

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



Université Abbès Laghrou-Khenchela

Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de biologie moléculaire et cellulaire



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Master Académique
OPTION : biochimie appliquée

Détermination de l'activité biologique de la plante *Artemisia Campestris*

Thème

Présenté par :

M^{elle} AZZEDINE Abir

M^{elle} KHIARI Noussaïba

Soutenu le : / /2020

Membres du jury :

Président :	Dr. BOUAZZA Lyas	Université AbbèsLaghrou-Khenchela
Encadreur:	Dr. BOUFENNARA Souhil	Université AbbèsLaghrou-Khenchela
Examineur:	Mr. RAHAL Khalid	Université AbbèsLaghrou-Khenchela

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements



Au nom d'Allah le plus grand, lui revient mes vifs remerciements de nous avoir guidées vers le droit chemin, de nous avoir aidées tout au long de nos années d'étude.

Beaucoup de gens ont soutenu nos efforts, nous tenons à les remercier pour leurs aides, leurs soutiens et participations.

Nous tenons à remercier notre encadreur, le Dr. BOUFENNARA Souhil pour les orientations et les encouragements précisément quand nous en avons le plus besoin et sans lui il n'aurait été presque impossible de produire le présent travail.

Nous remercions le Dr. BOUAZZA Iyas d'avoir accepté de juger mon travail en tant que président

Nous remercions le Dr. RAHAL Khaled d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Enfin, nos plus sincères remerciements vont spécialement à nos très chers parents, ainsi qu'à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à toute personne qui de loin ou de près nous a aidées.

Dédicace

**Avant tout, je remercie « ALLAH » le tout grand et le tout puissant
Pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur et de
m'avoir donné la volonté, la patience et le courage
Pour terminer mes études universitaires et réaliser ce travail qui est le
fruit de plusieurs années**

Je dédie ce mémoire à ma chère famille :

**À mes très chers parents qui m'ont donné un magnifique modèle de
labeur et de persévérance**

**L'espoir de ma vie et la lumière de minuits: ma mère beya et bien sûre
ma source de courage et de générosité aussi pour ses conseils et son
sacrifice mon père Mahiou**

À mon marie : Boutamine Hamza

À mes très chers frères : Driss, Abderrahmane, Moncef

A mestrèschère soeurs: Khawla, Asma

À toute ma grande famille "Khiari et Boutamine"

À ma promotion de Master II Biochimie 2019-2020

À mes chères amies : mounira,Afiffa,Abir

K.Noussaiba

Dédicace

**Avant tout, je remercie « ALLAH » le tout grand et le tout puissant
Pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur et de
m'avoir donné la volonté, la patience et le courage
Pour terminer mes études universitaires et réaliser ce travail qui est le
fruit de plusieurs années**

Je dédie ce mémoire à ma chère famille :

**À mes très chers parents qui m'ont donné un magnifique modèle de
labeur et de persévérance**

**L'espoir de ma vie et la lumière de minuits: ma mère Chemama et bien
sur ma source de courage et de générosité aussi pour ses conseils et
son sacrifice mon père Tahar**

À mes chers frères : Azzeddine Abbed nour Aymen

A ma chère soeur :Azzeddine Silia

À toute ma grande famille "Azzeddine"

À ma promotion de Master II Biochimie 2019-2020

**À mes chères amies : Saliha, Nadia, mabrouka, Nissrine, Zahia, Nahla,
Noussaiba ,Kamilia, Nadjet , Rima, Mouna, Meriem, Khawla, Rabiaa
,Houda, Soundousse, Mounira ,Hanane.....**

À tous qui me connaisse de près ou de loin : Azzeddine Abir

A cause de la pandémie mondiale Covid-19 survenue en début de l'année 2020 et les décisions administratives émanant de notre université prise en mois de mars 2020, nous étions dans l'impossibilité matérielle et sanitaire de réaliser la partie pratique attendue de ce travail. Aussi et afin d'enrichir ce document, nous avons sélectionné quelques résultats obtenus par certains chercheurs et ce dans une optique d'aboutir à une discussion intéressante et un contenu riche scientifiquement. Tous les résultats mentionnés dans ce mémoire concernent des travaux d'auteurs disponibles dans la littérature.

Résumé

Artemisia campestris est une plante médicinale appartenant à la famille des Astéracées. Cette espèce connue sous le nom de « Tgouft », est très répandue dans le sud algérien. Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant trois solvants: chloroforme, acétate d'éthyle et l'éthanol.

Les rendements respectifs sont : 3.4% (m/m), 2.26% (m/m) et 0.48% (m/m). La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 178 - 91 et 102 mg EAC/g Ps dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$ et leur teneur était de 16.88 ; 19.47 et 21.33 mg EQ/g dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement.

Les flavonols sont estimées par une autre méthode utilisant $AlCl_3$. Leur teneur est de 31.13 ; 36.86 et 12.70 mg EQ/g dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement.

L'activité antioxydante de certains auteurs a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes: la technique de blanchissement du β -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH. Pour le premier test, il a été estimé à 76,68% ; 89,32% ; 80,97% pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol respectivement.

Le second test $L'CI_{50}$ (concentration inhibitrice à 50%) a été estimé à 105.76 ; 100.20 ; 68.10 μ g/ml pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol respectivement. La valeur de $L'CI_{50}$ du témoin positif BHA affiche une valeur de 51.17 μ g/ml.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disque. La concentration minimale inhibitrice (CMI) manifestée par les trois extraits sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia Coli* est de 1.8 mg/ml et 0.5 mg/ml respectivement. Sur *Proteus mirabilis*, les résultats trouvés étaient de 0.75 mg/ml et 1.5 mg/ml pour les extraits de chloroforme et de l'acétate d'éthyle respectivement.

Mots-clés : Asteraceae, *Artemisia campestris*, extraits organiques, activité antioxydante, Activité antimicrobienne.

ABSTRACT:

Artemisia campestris a medicinal plant belonging to the Asteraceae family, this species known as « Tgouft » is very widespread in the south of Algeria. Organic extracts were obtained by maceration with three solvents: chloroform, ethyl acetate and ethanol. The yields were: 3.4% (w/w), 2.26% (w/w) and 0.48% (w/w) respectively. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent, it was: 178- 91–102 mg CAE/g for the chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts respectively. The flavonoid contents was determined using a method AlCl₃, it were respectively: 16.88; 19.47; 21.33 mg QE/g in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts respectively.

The flavonols contents were respectively: 31.13; 36.86; 12.70 mg QE/g in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts respectively.

Antioxidant activity was evaluated using two different methods: β -carotene bleaching method and Free radical scavenging effects of the free radical DPPH.

In former test, the percentage of inhibition was 76,68% - 89,32% and 80,97% for the chloroform, ethyl acetate and ethanol extracts respectively, whereas in the latter, the IC₅₀ estimated for extracts was: 105.76 – 100.20 – 68.10 μ g/ml in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts, this effect seems to be weak when compared to BHA (IC₅₀ = 51.17 μ g/ml).

Antimicrobial activity was determined using four bacterial strains according to the disk diffusion assay; the minimal inhibitory concentration (MIC) was 1.8 mg/ml and 0.5mg/ml for the three solvents when tested on *Staphylococcus aureus* and *E.coli* respectively, and was 0.75 mg/ml and 1.5mg/ml for chloroform and ethylacetate extracts when tested against *Proteus mirabilis*.

Keywords: Asteraceae, *Artemisia campestris*, organic extracts, antioxidant activity, Antimicrobial activity

المخلص:

يعرف نبات *Artemisiacampestris* بأنه نبتة طبية تنتمي إلى عائلة *Asteraceae*، تنتشر هذه النبتة المعروفة باسم "تقوفت" بصفة خاصة في منطقة الجنوب الجزائري. تم الحصول على المستخلصات العضوية بواسطة النقع و ذلك باستعمال ثلاث مذيبات عضوية: الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول فكان المرودود (m/m) 2.26%، (m/m) 3.4%، (m/m) 0.48% على الترتيب. تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي في المستخلصات باستعمال طريقة كاشف- Folin.

Ciocalteu كانت النتائج كما يلي: 102-91-178 mg EAC/g Ps في مستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. تم تقدير الفلافونويدات باستعمال طريقة AICI3. كان تركيز هذه الأخيرة : 16.88-19.47-21.33 mg EQ/g Ps في مستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. بينما قدرت الفلافونولات باستعمال طريقة أخرى تعتمد كذلك AICI3 وقد كان تركيزها كما يلي: 12.70-36.86-31.13 mg EQ/g Ps في مستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. قدرت النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال طريقتين مختلفتين: اختبار ابيضاض ال β -carotène وتقنية إرجاع الجذر الحر DPPH. أظهرت نتائج الاختبار الأول أن قيمة النشاطية كانت كما يلي : 80.97%، 89.32%، 76.68% بالنسبة لمستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب، بينما قيمتها كانت للشاهد الموجب BHT = 99.94%. أما فيم يخص الاختبار الثاني كانت م IC50 للمستخلصات كما يلي: 68.10-100.20-105.76 µg/ml بالنسبة لمستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. أما بالنسبة للشاهد الموجب BHA كانت = IC50 51.17 µg/ml حددت النشاطية المضادة للميكروبات والتركيز الأدنى للتثبيط لأربعة سلالات بكتيرية بطريقة الأقراص فكانت النتائج كما يلي: التركيز الأدنى للتثبيط (CMI) لسلالتي كل من *E.Coli*, *Staphylococcus aureus*، قدر بـ: 1.8mg/ml – 0.5mg/ml، أما بالنسبة لسلالة *Proteus mirabilis* كانت قيمتها 1.5-0.75 mg/ml لمستخلصي كل من الكلوروفوم و اسيتات الايثيل على الترتيب.

كلمات مفتاحية: *Artemisiacampestris*، المستخلصات العضوية، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للميكروبات.

Liste des Figures

Liste des Figures

N° figure	Titre	Page
1	<i>Artemisia campestris</i> L. (Chema, 2006)	4
2	Structure de base des flavonoïdes (Di Carlo et al., 1999).	9
3	Structure de base des flavone (Giulia et al., 1999)	10
4	Structure de base des flavonol (Giulia et al., 1999)	10
5	Structure de base des flavanones (Giulia et al., 1999)	10
6	Structure de base des flavanol (Giulia et al., 1999)	10
7	Structure de base des chalcones (Giulia et al., 1999)	11
8	Structure de base des anthocyanidines (Giulia et al., 1999)	11
9	Piégage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (Marfak, 2003).	12
10	Classification des tanins (Wilfred et Ralph., 2006).	14
11	Extraction par les solvants organiques de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> . (Boudjouref, 2011)	24
12	Droite d'étalonnage des polyphénols totaux des extraits (Boudjouref, 2011).	36
13	Evaluation des polyphénols totaux des extraits (Boudjouref, 2011).	36
14	Droite d'étalonnage des flavonoïdes des extraits (Boudjouref, 2011).	37
15	Evaluation des flavonoïdes des extraits (Boudjouref, 2011).	37
16	Droite d'étalonnage des flavonols des extraits (Boudjouref, 2011).	37
17	Evaluation des flavonols des extraits (Boudjouref, 2011).	38
18	Diamètre des halos oranges en présence de différentes concentrations d'extraits (Boudjouref, 2011). Fig. 18.1: Extrait d'acétate d'éthyle (Boudjouref, 2011). Fig. 18.2: Extrait de chloroforme (Boudjouref, 2011). Fig. 18.3: Extrait d'éthanol (Boudjouref, 2011).	39
19	Diamètre des halos orange en présence des témoins positifs (BHT et Quercétine) et témoin négatif (méthanol) (Boudjouref, 2011).	40
20	Cinétique de l'inhibition de blanchissement du β -carotène par extraits d' <i>Artemisia campestris</i> et du témoin positif BHT (Boudjouref, 2011).	41
21	Activité antioxydante des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> (Boudjouref, 2011)	43

