antioxidant activity.Songklanakar in.Journal of Scienceand Technology.26(2). 211 P.
- **Nacz M. et Shahid F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in foods.*Journal of chromatography A*. 1054: 95-111.
- **Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y. (2010).** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris*(Astraceae) and *Ziziphus lotus*(Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* **3**: 79–84.
- **Nkhili Ez-zohra; (2009).** Polyphénols de l'Alimentation , Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Diplôme de Doctorat, Spécialité: Sciences des Aliments, Université Cadi Ayyad, Marrakech Université D'avignon Et Des Pays De Vaucluse Ecole Doctorale 306 – SPSA, Montpellier, p: 378.
- **Niel, H.,(1998).** La procédure de segmentation, dix ans après. IAHS Publ. 267–274.
- **Nonne C. (2007).** Développement et caractérisation d'un modèle de thrombose artérielle mésentérique induite par un rayon laser et évaluation de nouvelles cibles antiplaquettaire. Thèse de doctorat en pharmacologie cellulaire et moléculaire, Université Louis Pasteur Strasbourg I, P 223.
- **Nygren, K., and Van der Poel, S. (2009).**The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology. *Human Reproduction*, 343p.
- **Olivier P, André D, et Dagmar K. (Juin 2010)** fiche technique: 31 Échantillon hémolysé, lipémique, ictérique CSCQ .
- **Oszmianski J., Wojdylo A., Lamer-Zarawska E., Swiader K., (2007).** Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*, 100:579-583
- **Ould el haj.M. (Janvier 2003).** « *Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla* ». Courrier du savoir – N°03, PP. 47-51.

- **Palta S. Saroa R. Palta A. (2014).** Overview of the coagulation system. Indian journal of anaesthesia, pp 515-523.
- **Pavela R.(, 2009) ;** Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). J. Parasitol Res.105: 887-892.
- **Pench L. (2015).** Peut-on prendre le risque hémorragique par le biais d'un interrogatoire médical ? thèse de doctorat en chirurgie dentaire, Université Toulouse III, Faculté de chirurgie dentaire, p 111.
- **Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu une réalité pour le médecin Vaisseaux Coeur, Poumons.
- **Pereira MS. Mulloy B. Mourao PA. (1999).** Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans :comparaison between the regular, repetitive and linear fucan from echinoderms with the more heterogenous and branched polymers from brown algae. Journal of Biological chemistry, pp 7657-7667
- **Poblocka-Olech, L ,Glód, D , Żebrowska, M E , Sznitowska, M , and Krauze-Baranowska, M. (2016).** TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum*. *Actapharmaceutica*, 66(4) :543-554.
- **Power, SK ., smuder, AJ.,Kvarisan, H.(2010)** .experimentale guide line for studies designed investgate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance international journal of sport nutrition and exercise metabolism , 20 :12-14)
- **Rahman, I., (2002).** Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr. Drug Targets-Inflamm. Allergy* 1, 291–315
- **Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards k. et Lavee S. (2002).** Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176.
- **Salhi, S., Fadli, M., Zidane, L. & Douira, A. (2010)** .Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa* 31: 133-146p
- **Saoudi M., Allagui M.S., Abdelmouleh A., Jamoussi K., and El Feki A. (2010).** Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp. Tox. Pathol.* 62:601–605.
- **Sarni-Manchado P, Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Techniques et Documentations, Lavoisier Paris, 300-398.
- **Schauenberg, P., Paris ,F.(1997)** .Guide des plantes médicinales : analyse , description et utilisation de 400 plantes .Paris : Delachaux et Niestlé ,396p.

- **Sefi M., Fetoui H., Makni M., and Najiba Zeghal N., (2010)** ; Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Food.Chem.Toxicol.*48: 1986–1993.
- **Simpson. M. G. (2010)** Plant Systematics, Second Edition, Academic Press is an imprint of Elsevier.428-432.
- **Sell. P, Murrell. G. (2005)** Flora of Great Britain and Ireland.Department of Plant Sciences.University of Cambridge.62-63.
- **Srang, C. (2006).** Larousse médicale.Larousse.1144p
- **Subhash.C, Mandal. M. (2015)** Essentials of Botanical Extraction Principles and Applications.Academic Press is an imprint of Elsevier.63-71.
- **Sun, J., Yao, J., Huang, S., Long, X., Wang, J., García-García, E.,(2009).** Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsuracoccinea* (Lem.) AC Smith. *Food Chem.* 117, 276–281.
- **Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., and Gebre-Mariam, T. (2005).**Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of ethnopharmacology.* 100(1):168-175.
- **Tawaha K., Alali F., Gharaibeh M., Mohammad M. et El-Elimat T. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104:1372–1378.
- **Thomas, L. (2013).**Haemolysis as influence and interference factor.eJIFCCvol 13no 4.
- **Tsimogiannis, D., Stavrakaki, M., and Oreopoulou, V. (2006).**Isolation and characterisation of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*).*International journal of food science and technology.*41(4) :207-210.
- **Turrens, J. F. (2003).**Mitochondrial formation of reactive oxygen species.*The Journal of physiology.*552(2) : 335-344.
- **Verheugt Fwa. Weitz JI. (2012).** General Mechanism of coagulation and targets of anticoagulant.ThrombHaemos ,pp 569-579.
- **Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., Nieminen, R., Hämäläinen, M., Galkin, A., Laitinen, L., Salminen, J., Moilanen, E., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., and Heinonen, M. (2005).**Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*53(15) :5922-5931.
- **Wagner, H., Bladt, S. (1996).** Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science and Business Media. 384p.
- **Wardman, P. et L. P. Candeias (1996).** "Fenton chemistry: An introduction." *Radiation Research*,