Liste des Figures

	(1): l'extrait chloroformique (2): l'extrait de l'acétate d'éthyle (3): l'extrait de l'éthanol	
22	Activité antioxydante du standard BHA (Boudjouref, 2011).	44

Liste des Tableaux

Liste des Tableaux

N° Tableau	Titre	Page
1	Systématique de la plant Caratini (1971)	4
2	Teneur en polyphénols, de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> (Djeridane et al 2007).	5
3	Principaux flavonoïdes rencontrés chez <i>Artemisia campestris</i> (Valant et al., 2003).	6
4	Aspect, couleur et rendement de différents extraits d' <i>Artemisia campestris</i> (Boudjouref, 2011)	33
5	Criblage phyto chimique d' <i>Artemisia Campestris</i> (Boudjouref, 2011).	33
6	Intensité de la couleur des halos autour des puits (Boudjouref, 2011).	40
7	L'activité antioxydante des extraits bruts et du témoin positif et négatif (Boudjouref, 2011).	41
8	Valeurs des CI50 des extraits bruts et témoin déterminées par le test au DPPH (Boudjouref, 2011).	44
9	Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques(diamètre de la zone d'inhibition en mm) (Boudjouref, 2011).	45
10	Activité antibactérienne des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> exprimée en concentration minimale inhibitrice (mg/ml). (Boudjouref, 2011).	46

Liste D'abréviation

Liste D'abréviation

Abréviation	Nom d'abréviation
AMP	Adenosine monophosphate
AA	L'activité antioxydante des extraits
Abs	absorbance
AMX	Amoxicilline
Ac	Amoxicilline Clavulanique
ATM	Aztreonam
ABTS	2,2 azinobis-3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonic acid
Abs	absorbance
BHT	Butylated hydroxtoluène
BHA	Butylated hydroxyanisole
CG-MS	la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
Cu	cuivre
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CFS	Cefsulodine
CI50	Concentration inhibitrice à 50%.
CN	Gentamycine
DMSO	Diméthyl sulfoxyde.
DPPH	2,2-diphenyl-1-1- picrylhydrazyl
Mg EQ/g Ps	Milligramme d'équivalent quercétine par gramme du poids sec de la plante.
Mg EAC/g Ps	Milligramme d'équivalent acide caféique par gramme du poids sec de la plante.
FEP	Céfépime
FOS	Fosfomycine
GPx	la glutathion peroxydase
g	gramme
HCL	l'acide chlorhydrique
H2O2	Peroxyde d'hydrogène.
h	heures
IPM	Imipénème
K	Kanamycine
LDL	Low density lipoprotein.

Liste D'abréviation

ME	poids en gramme de l'extrait sec
MV	poids en gramme de la poudre végétale utilisée.
Mg	magnésium
min	minutes
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO.	Nitric oxide
nm	nanomètre
ONOO	Peroxynitrite
OX	Oxacilline
*OH	Radical hydroxyle.
P	Pénicilline
PIP	Pipéracilline
R	rendement par rapport au poids de la matière végétale utilisée
SOD	Superoxyde dismutase
s	secondes
TE	:Tetracycline
TIC	Ticacilline
ITC	Ticarcilline
Zn	zinc
*₂	Radical superoxide.

Sommaire

Sommaire

REMERCIEMENT

DEDICACE

RESUME

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....1

CHAPITRE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUES

I- LA PLANTE : ARTEMISIA CAMPESTRIS..... 3

I-1 GENERALITE 3

I-2 NOM VERNACULAIRES 3

I-3 DESCRIPTION BOTANIQUE..... 3

I-4 SYSTEMATIQUE DE LA PLANT..... 4

I-5 ORIGINE ET DISTRIBUTION 4

I-6 COMPOSITION CHIMIQUE 5

I-7 L'UTILISATION TRADITIONNELLE D'ARTEMISIA CAMPESTRIS..... 6

I-8 ACTIVITES BIOLOGIQUES 6

A - Activité antioxydante 6

B - activité antibactérienne..... 7

C - Effets insecticide 7

D - Propriétés allélopathiques 8

E - Activité hypoglycémiant..... 8

II-LES METABOLITES SECONDAIRES..... 8

II-1-LES POLYPHENOLS..... 8

II-1-1- Les flavonoïdes..... 8

II-1-1-1- Structure et classification..... 9

II-1-1-2- Localisation et distribution 9

II-1-1-3- Les principales classes de flavonoïdes 9

A- Les favones et les flavonols 10

B - Les flavanones et les dihydroflavonols 10

C- Les chalcones..... 11

D- Les anthocyanidines 11

II-1-1-4- Activités biologiques des flavonoïdes 11

A-Activité antioxydante 11

B -Activité antibactérienne 12

C -Effets anti-allergiques 13

D - Autres activités des flavonoïdes 13

Sommaire

II-1-2- Les tanins	13
II-1-2-1-Localisation et distribution	13
II-1-2-2- Classification	13
A -Tanins hydrolysables	14
A -1-Tanins galliques (Gallo tanins)	14
A -2- Tanins ellagiques (Ellagitanins)	14
B -Tanins condensés	14
II-1-2-3- Utilisation des tanins	14
En pharmacie	15
Dans l'industrie	15
III- LE STRESS OXYDATIF	15
III-1- DEFINITION	15
III-2- LES RADICAUX LIBRES	15
III-3- LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	15
III-3-1- Le radical superoxyde	15
III-3-2- Le radical hydroxyle.....	16
III-3-3- Le peroxyde d'hydrogène.....	16
III-4- LES CONSEQUENCES MOLECULAIRES DU STRESS OXYDATIF	16
III-4-1- L'oxydation de l'ADN	17
III-4-2- L'oxydation des protéines	17
III-4-3-L'oxydation des lipides	17
A - L'initiation.....	17
B - La stabilisation.....	17
C - La propagation.....	18
D - La terminaison	18
III-5- LES ANTIOXYDANTS	18
III-5-1-Les antioxydants endogènes	18
III-5-1-1- La superoxyde dismutase	18
III-5-1-2- La catalase	18
IV- ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	19
IV-1- GENERALITES	19
IV-2- CULTURE DES BACTERIES	19
IV-3- LES ANTIBIOTIQUES.....	19
Classification des antibiotiques	20
IV-4- ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DES PLANTES	20
IV- 5- DESCRIPTION DES BACTERIES ETUDIEES	20
A - Escherichia coli	20
b- Staphylococcus aureus	21
c- Pseudomonas aeruginosa	21

Sommaire

Chapitre II Matériels et Méthodes

I-1- MATERIELS ET METHODES	23
I-1-1 Matériel végétal.....	23
I-1-2 Matériel de laboratoire	23
I-1-3. Méthodes d'analyse.....	23
I-1-3. 1. Extraction par les solvants.....	23
a. Détermination du rendement	24
b. Etude phytochimique	25
Analyses qualitatives	25
a. Détection des phénols	25
b. Détection des flavonoïdes	25
c. Détection des tanins	25
d. Détection des saponines.....	25
Analyses quantitative.....	25
a-Dosage des polyphénols totaux	25
- Principe:.....	25
- Mode opératoire.....	26
b. Dosage des flavonoïdes	26
a-Mode opératoire	26
I-4-TESTS DES ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	26
I-4-1- Test de l'activité antioxydante.....	26
a- Mise en évidence de l'activité antioxydante	27
Principe:	27
Mode opératoire:.....	27
b- Test de blanchissement du β -carotène.....	27
Principe:	27
Mode opératoire:.....	27
c- Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH.....	28
Principe:	28
Mode opératoire:.....	28
I-4-2-Test de l'activité antimicrobienne.....	29
a- Conservation des souches.....	29
b- Les milieux de culture	29
c- Préparation de précultures	29
d- Tests anti microbiens.....	29
Application:.....	30

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

I- RESULTATS ET DISCUSSION.....	32
INTRODUCTION :	32
I-1- EXTRACTION	32
I-1-2 Analyse chimique qualitative	33
I-1-3-Analyse chimique quantitative.....	34

Sommaire

I-1-3-1- Dosage des polyphénols totaux.....	34
I-1-3-2-Dosage des flavonoïdes.....	34
I-1-3-3-Dosage des flavonols	34
I-2- - RESULTATS DES TESTS BIOLOGIQUES	38
I-2-1-- Activité anti-oxydante	38
a- Test visuel de décoloration du β -carotène.....	38
b- Méthode de blanchissement du β -carotène (BCB).....	40
c- Méthode de réduction du radical libre DPPH.....	42
I- ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....	45
A- SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES (ANTIBIOGRAMME)	45
CONCLUSION.....	49
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51

Introduction générale

Une étude réalisée par l'organisation mondiale de la santé a révélé qu'environ 80% de la population mondiale utilisent des médicaments non conventionnels, en particulier les plantes dans leurs soins de santé primaires (**Chan, 2003**). Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de médicaments futurs (**Maurice, 1997**).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al. 1996**).

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits organiques de la partie aérienne de la plante *Artemisia campestris*, connue en Algérie sous le nom de Dgouft. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour traiter les maladies digestives, cutanées et respiratoires.

Chpiatre I:
Etudes Bibliographiques

I- La plante : *Artemisia campestris*

I-1 Généralité

Le genre *Artemisia* est considéré l'un des genres les plus grands et les plus largement distribués de la famille des Astéracées (Compositae). C'est un genre hétérogène, composé de plus de 500 espèces diverses réparties principalement dans les zones tempérées d'Europe, d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Nord. Ces espèces sont pérennes, herbes bi annuelles et annuelles ou petits arbustes (Watson et al, 2002; Mehrdad et al, 2007).

Dans la flore de l'Algérie, ce genre est représenté par 11 espèces spontanées parmi lesquelles se trouve *Artemisia campestris* communément appelées "dgouft" (Quezelet Santa, 1963).

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

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques. Elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mirjalili et al., 2007).

I-2 Nom vernaculaires

✚ **En Français:** Armoise champêtre, Auronne-des-champs.

✚ **En Arabe:** Taguq, tguft, degoufet, tadjouq, tedjok, alala, hellala, tamemmayt, um nefsa (Benchelah et al., 2004; Boudjelal et al., 2013; Boulanouar et al., 2013; Djidel et al., 2009; Ferchichi et al., 2006; Gast, 1989; Hammiche and Maiza, 2006).

✚ **Nom scientifique :** *Artemisia campestris* L (Quezel et Santa, 1963).

I-3 Description botanique

Artemisia campestris est une sous-arbrisseau vivace, qui peut atteindre 30-150cm de hauteur, avec des tiges ramifiées et ascendantes et forme panicule. Elle est généralement brunâtre-rouge et glabre, et acquiert une forme lignifiée dans la partie inférieure et un en haut (Chalchat et al., 2003, Quezel et Santa, 1962). Les feuilles sont vertes, serres lorsqu'elles sont jeunes, souvent glabres à maturité. Les feuilles basales sont 2-3 pinnatisect, pétiolées ou même auriculées et les parties supérieures sont les plus simples (Chalchat et al 2003, Quezel et Santa, 1962).

La plante a une inflorescence composée: le capitulum, ovoïde et hétérogame, contenant 8 à 12 fleurs, organisé sur un réceptacle convexe et glabre, et entouré de bractées glabres involucrales organisées en plusieurs rangs. Les fleurs du rayon sont femelles, pistillées et fertiles, tandis que les fleurs en disque sont stériles et fonctionnellement mâles

avec des ovaires avortés réduits (Chalchat et al., 2003, Gillet et Magne, 1863, Ouyahya, 1990, Quezelet Santa, 1962).

Les fleurs mâles sont tubulaires, jaunâtres, dépourvues de calice, de pétales fuselés et d'étamines de 5 fusées, avec la présence de sacs sécrétoires sur les lobes de la corolle des fleurs du disque (Minami et al 2010). Le fruit est un akène ovoïde dépourvu de pappus (Kreitschitz et Vallés, 2007).



Figure 1 : *Artemisia campestris* L. (Chema, 2006)

I-4 Systématique de la plante: 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	<i>Artemisia campestris</i> L.

I-5 Origine et distribution

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, en particulier sur la cote 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 est utilisée dans des boissons alcoolisées en parfumerie et dans une gamme d'applications alimentaires (Mucciarelli. M et al., 1995).

I-6 Composition chimique

L'utilisation des solvants à polarité différente, suivie par des étapes de fractionnements et l'emploi de différentes techniques de chromatographie permettent d'extraire, séparer et identifier les différents composés présents dans les extraits de plantes.

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).

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré (Bruneton, 1999). Elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, hauteur, direction du vent, heures de soleil, etc.), et selon la phase de développement de la plante (Jerkovic et al., 2003).

Plusieurs études (Akrouit et al., 2001 ; Juteau et al., 2002) ont rapporté la composition des huiles essentielles d'*Artemisia campestris*. L'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS). Juteau et al. (2002) ont identifié dans une espèce de Camargue (Marseille, France) 51 composés et caractérisés, les plus abondants sont : γ -terpinène, capillène, 1-phenyl-2,4-pentadiène, spathulenol, méthyleugenol, p-cymène et β -pinène.

D'après Akrouit et al. (2001) les constituants les plus abondants d'une espèce de Tunisie sont : β -pinène (24,2-27,9 %), p-cymène (17,4–22,3%) et α -pinène (4,1–11,0%), ces constituants représentent plus de 45 % de l'huile totale.

Le contenu phénolique total, les flavonoïdes, les dérivés hydroxy cinnamiques, les dérivés hydrox benzoïques de l'extrait éthanolique (80%) de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques (Tab.2) (Djeridane et al 2007).

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apégénine), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Tab.3) (Valant et al., 2003). Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, des saponines. (Naili et al., 2010).

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

Plante	Phénols totaux ^a	Flavonoïdes b	Dérivés hydrox cinnamiques c	Dérivés hydrox benzoïques d
<i>Artemisia Campestris</i>	103.4	5	95	0

a: mg EAG/g ps, **b :** mg EQ(m/m), **c :** EAC (m/m), **d :** EAG (m/m).

Mg EQ/g Ps: Milligramme d'équivalent quercétine par gramme du poids sec de la plante.

FEP: Céfépime

Mg EAC/g Ps : Milligramme d'équivalent acide caféique par gramme du poids sec de la plante.

Tab.3: Principaux flavonoïdes rencontrés chez *Artemisia campestris*

Flavonoïdes	Références
Flavanone: 5, 8, 4'-trihydroxyflavanone. - Acétophénone: 3-acetyl-4-hydroxyacétophénone. - Flavones: 5, 7-dihydroxy-3, 4'-diméthoxyflavone. - Flavonol: Kaempférol-7méthyl. - Dihydroflavonol: 7-méthyl aromadendrin.	- Rauter et al .,1989. - Hurabielle et al .,1982. - Ferchichi et al .,2006. -Valant-V et al .,2003. - Hurabielle et al .,1982.

I -7 L'utilisation traditionnelle d'*Artemisia campestris*

Artemisia campestris est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies traditionnelle grâce à ses propriétés bactéricides, antifongiques, anti inflammatoires, antihelminthiques, anti venins et analgésiques (**Carvalho et al, 2011 ; Ghilissi 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 des serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme. Elle est également utilisée pour traiter les infections urinaires, la fièvre la toux Et les problèmes menstruels (**Ben Sassi et al, 2007 ; Dob et al, 2005**).

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 (**Sijelmassi A., 1993, Le Floc'h, 1983**).

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

I -8 Activités biologiques

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

A - Activité antioxydante

La partie aérienne d'*Artemisia campestris* possède des activités antioxydantes significatives.

En effet cette plante est riche en composés doués d'activité antioxydante tels que: les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins, ces différents constituants 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**).

Dans une étude faite par **Aniya et al (2000)**, l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*Artemisia 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.

De leur côté **Akrout et al (2011)** ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique 50%) 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-éthyl benzthiazoline-6-sulphonique 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.

B - activité antibactérienne

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 négatif (*Escherichia coli*).

Ben Sassi et al (2007) ont étudié l'activité antibactérienne de quatre extraits organiques (méthanol, acétate éthyle, 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*, et *S. saprophyticus*, *S. aureus*.

En outre *Artemisia campestris* possède des propriétés antifongiques. **Kyeong et ses collaborateurs (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 campestris* et il est considéré comme une drogue antimalariale très efficace contre le parasite qui cause la malaria: *Plasmodium falciparum* (**Donrop et Day., 2007**).

L'artémésinine possède également plusieurs activités et il est efficace contre les maladies infectieuses telles que l'hépatite B (**Rmoero et al., 2005**).

C - Effets insecticide

Une étude a été réalisée par **Pavela (2009)**, où l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été testé pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique (*Culex quinquefasciatus*). Cet extrait a montré un degré

derépulsion très intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria.

D - Propriétés allélopathiques

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**).

E - Activité hypoglycémiant

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

II-Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes. Ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (**Lutge et al.,2002; Abderrazak et Joël., 2007**).

II-1-Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (**Bruneton, 1999 ; Lugasi et al .,2003**).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Lugasi et al .,2003**).

Les principales classes de composés phénoliques sont: les acides phénoliques (acidecaféique, acide hydroxy cinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (**King et Young., 1999 ;Tapiero et al., 2002**). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot et Charpentier., 2006**).

II-1-1- Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Seyoum et al.,2006**). Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits

et parfois des feuilles. L'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem *et al.*,2001; Bruneton, 1999).

Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams.,2000).

II-1-1-1- Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyrane (Skerget *et al.*,2005). Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Dacosta, 2003).

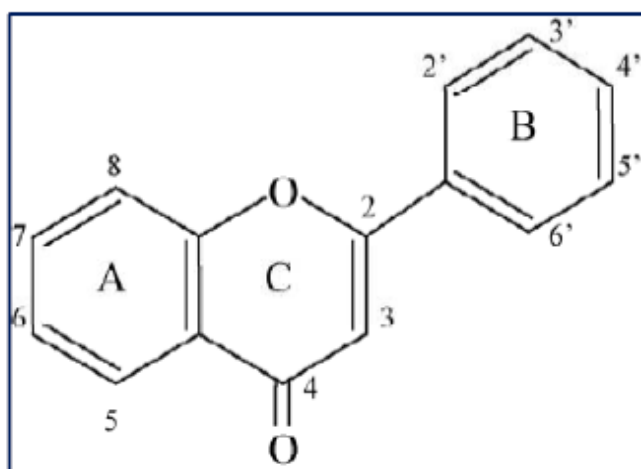


Fig. 2: Structure de base des flavonoïdes (Di Carlo *et al.*,1999).

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose. Ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003). Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins (Effendi *et al.*,2008).

II-1-1-2- Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal et ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plante (Medic *et al.*,2003).

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (Bruneton, 1999).

II-1-1-3- Les principales classes de flavonoïdes

A- Les favones et les flavonols

Les favones et les flavonols représentent la majorité des flavonoïdes connus, dans plus de 90% des cas. Chez ces molécules le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques En C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. D'autres substitutions peuvent intervenir avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-6 et/ou en C-8, isoprénylation ou méthylation en C-6 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre.

Les principales flavones sont l'apéginine et la lutéoline, alors que les principaux flavonols sont la quercétine, kaempférol, et la myricétine (**Bruneton, 1999**).

B - Les flavanones et les dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Ces flavonoïdes semblent un peu moins fréquents que leurs homologues insaturés rassemblant les flavones et flavonols.

La principale flavanone est la naringénine, alors que la dihydroflavonols la plus rencontré est la catéchine (**Bruneton, 1999**).

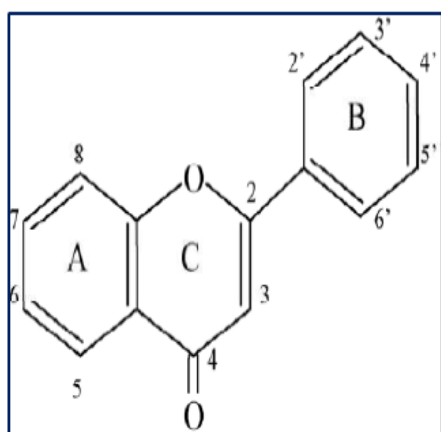


Fig. 3: Structure de base des flavone

(Giulia et al., 1999)

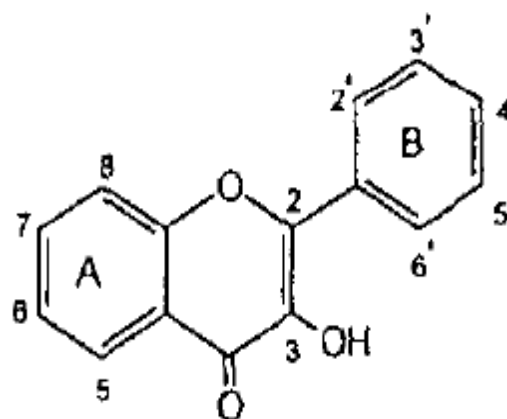


Fig. 4: Structure de base des flavonol

(Giulia et al., 1999)

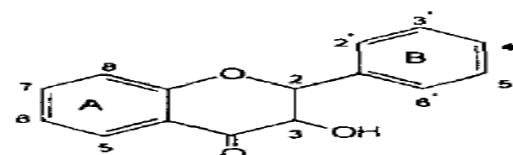
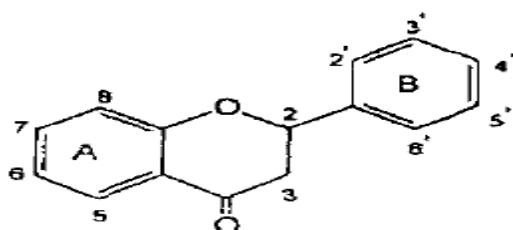


Fig. 5: Structure de base des flavanones **Fig. 6:** Structure de base des flavanol (Giulia et al., 1999)

C- Les chalcones

Les chalcones, dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique, α,β -insaturé. Si les substitutions sur le noyau A sont le plus souvent identiques à celle des autres flavonoïdes, le noyau B est assez fréquemment non substitué. Pour ce type de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes. Les chalcones les plus importants sont: la butéine et la phlorétine (Bruneton, 1999).

D- Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont toujours hydroxylés en position 3 (Fig. 7). Elles se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle à la position 4. Les anthocyanidines les plus abondants sont: la pélagonidine, la cyanidine et la péonidine (Bruneton, 1999).

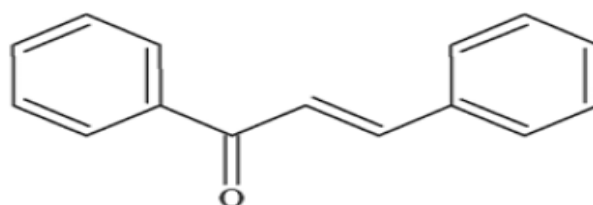


Fig. 7: Structure de base des chalcones (Giulia et al., 1999)

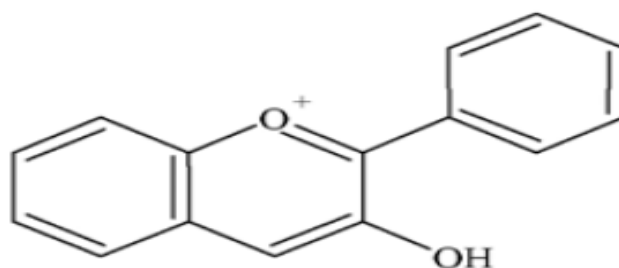


Fig. 8: Structure de base des anthocyanidines (Giulia et al., 1999)

II-1-1-4- Activités biologiques des flavonoïdes

A-Activité antioxydante

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques. Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels (Fuhrman et al., 1995).

L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001).

À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (FL-o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable (Jovanovic et al., 1994).