- **Watson, Linda E., Bates, Paul L., Evans, Timothy M., et al. (2002).** Molecular phylogeny of subtribe Artemisiinae (Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *BMC evolutionary Biology*, 2002, vol. 2, no 1, p. 17.
- **Wichtl, M., Anton, R. (2003)** .Plantes thérapeutiques : Tradition, Pratique officinale, Science et thérapeutique. 2^{ème} édition .Paris : TEC & DOC, 692p.
- **Wichtl, M., Anton, R. (2009).** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris. Pp 38-41.
- **Wink. M. (2010)** Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites.
- Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 1-17.
- **Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., and Chen, F. (2006).** Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. 12:120 -130.
- **Yang X, Li J, Li X, She R. et Pei Y. (2005).** Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. *Peptides*. 27. 3122 p.
- **Yezza S., & Bouchama S., (2013)** ; Index des métabolites secondaires végétaux.
- **Yrjönen, T. (2004).** Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products .Dissertationes, Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis. Pp 32-64.
- **Zeghad N., (2008).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire en chimie organique, Université Mentouri Constantine (Alger): 96.
- **Zeghad N., (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, p2.

➤ **Web références**

- 1- www.pharmacorama.com.
- 2- <https://www.passeportsante.net>
- 3- <https://douleurs-musculaires.ooreka.fr>
- 4- <http://www.mediterranean.htm>.

Annexe

ANNEXE 01 : médicament



Lovenox 200UI



Dycynone

ANNEXE 02: Appareillage



Chambre UV



Rotavapor



Spectrophotomètre



bain marie

ANNEXE 03 : Préparation du tampon phosphate

Phosphate baffle saline (PBS) est une solution isotonique et non toxique utilisée couramment en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate dipotassique et de chlorure de potassium. Il

est utilisé pour lavage ou dilution des cellules.

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

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

Dissoudre les composants dans 1000ml de l'eau distillé, en agitant jusqu'il s'homogénéise à l'aide d'un agitateur et conservé à 4°C dans des fioles propre au réfrigérateur, jusqu'au moment de l'utilisation. Il ne faut pas congeler, surchauffés, conditionner dans des fioles présentant une fissure ...etc.

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

Noms et prénoms : Sabeg Khawla Tamrabet Khaoula	Date de soutenance : 07/07/2019
Master Académique en : Biochimie Appliquée	
<p align="center">Contribution à l'exploration phytochimique et l'évaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques d'une plante médicinale locale «<i>Artemisia campestris L</i> »</p>	
<p align="center">Résumé</p> <p>Dans le but de valoriser les plantes médicinales Algérienne, nous sommes intéressés dans cette étude d'une part, à la caractérisation qualitative et quantitative des extraits aqueux et méthanolique brut d'une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle récoltée de la région de Khenchela (<i>Artemisia campestris L</i>), et d'autre part, à la détermination des activités biologiques.</p> <p>Le screening phytochimique réalisé a permis de mettre en évidence la présence des saponines, des tanins, des alcaloïdes des composés réducteurs et les flavonoïdes surtout de type flavones et flavonones. Ainsi, l'étude qualitative par CCM des extraits a révélé une diversité remarquable des composés flavonoïques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.</p> <p>L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalcu et par la méthode du trichlorure d'aluminium respectivement, a dévoilé la richesse de l'extrait méthanolique brut par rapport à l'aqueux en polyphénols et flavonoïdes avec des teneurs égaux à $60,72 \pm 3,1 \mu\text{g EAG/mg}$ et $40,22 \pm 4,6 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.</p> <p>L'activité antioxydante obtenue a été évaluée <i>in vitro</i> via le test de piégeage de radical libre DPPH: cependant, l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par l'EMB avec une IC50 égale à $0,15 \text{mg/ml}$ suivi par l'EAq avec IC50 égale à $2,4 \text{mg/ml}$.</p> <p>. L'activité antihémolytique et anticoagulante ont été avéré intéressantes pour les deux extraits notamment l'EMB.</p> <p>Les activités biologiques obtenues ont été dépendantes et en bonne corrélation avec la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes qui constituent des puissants agents antioxydants.</p> <p>En conclusion; <i>Artemisia campestris L</i> est doué d'une activité antioxydante, antihémolytique et anticoagulante remarquables. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle afin d'atténuer les complications du stress oxydant associé ou déclenchant des maladies cardiovasculaires.</p>	
<p>Mots clés : Activité anticoagulante, Activité antihémolytique, Activité antioxydante, <i>Artemisia campestris L</i>, Flavonoïdes.</p>	