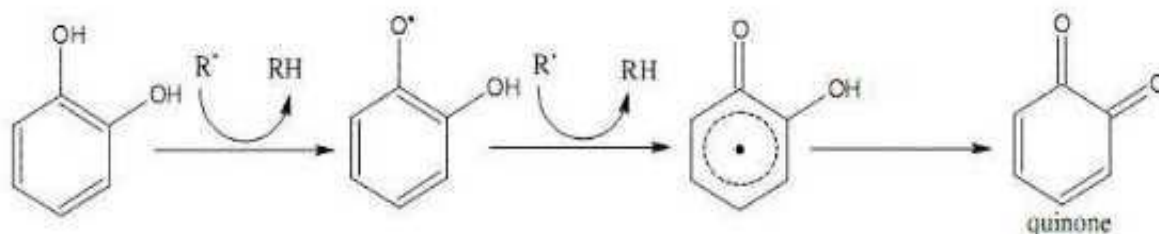
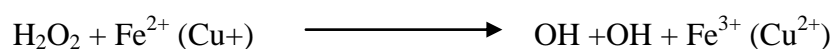


Fig. 9: Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (Marfak, 2003).

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown, 1998 ; Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu⁺) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



B -Activité antibactérienne

Il a été rapporté que les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont possédé une activité antimicrobienne (Tim et al., 2005).

Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams., 2000).

De nombreuses études ont rapporté les activités antimicrobiennes des flavonoïdes. (Haraguchi et al., 1998 ; Iinuma et al., 1994 ; Iniesta et al., 1990). De même ces propriétés détectées chez la propolis, sont attribuées à leur teneur élevée en flavonoïdes, en particulier le galangin et le pinocembrin (Tim et al., 2005).

L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie, une étude faite sur *Dianthus caryophyllus* a montré l'efficacité de flavonoïde glycoside, sur des souches fongiques (Galeotti et al., 2008).

Récemment des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Mahmoud et al., 1993).

Le mécanisme d'action de polyphénols est sans doute très complexe, parmi les hypothèses avancées:

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- La séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer,
- L'inhibition du métabolisme microbien (**Mila et Scalbert., 1994**).

C -Effets antiallergiques

Les effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, ces deux dernières sont responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles.

Di Carlo (1999) a étudié les effets antiallergiques de la quercétine. Il a trouvé que ce flavonoïde exerce ses effets en inactivant l'enzyme ATPase Ca²⁺-dépendante, de même l'action de la quercétine est supérieure à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament antihistaminique.

D - Autres activités des flavonoïdes

À côté des activités citées précédemment, les flavonoïdes possèdent d'autres activités. En effet, les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire

(**Middleton et Elliott., 1996**) et ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (**Mookerjee et al., 1986 ; Namgoong et al., 1994**).

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (**Chaudhry, 1983**). Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (**Ong et Khoo., 2000**).

II-1-2- Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau. Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (**Paris et Hurabielle., 1981**).

II-1-2-1-Localisation et distribution

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les Rosacées (**Ghestermet al., 2001**).

Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (**Khanbabae et Ree., 2001**).

II-1-2-2- Classification

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 1999**).

A -Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques (**Paris et Hurabielle.,1981**).

A -1-Tanins galliques (Gallo tanins)

Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

A -2- Tanins ellagiques (Ellagitanins)

Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (**Paris et Hurabielle., 1981**).

B -Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine (**Khanbabaea et Ree., 2001**).

Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (**Paris et Hurabielle., 1981**).

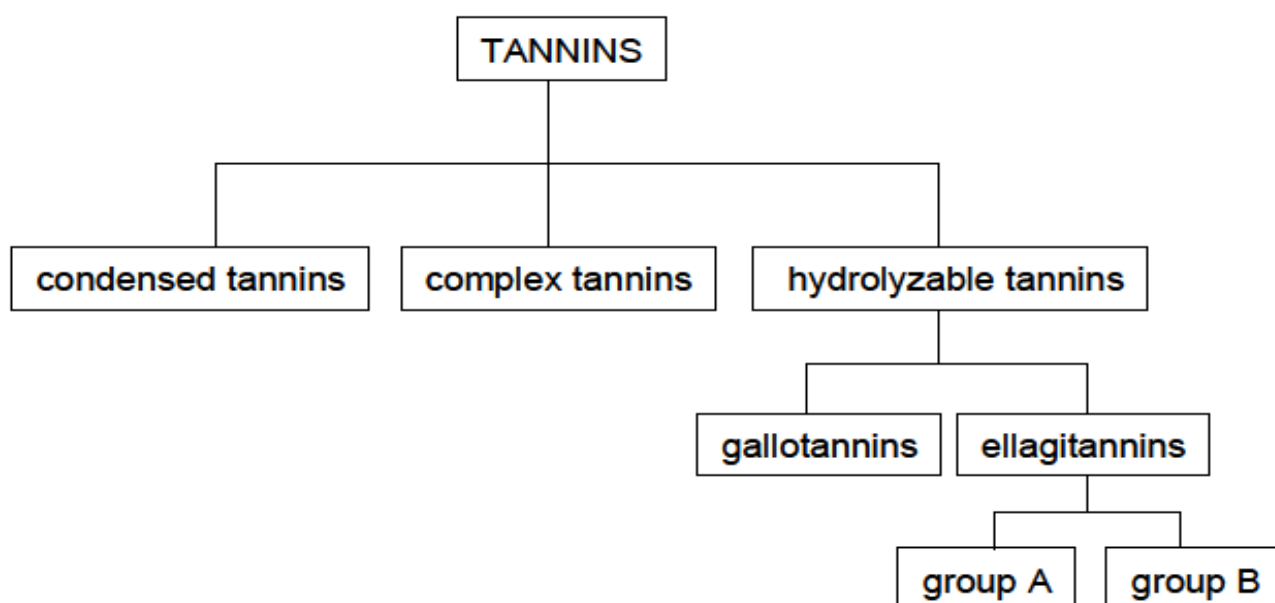


Fig. 10: Classification des tanins (**Wilfred et Ralph., 2006**).

II-1-2-3- Utilisation des tanins**En pharmacie**

Grâce à leurs astringente les tanins sont utilisés comme antidiarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes (**Paris et Hurabielle., 1981**).

Dans l'industrie

Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et peintures (**Paris et Hurabielle., 1981**).

III- Le stress oxydatif**III-1- Définition**

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (**Boyd et al.,2003**).

III-2- Les radicaux libres

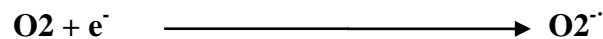
Un radical libre est définies comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (**Jacques et André., 2004**). Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaine débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (**Martinez-Cayuela, 1995**).

III-3- Les espèces réactives de l'oxygène

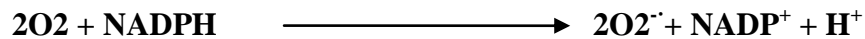
Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) (**Jacques et André, 2004 ; Gutteridge,1993**).

III-3-1- Le radical superoxyde

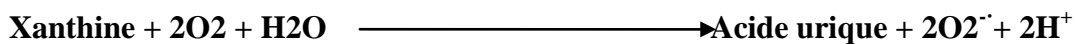
L'origine principale du radical superoxyde est sans conteste la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, ce système permet la production du radical superoxyde par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial:

cytochrome oxydase

Le radical superoxyde peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes :

NADPH oxydase

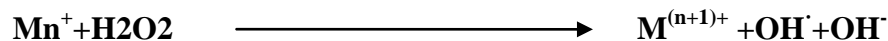
Une autre source possible est la xanthine oxydase. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique.

Xanthine oxydase

Le radical superoxyde est peu réactif, mais il entre comme agent oxydant dans la majorité Des réactions (Marfak, 2003 ; Antwerpen, 2006).

III-3-2- Le radical hydroxyle

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

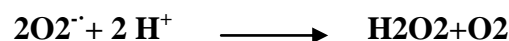


Le fer peut également catalyser la transformation de l'anion superoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène avec production de radical hydroxyle selon la réaction dite Haber-Weiss. Cette réaction est relativement lente et moins courante que la précédente dans les tissus vivants (Jacques et André., 2004).

Fe

**III-3-3- Le peroxyde d'hydrogène**

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



Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante (Jacques et André., 2004).

III-4- Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Favier, 2003**). Les principales cibles radicalaires sont:

III-4-1- L'oxydation de l'ADN

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN protéines (**Krippeit- Drews et al.,1994**). L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases. Ce qui donne naissance à un grand nombre de bases modifiées.

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. Les radicaux libres peuvent aussi attaquer les protéines qui sont très nombreuses à entrer en bcontact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines. Comme ils peuvent attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (**Favier, 2003 ; Rehman et al.,1999**).

III-4-2- L'oxydation des protéines

L'action des radicaux libres a lieu sur les chaînes latérales de certains acides aminés comme le thiol des cystéines. A proximité des sites de liaison d'ions métalliques peuvent se dérouler des réactions d'oxydation qui produisent des acides aminés anormaux.

Les radicaux libres sont également responsables de la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport) (**Jacques et André., 2004**).

III-4-3-L'oxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique se déroule en plusieurs étapes:

A - L'initiation

Dans cette étape un acide gras polyinsaturé est attaqué au niveau d'un carbone situé entre deux doubles liaisons par un radical hydroxyle avec arrachement d'un atome d'hydrogène qui laisse un électron non apparié. L'acide gras subira alors une suite de réarrangements des doubles liaisons (**Jacques et André., 2004**).

B - La stabilisation

Dans l'étape de la stabilisation, il se produit une formation d'un diène conjugué RO₂* par coordination avec une molécule d'oxygène (Jacques et André., 2004).

C - La propagation

Les alkoxy et peroxy-radicaux propagent l'oxydation par l'intermédiaire de RO₂* (Jacques et André., 2004).

D - La terminaison

Les hydroperoxydes subissent plusieurs transformations, ils sont soit réduits par la glutathion peroxydase, soit ils l'oxydation continue et dans ce cas ils se fragmentent en aldéhydes toxiques. Cette réaction en chaîne se termine soit par l'intervention d'un composé antioxydant, soit par l'interaction de deux radicaux pour former une molécule stable (Jacques et André., 2004 ; Hennebelle et al., 2004).

III-5- Les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (Favier, 2003).

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

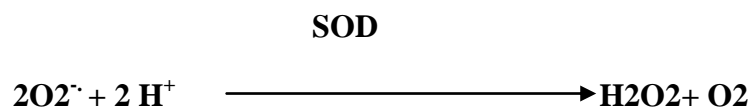
III-5-1- Les antioxydants endogènes

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).

III-5-1-1- La superoxyde dismutase

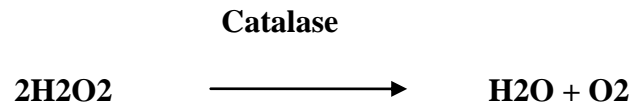
La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation et elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène.

Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (CuZnSOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (MnSOD) (Jacques et André., 2004).



III-5-1-2- 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**).



IV- Activité antimicrobienne

IV-1- Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car Ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea).

Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria. Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μm . On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique. (**Nauciel et Vildé., 2005**).

IV-2- Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C.

En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'oeil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.).

L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (**Nauciel et Vildé., 2005**).

IV-3- Les antibiotiques

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des

champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) (**Elghozi et Duval., 1992**).

Classification des antibiotiques

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques. Elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière est la plus fréquemment rencontrée. Les principales familles chimiques des antibiotiques sont:

Bêtalactamines: pénicilline et céphalosporines; Aminosides: streptomycine, gentamycine; Chloramphénicol et thiamphénicol; Cyclines: tétracyclines, doxycycline, érythromycine, oléandomycine (**Cohen et Jacquot., 2001**).

IV-4- Activité antimicrobienne des extraits des plantes

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons).

Ces résistances ont conduits à chercher de nouveau agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) (**García-Ruiz et al., 2008 ; Kempf et Zeitouni., 2009**).

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenouil (*Foeniculum vulgare*), menthe (*Mentha piperita*), thym (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (**Jürgen et al., 2009**). D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative et la thérapie naturelle (**Huang et al., 2008**).

IV- 5- Description des bactéries étudiées

A - *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif (**Patrick et al., 1988**), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (**Steven et al., 2004**).

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

D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (Patrick et al.,1988).

b- Staphylococcus aureus

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule.

De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (Patrick et al.,1988). *S. aureus* est responsable de la méningite, ostéomyélite et la diarrhée (Steven et al.,2004).

c- Pseudomonas aeruginosa

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 µm de long et 0.5 à 0.8 µm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire mono triche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron » *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéroplastés. Elle est responsable de 10% de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3 ème rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le premier rang pour les infections pulmonaires basses et le troisième rang pour les infections urinaires (Richard et Kiredjian., 1995).

Chapitre II:
Matériels et méthodes

I-1- Matériels et méthodes**I-1-1 Matériel végétal**

La plante d'*Artemisia campestris* a été collectée au mois de novembre dans deux régions: de Boussaâda (wilaya de Msila) et Oum el-bouaghi.

La partie aérienne de la plante est nettoyée ensuite séchée à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante pendant quinze jours. Puis conservées dans des sacs en papier jusqu'à l'utilisation.

I-1-2 Matériel de laboratoire

- Spectrophotomètre (spectronic20genesys TM).
- Etuve.
- Rotavapeur (Büchi).
- Balance de précision.
- Agitateur.
- Autoclave.

I-1-3. Méthodes d'analyse**I-1-3. 1. Extraction par les solvants**

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération successive par 4 solvants organiques de polarité croissante. Il s'agit du d'éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, et de l'éthanol.

La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale à extraire.

Dans notre cas la macération est faite avec 50 g de la plante dans 200 ml d'éther de pétrole pendant 24 heures. Après filtration sur la bande à gaze et ensuite sur un papier filtre, puis une deuxième macération a été réalisée

Le marc est ensuite macéré par 150 ml de chloroforme pendant 24 heures avec un maximum d'agitation. Après filtration sur un papier filtre, le filtrat est récupéré entièrement.

L'opération est répétée une seconde fois sur le marc. Les filtrats sont recombines puis évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI" à une température de 40 à 50 °C.

Le matériel végétal est ensuite soumis à une autre extraction dans les mêmes conditions mais avec d'autres solvants, il s'agit de l'acétate d'éthyle et de l'éthanol.

Cette série d'extraction a permis d'obtenir trois extraits organiques bruts: extrait de chloroforme (Chl), extrait d'acétate d'éthyle (AcEt), extrait d'éthanol (EtOH), qui seront récupérés dans des flacons en verre puis conservés à 4° C jusqu'à utilisation.

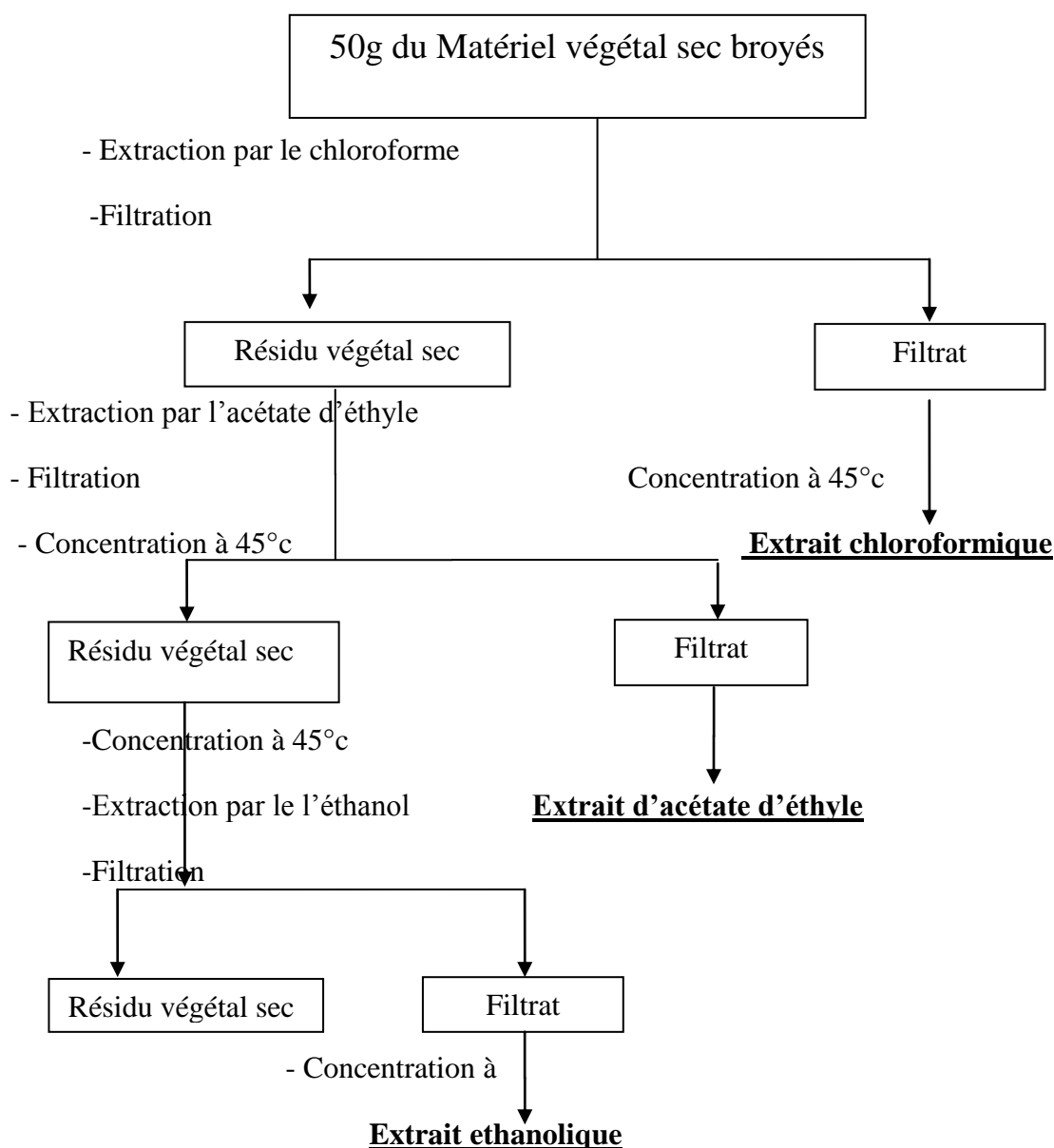


Fig. 11: Extraction par les solvants organiques de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*. (Boudjouref, 2011)

a. Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

$$R(\%) = \frac{ME}{MV} \times 100$$

ME : poids en gramme de l'extrait sec.

MV : poids en gramme de la poudre végétale utilisée.

R : rendement par rapport au poids de la matière végétale utilisée

b. Etude phytochimique

Dans le but de caractériser les extraits d'*Artemisia campestris*, des analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées.

Analyses qualitatives

Les analyses qualitatives permettent de mettre en évidence la présence de quelque groupes chimiques (alcaloïdes , flavonoïdes , tanins , saponosides) dans les extraits (**Akrout, 2005**) .

a. Détection des phénols

Un volume de 0.5 ml d'extrait est introduit dans un tube à essai à lequel est ajouté 3 ou 4 gouttes de FeCl₃ à (5%). L'apparition de la coloration, bleu noire indique la présence des phénols (**Martinez , 2003**) .

b. Détection des flavonoïdes

La réaction effectuée à partir de 5 ml d'extrait placé dans un tube puis 1ml de l'acidechlorhydrique (HCL) et 0.5 g de magnésium (Mg) sont ajoutés. L'apparition de la coloration rose, orange ou rouge indique la présence des flavonoïdes (**Malec et Pomilio , 2003**).

c. Détection des tanins

La réaction effectuée à partir de 1 ml d'extrait placé dans un tube dans lequel est ajouté un volume de 1ml de l'eau distillée puis quelques gouttes de FeCl₃ (1%). L'apparition d'une coloration vert ou bleu vert indique la présence des tanins (**Karumi et al., 2004**) .

d. Détection des saponines

Pour les saponines, 10 ml d'extrait est introduit dans un tube à essai puis le tube est agité fortement pendant 15 secondes puis laissés au repos pendant 15 min .

Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence de saponines (**Banga et al., 2011**) .

Analyses quantitatives

Des déterminations quantitatives des principaux groupes de métabolites secondaires ont été effectuées sur les extraits d'*Artemisia campestris* .

a-Dosage des polyphénols totaux

- Principe:

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène.

L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et charpentier, 2006).

- Mode opératoire

Un volume de 200 µl de la solution d'extraits avec des concentrations bien déterminées sont ajoutés à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 4 min d'incubation, un volume de 800 µl de carbonates de sodium (Na₂CO₃, 7.5%) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière puis la lecture est faite à 765 nm.

L'acide gallique est utilisé comme standard (0-200 µg/ml) pour établir la courbe d'étalonnage.

Toutes les opérations sont réalisées en trois tests. La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage. Elle est exprimée en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µgEAG /mgd'extrait)

b. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes est effectuée en suivant la méthode de chlorure d'aluminium (CHANG et al., 2002).

a-Mode opératoire

1 ml d'extrait d'*Artemisia campestris* est introduit dans un tube à essai et 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium (AlCl₃ à 2 %) est ajouté.

Après 15 min d'incubation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, les absorbances sont mesurées par un spectrophotomètre à 430 nm.

Toutes les manipulations sont répétées 3 fois. La même opération est effectuée pour la quercétine à différentes concentrations.

La teneur en flavonoïdes est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage en utilisant la quercétine comme standard.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ /mg d'extrait).

I-4-Tests des activités biologiques

I-4-1- Test de l'activité antioxydante

a- Mise en évidence de l'activité antioxydante**Principe:**

Dans le test du β -carotène l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, et des hydroperoxy des conjugués (**Kaur et Kapoor., 2002**). Ces radicaux vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé, ce qui entraîne la perte de ses doubles liaisons et par conséquent la disparition de sa couleur rouge. Cependant la présence d'un antioxydant (extraits, témoins positif) permet de neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc la prévention de l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (**Yanishlieva et al., 1995 ; Belhattab, 2007 ; Yang et al., 2008**).

Mode opératoire:

On introduit 1.125 g d'agar dans un erlenmeyer auquel est ajoutée 150 ml d'eau distillée.

Après chauffage sur une plaque chauffante, la solution est refroidie à 50°C avant d'ajouter une émulsion de β -carotène / acide linoléique préalablement préparée par solubilisation de 7.5 mg de β -carotène dans 7.5 ml d'acétone et de 7.5 μ l d'acide linoléique dans 1,5 ml de méthanol .

L'émulsion résultante est vigoureusement agitée à froid, puis distribuée dans des boîtes de pétri. À l'intérieur des puits creusés dans la gélose, 30 μ l d'extrait ou de témoin sont déposés. La lecture se fait après 4-5 heures d'incubation à 45°C (**Belhattab, 2007**).

Le Butylated hydroxtoluène (BHT) est utilisé comme témoin positif.

b- Test de blanchissement du β -carotène**Principe:**

L'activité antioxydante de trois extraits d'*Artemisia campestris* est mesurée selon la méthode de **Tepe et al (2005)**. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

Mode opératoire:

La méthode décrite par **Tepe et al (2005)** a été employée avec une légère modification. Une émulsion β -carotène / acide linoléique préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, a été additionnée de 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40.

Après évaporation complète du chloroforme au rotavapeur, 100 ml d'eau saturée en oxygène sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

Dans des tubes à essai 2,5 ml du mélange précédant sont additionnés de 350 µl d'extrait puis incubés à l'obscurité à la température du laboratoire.

Deux tubes contrôles ont été aussi préparés avec la même procédure: l'un contenant un antioxydant de référence BHT (témoin positif) et l'autre sans antioxydant (témoin négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 µl de méthanol.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures.

L'activité antioxydante des extraits (AA %) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AA \%} = \frac{\text{Abs 48h (échantillon)}}{\text{Abs 48h (BHT)}} \times 100$$

AA : L'activité antioxydante des extraits

Abs : Abs : absorbance

BHT:Butylated hydroxtoluène

c- Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH

Principe:

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où: (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Brand-William et al., 1995).

Mode opératoire:

1ml de solution méthanolique de DPPH (8%) est ajouté à 1ml de la solution d'extraits. Le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes.

Le blanc est représenté par le méthanol, Le témoin négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol, Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard: le BHA.

La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 515 nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité antiradicalaire} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne de trois mesures séparées \pm écart type .

La Concentration inhibitrice à 50% (CI50). a été déterminée pour chaque extrait. Elle est définie comme étant la concentration qui donne la diminution de la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 48 heures d'incubation (**Wan et al.,1998 ; Canillac et Mourey, 2001**).

I-4-2-Test de l'activité antimicrobienne

Les souches utilisées pour déceler l'activité antibactérienne des extraits d'*Artemisia campestris* font partie de quatre genres de microorganismes, dont trois sont des souches référentielles de l'American Type Culture Collection (ATCC). Il s'agit de: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), la quatrième souche, *Proteus mirabilis*, est une souche clinique isolée de patients hospitalisés (**au centre hospitalier universitaire de Batna (CHU)**).

a- Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

b- Les milieux de culture

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants par (Boudjouref,2011).

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits d'*Artemisia campestris* .

c- Préparation de précultures

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.5 McFarland et été préparées, pour chaque microorganisme, dans 5 ml d'eau distillée stérile.

d- Tests anti microbiens

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de la plante, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme) , celle-ci permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait.

Application :

Des disques de papier filtres stériles Whatmann de 6 millimètres de diamètre sont imprégnés de différentes solutions des extraits préalablement dissouts dans le diméthylsulfoxy de (DMSO).

À l'aide d'une pince stérile les disques sont déposés à la surface d'un milieu ensemencé (étalé) par une suspension microbienne d'une densité optique de 0.5 McFarland. Après diffusion, les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (**Choi et al.,2006**).

Les tests ont été répétés trois fois et des disques imprégnés de DMSO et d'éthanol sont aussi utilisés (témoins négatifs).

Chapitre III:
Résultats et discussion

I- Résultats et discussion

Introduction :

A cause de la pandémie mondiale Covid-19 survenue en début de l'année 2020 et les décisions administratives émanant de notre université prise en mois de mars 2020, nous étions dans l'impossibilité matérielle et sanitaire de réaliser la partie pratique attendue de ce travail. Aussi et afin d'enrichir ce document, nous avons sélectionné quelques résultats obtenus par d'autres auteurs et ce dans une optique d'aboutir à une discussion intéressante et un contenu riche scientifiquement.

Artemisia campestris est une plante médicinale de la famille des Astéracées (composés), elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter les troubles digestives, la diarrhée, l'arthumatisme,...etc.

Des études de certains auteurs et notamment de nombreuses études phyto chimiques de cette espèce (**De Pascual et al .,1984 ; Rauter et al ., 1989 ; Joao et al .,1998 ; Akrou et al., 2001,Boufennara, 2012**) ont révélé la présence de polyphénols,flavonoïdes, tanins, les huiles essentielles; ce qui confère à cette plante de nombreuses propriétés biologiques (**Akrou et al., 2011**).

I-1- Extraction

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été effectuée par des solvants à polarité croissante. Il s'agit de chloroforme, acétate d'éthyle et l'éthanol.

Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts: L'extrait chloroformique (Chl), l'extrait d'acétate d'éthyle (AcEt), l'extrait d'éthanol (EtOH).

Exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante fraîche, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait de chloroforme (3.4 % m/m), suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (2.26 % m/m), et enfin l'extrait éthanolique possède le plus faible rendement avec (0.48 % m/m) (**Boudjouref, 2011**).

Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents (Tab.4) (**Boudjouref, 2011**).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques méditées par ces métabolites (**Lee et al.,2003**).

Tab.4: Aspect, couleur et rendement de différents extraits d'*Artemisia campestris* (Boudjouref, 2011)

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
Chl	Pâteux	Brune	3,4%
AcEt	Pâteux	Verte	2,26%
EtOH	Pâte collante	Verte foncée	0.48 %

Chl : extrait de chloroforme, AcET: extrait d'acétate d'éthyle, EtOH : extrait d'éthanol

I-1-2 Analyse chimique qualitative

Les tests phyto chimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques (Kholkhal et al., 2013).

Les résultats de criblage phytochimique sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau5: Criblage phyto chimique d'*Artemisia Campestris* (Boudjouref, 2011).

Métabolite testé	Couleur	Résultats	
flavonoides	rouge	++	Boussaâda
tanins	vert	++	
saponines	Mousse persistante	+++	
phenols	Bleu noire	++	
Tanins gallique ou catechique	Bleu noire	++	
flavonoides	rouge	++	Oum El Bouaghi
tanins	vert	++	
saponines	Mousse persistante	+++	
phenols	Bleu noire	++	
Tanins gallique ou catechique	Bleu noire	++	

++ **Positif**

+++ **Fortement positif.**

Les tests phyto chimiques réalisés ont montré la présence des phénols, flavonoïdes et les tanins ainsi que les saponines (**Boudjouref, 2011**).

Dans une étude réalisée par **Naili et ses collaborateurs (2010)**, sur les tests phytochimiques d'*Artemisa campestris*, ils ont démontré la présence des flavonoïdes, des saponines, ce qui est comparable aux résultats mentionnés.

I-1-3-Analyse chimique quantitative

I-1-3-1- Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide caféique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm. Les résultats obtenus (**Boudjouref, 2011**) sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation: $Y = 0,001x - 0,008$ $R^2 = 0,993$

La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide caféique par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EAC/mg Ps).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des polyphénols totaux est : 178- 91–102 mg EAC/g Ps, pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol respectivement.

I-1-3-2-Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (**Boudjouref, 2011**).

La quercétine a été utilisée comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation (**Boudjouref, 2011**). $Y = 0,031x + 0,100$ $R^2 = 0,995$

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercétine par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EQ/mg Ps).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonoïdes est : 16.88 - 19.47 –21.33 mg EQ/g Ps, pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol respectivement (**Boudjouref, 2011**).

I-1-3-3-Dosage des flavonols

Le dosage des flavonols a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et l'étalon été la quercétine, l'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 415 nm (**Boudjouref, 2011**).

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

$$Y = 0,008x - 0,016 (R^2 = 0,998)$$

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonols est : 31.13- 36.86 - 12.70 mg EQ/g Ps, pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol respectivement.

L'étude quantitative des extraits bruts d'*Artemisia campestris*, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des flavonols.

La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribués.

Les polyphénols sont estimés par plusieurs méthodes, comme la méthode de bleu de Prusse (**Graham, 1992**), mais la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H3PW12O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMO12O40). Il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Boizot et Charpentier., 2006**).

En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à longueur d'onde de 765 nm (**Huang et al., 2005**).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que l'extrait de chloroforme représente l'extrait le plus riche avec: 178 mg EAC/g d'extrait, suivi de l'extrait éthanolique 102 mg EAC/g d'extrait. L'extrait d'acétate d'éthyle avec 91 mg EAC/g d'extrait représente la fraction qui contient la plus faible teneur en polyphénols.

Dans une étude faite sur onze plantes médicinales dont *Artemisia campestris*, (**Djeridane et al., 2006**) ont déterminé la teneur en polyphénols totaux de la partie aérienne d'un extrait éthanolique 70% (v/v), ils ont trouvé que la teneur des polyphénols totaux est de 20.38 mg

EAG/g Ps, cette teneur est relativement élevée.

Dans une autre étude, (**Djeridane et al., 2007**) ont dosé les polyphénols totaux dans un extrait éthanolique (80%), la teneur trouvée était 103.4 mg EAG/g Ps, ce résultat est relativement très élevé, il est 5 fois supérieur à celui trouvé dans l'étude précédente. Cette teneur peut atteindre plus de 450 mg EAG/g d'extrait quand l'extraction est réalisée avec une solution alcoolique à 50 % (**Akrout et al., 2011**).

Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques et période de collecte ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions expérimentales.

La détermination quantitative des flavonoïdes s'effectue par la méthode de trichlorure d'aluminium, celle-ci est la plus employée, elle se base sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 430 nm. La quercétine est utilisée comme standard, les résultats du dosage des flavonoïdes sont: 16.88 - 19.47– 21.33 mg EQ/g d'extrait dans les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol respectivement.

(Djeridane *et al.*, 2006 et 2007), ont déterminé la concentration des flavonoïdes dans deux extraits éthanoliques 70 % et 80 % (v/v). Cette teneur a été estimée à 7.46 et 5 mg ER/g Ps dans les deux extraits respectivement. Cependant, (Akrouf *et al.* 2011) ont estimé cette valeur à 56,31 mg ER/g d'extrait quand l'extraction est réalisée avec une solution alcoolique à 50 %.

Alors que (Saoudi *et al.* 2010) ont trouvé une teneur de 131,89 mg EQ/g d'extrait de feuilles aqueux.

La teneur en polyphénols totaux des extraits d'*Artemisia campestris* relativement identiques à ceux trouvés par d'autres auteurs sur des plantes de la même espèce obtenus d'autres sites (Algérie et Tunisie). Alors que la teneur en flavonoïdes de l'espèce étudiée semble légèrement inférieure à celles trouvées par d'autres auteurs pour la même espèce (Saoudi *et al.*, 2010 ; Akrouf *et al.*, 2011), toutefois la teneur en flavonols, à notre connaissance, n'a pas encore fait l'objet de déterminations sur cette espèce.

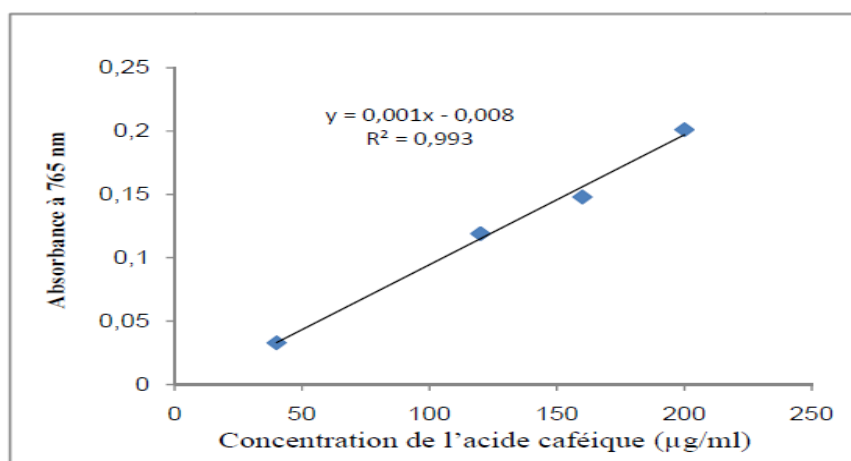


Fig. 12: Droite d'étalonnage des polyphénols totaux des extraits (Boudjouref, 2011).

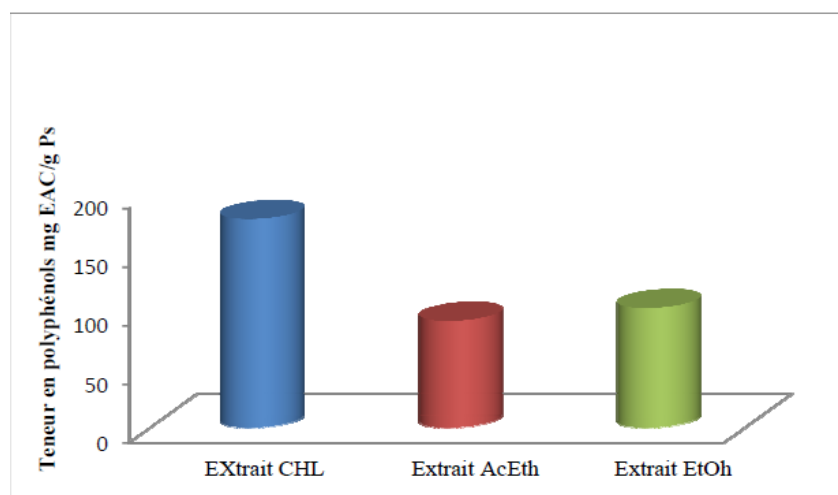


Fig. 13 : Evaluation des polyphénols totaux des extraits (Boudjouref, 2011).

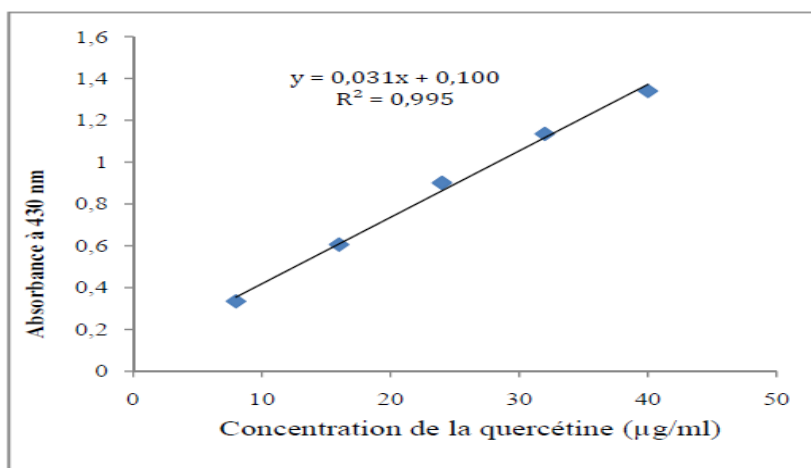


Fig. 14: Droite d'étalonnage des flavonoïdes des extraits (Boudjouref, 2011).

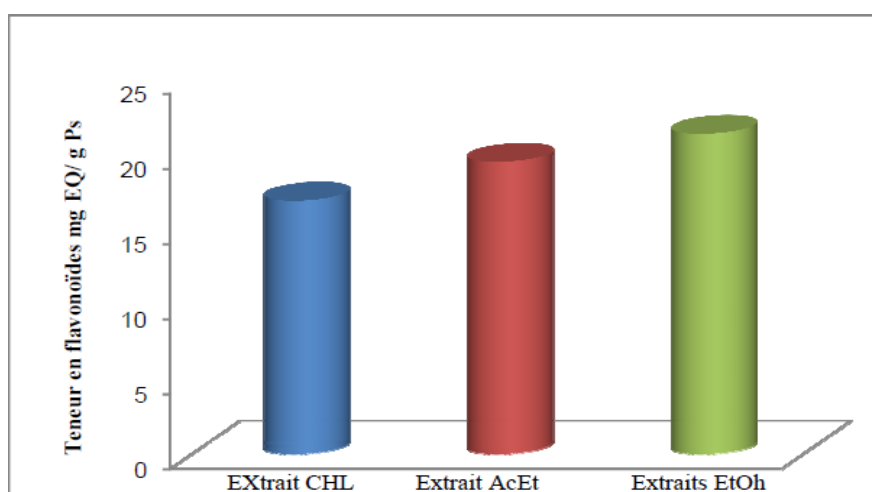


Fig. 15: Evaluation des flavonoïdes des extraits (Boudjouref, 2011).

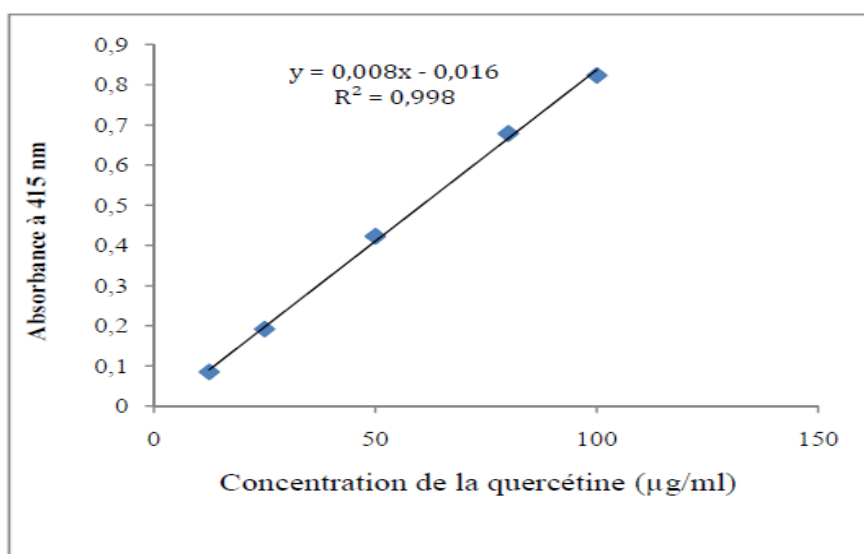


Fig.16: Droite d'étalonnage des flavonols des extraits (Boudjouref, 2011).

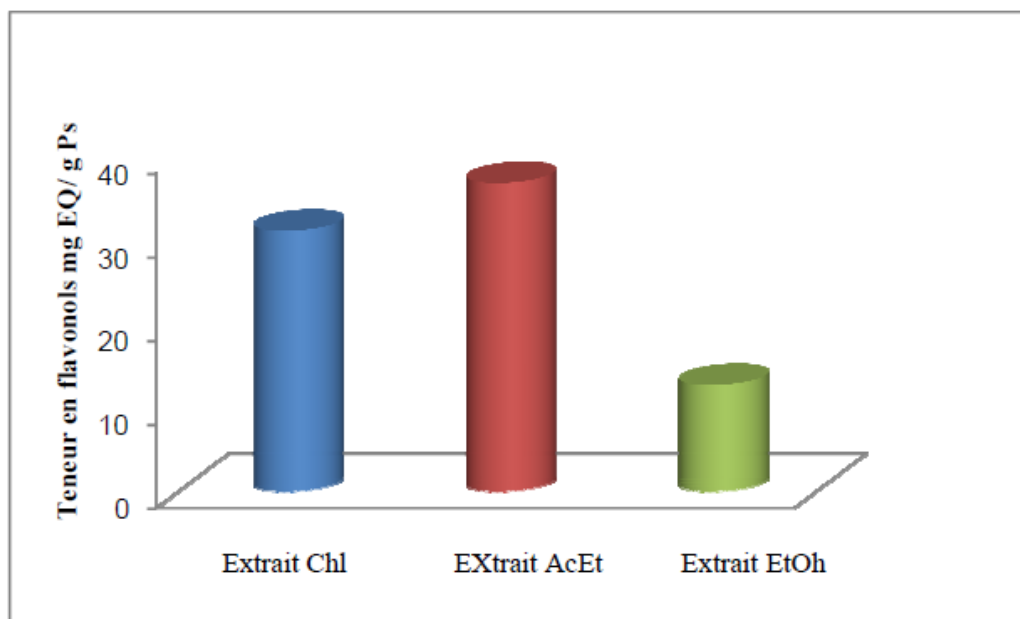


Fig.17: Evaluation des flavonols des extraits (Boudjouref, 2011).

I-2- - Résultats des tests biologiques

I-2-1-- Activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante des extraits a été évaluée in vitro par deux méthodes différentes : la technique de décoloration du β -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH (Boudjouref, 2011).

a- Test visuel de décoloration du β -carotène

Après un temps d'incubation en présence des extraits d'*Artemisia campestris*, et du témoin positif BHT, un halo de couleur orange persiste autour des puits (Fig. 18), alors que la surface de la gélose perd sa couleur orange suite à l'oxydation du β -carotène. Le diamètre et l'intensité de la couleur des disques reflètent le pouvoir antioxydant (Tab.6).

(Boudjouref, 2011).

Bien que tous les extraits aient donné des halos de couleur orange nettement visibles, il convient de mentionner que l'extrait chloroformique exhibe les moins intenses pour toutes les concentrations testées par rapport aux autres extraits. Le BHT a donné lieu à des halos relativement meilleurs que ceux des extraits (Fig. 19). (Boudjouref, 2011).



Fig. 18.1: Extrait d'acétate d'éthyle (Boudjouref, 2011).



Fig. 18.2: Extrait de chloroforme (Boudjouref, 2011).



Fig. 18.3: Extrait d'éthanol (Boudjouref, 2011).

Fig. 18: Diamètre des halos oranges en présence de différentes concentrations d'extraits (Boudjouref, 2011).

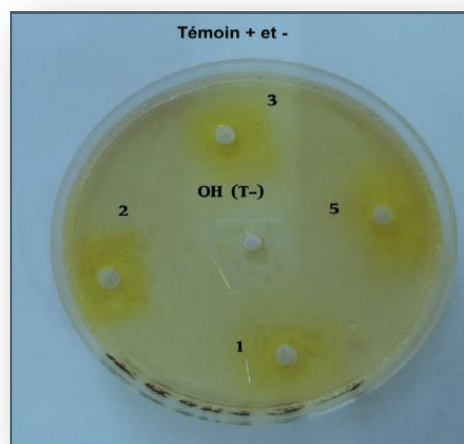


Fig. 19: Diamètre des halos oranges en présence des témoins positifs (BHT et Quercétine) et témoin négatif (méthanol) (Boudjouref, 2011)..

Tab.6 : Intensité de la couleur des halos autour des puits (Boudjouref, 2011).

Extrait	potentiel antioxydant
Chl	+
AcEt	++
EtOh	++

+ : Activité faible. ++ : Activité forte.

La présence ou l'absence de l'activité antioxydante d'un extrait peut être mise en évidence par un test simple et relativement rapide. Le potentiel antioxydant est estimé par la taille et l'intensité de la couleur orange qui persistent autour des puits contenant l'extrait de la plante.

L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en substances antioxydantes des extraits déposés. En effet, en absence de substances antioxydantes la gélose de couleur orange due au β -carotène blanchit.

Les extraits d'éthanol et d'acétate d'éthyle ont manifesté des activités relativement élevées par rapport à celle manifestée par l'extrait de chloroforme, mais qui restent inférieures à celle du BHT.

b- Méthode de blanchissement du β -carotène (BCB)

Afin d'évaluer l'activité anti-oxydante des extraits, nous avons utilisé la méthode de blanchissement du β -carotène, Un suivie de la réaction de l'oxydation du β -carotène en présence des extraits et ou des témoins (négatif et positif), a été effectué en mesurant l'intensité de la couleur de β -carotène à une longueur d'onde de 470 nm, permet de tracer une courbe (Fig. 9). À partir de cette dernière on a remarqué que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse, mais cette diminution reste moins rapide par rapport à

celle de la solution témoin (-), et devient sable dans un temps prolongé pour les extraits d'acétate et d'éthanol, et dans un temps assez prolongé pour l'extrait de chloroforme, ainsi la couleur de la solution change de l'orange au blanc (Boudjouref, 2011).

Le tableau ci-dessous (Tab. 10) rapporte les valeurs moyennes de trois mesures d'AA % (coefficient d'activité antioxydante) ± SD calculés à partir de la formule :

$$\% \text{ Activité antioxydante} = (\text{Abs contrôle 48h} - \text{Abs échantillon 48h} / \text{Abs contrôle 48h}) \times 100.$$

Ces valeurs facilitent des comparaisons de l'activité relatives des différents extraits, du témoin positif (BHT) et du témoin négatif.

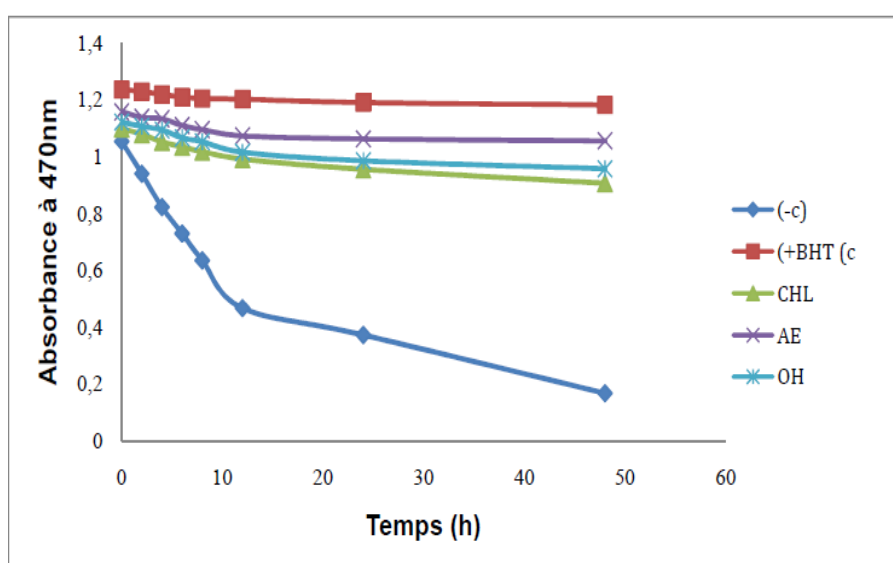


Fig. 20: Cinétique de l'inhibition de blanchissement du β-carotène par extraits d'Artemisia campestris et du témoin positif BHT (Boudjouref, 2011).

Tab.7: L'activité antioxydante des extraits bruts et du témoin positif et négatif(Boudjouref,2011).

Extraits etcontrol	AcEt	Chl	EtOH	Témoin+	Témoin -
AA%	89,32%	76,68%	80,97%	99,94%	14,17%

L'aptitude des extraits bruts d'Artemisia campestris inhiber la peroxydation des lipides a été évaluée par la technique de décoloration du β-carotène. En effet, toute substance chimique qui retarde ou inhibe le blanchissement du β-carotène peut être considérée comme antioxydant (Liyana-Pathirana et al.,2006).

Pour se renseigner sur la puissance de nos extraits à ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides, nous avons réalisé un suivi de la réaction de l'oxydation de l'acide linoléique par mesure de l'abaissement de l'absorbance dans le temps.

Les résultats obtenus montrent que le BHT et les extraits testés inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β-carotène. En effet, l'extrait d'acétate

d'éthyle montre la plus grande activité inhibitrice (89,32 %), il est suivi par l'extrait d'éthanol (80,97%), mais cette activité reste significativement inférieure à celle du BHT (99,94 %) qui est utilisé comme témoin positif. Une activité intermédiaire est obtenue avec l'extrait chloroformique (76,68 %) .(Akrouit *et al.*, 2011) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits: huile essentielle, éthanol (50%), et extrait aqueux des plantes d'*Artemisia campestris* et *Thymelaea hirsuta* par plusieurs méthodes dont celle de décoloration du β -carotène.

Ils ont trouvé pour l'extrait éthanolique de la plante *Artemisia campestris* une valeur de 34 %, celle-ci est relativement faible, elle est deux fois plus inférieure à celle trouvée pour notre extrait. Cependant, cette activité a été élevée pour l'extrait aqueux (88.7 %). De même leur témoin positif BHT a montré une valeur égale à celle de notre extrait acétate d'éthyle, donc inférieure à la valeur que nous avons trouvée (99,94 %).

En comparant les résultats des deux plantes, les extraits de notre plante possèdent une activité antioxydante supérieure à celle étudiée par (Akrouit *et al.*, 2011), ceci s'explique par le fait que nos extraits contiennent des quantités supérieures en composés antioxydants.

Dans une étude réalisée sur l'extrait aqueux de la partie aérienne de 11 plantes médicinales algériennes dont *Artemisia campestris*, (Djeridane *et al* 2006-2007) ont évalué l'activité antioxydante par la méthode de l'ABTS+, ils ont trouvé la valeur de 25 mmol TEAC/g Ps (teneur en polyphénols totaux de 20,38 mg EAG/ g Ps, teneur en flavonoïdes de 7,47 mg ER/g Ps) , et la valeur de 0.573 mmol TEAC/g Ps (teneur en polyphénols totaux 103,4mg EAG/ g Ps, teneur en flavonoïdes de 5,47 mg ER/g Ps) pour les plantes collectées

dans la région de Laghouat au cours des années 2002, 2007 respectivement. De ces résultats il ressort d'une part que l'activité antioxydante est inversement proportionnelle à la teneur en polyphénols, et d'autre part elle est proportionnelle à la teneur en flavonoïdes. Ce qui explique à l'opposé des flavonoïdes, toutes les molécules de polyphénols ne participent pas à cette activité

c- Méthode de réduction du radical libre DPPH

Les activités antiradicalaires des extraits d'*Artemisia campestris* et du témoin positif BHA ont été déterminées par la méthode au DPPH. Les résultats obtenus sont représentés sous forme de droites (Fig. 17) dont les équations sont les suivantes:

Extrait chloroformique : $Y = 0,482x - 0,981$ $R^2 = 0,989$

Extrait d'acétate d'éthyle : $Y = 0,523x - 2,408$ ($R^2 = 0,968$)

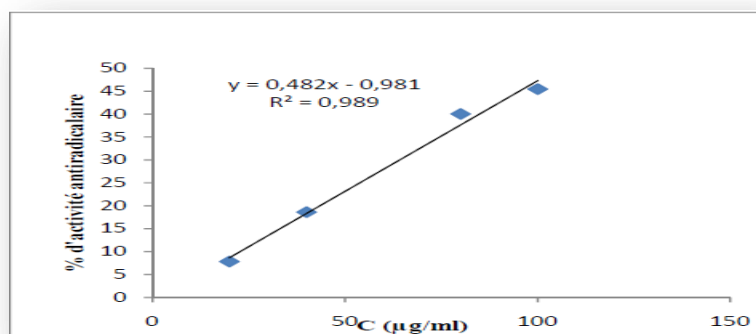
Extrait d'éthanol : $Y = 0,748x - 0,942$ ($R^2 = 0,998$)

BHA : $Y = 0,493x + 24,77$ ($R^2 = 0,935$)

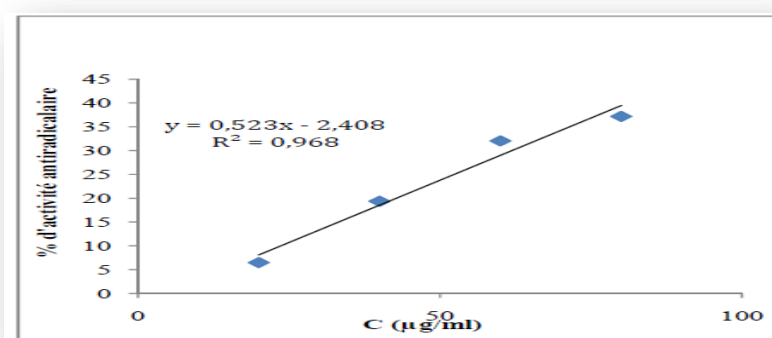
L'activité anti radicalaire de nos extraits est exprimée en CI50. Pour chaque extrait la CI50 est déduite de la droite d'étalonnage correspondante.

Comme figurant dans le tableau ci-dessus l'antioxydant standard BHA a montré une activité antioxydante puissante avec une CI50 de l'ordre de 51.17µg/ml.

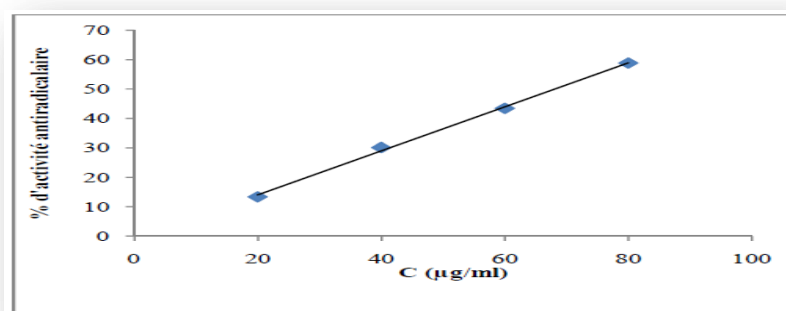
Parmi les trois extraits d'*Artemisia campestris*, l'extrait éthanolique représente l'extrait le plus actif avec une CI50 de l'ordre de 68.10 µg/ml, par contre les deux autres extraits montrent une très faible activité anti-radicalaire avec 100.20 et 105.76 µg/ml pour les extraits de l'acétate d'éthyle et le chloroforme respectivement. L'activité de l'extrait éthanolique est inférieure à celle du BHA (57.41µg/ml.) (Tab.7).



(1)



(2)



(3)

Fig. 21: Activité antioxydante des extraits d'*Artemisia campestris* (Boudjouef, 2011).

(1): l'extrait chloroformique, (2): l'extrait de l'acétate d'éthyle, (3): l'extrait de l'éthanol

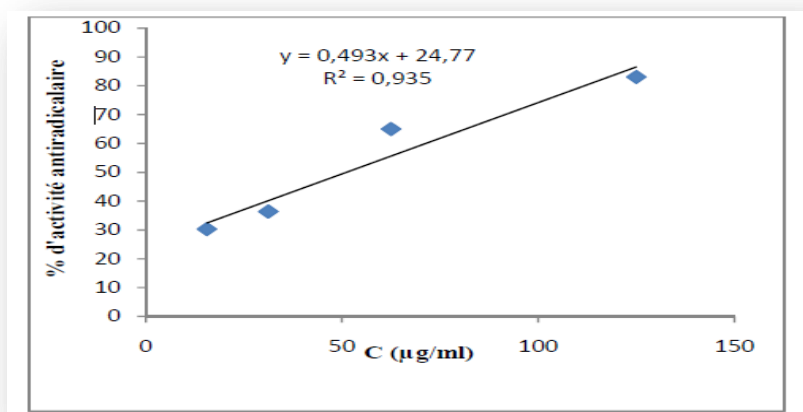


Fig. 22: Activité antioxydante du standard BHA (Boudjouref, 2011).

Tab.8: Valeurs des CI50 des extraits bruts et témoin déterminées par le test au DPPH (Boudjouref, 2011).

Extraits	BHA	Chl	AcEt	EtOH
CI50 (µg/ml)	51.17	105.76	100.20	68.10

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al., 2008).

Parmi les trois extraits d'*Artemisia campestris*, l'extrait éthanolique représente l'extrait le plus actif avec une CI50 de l'ordre de 68.10 µg/ml, par contre la capacité antiradicalaire des autres extraits est plus faible (Tab.6). Pour les trois extraits la capacité antioxydante estimée par le test au DPPH est relativement faible, alors que dans le test de blanchissement de β- carotène ces extraits montrent une activité antioxydante modérée.

(Akrouf et al., 2011) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits d'*Artemisia campestris*, ils ont trouvé une valeur de CI50 de 2.053 mg / ml pour l'extrait de l'éthanol 50%, cette valeur est relativement très faible si elle est comparée à celle de notre extrait éthanolique (68.10 µg/ml) Lopes-Lutz et al., (2008) ont confirmé dans une étude faite sur quelques espèces d'*Artemisia* que l'activité antioxydante de ces plantes est faible.

(Kang et al., 2003) ont suggéré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité antiradicalaire élevée.

I- Activité antimicrobienne

a- Sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques, le tableau ci-dessous rapporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions manifestées par les antibiotiques sur les différentes souches étudiées (Boudjouref, 2011).

Tab.9: Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm) (Boudjouref, 2011).

ATB \ Souches	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Céfépime (FEP)	-	16,975±0,318	-
Amoxicilline (AMX)	-	24,775±1,237	-
Ticarcilline (ITC)	-	23,75±0,353	-
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	-	24,15±0,07	-
Oxacilline (OX)	0	-	-
Kanamycine (K)	14,625±0,035	-	-
Fosfomycine (FOS)	24,875±0,176	-	-
Gentamycine (CN)	10,775±0,035	-	-
Tétracycline (TE)	11,35±0,353	-	-
Pénicilline (P)	24,475±0,247	-	-
Pipéracilline (PIP)	-	-	23,7±2,474
Imipénème (IPM)	-	-	27,625±0,247
Ticacilline (TIC)	-	-	29,65±0,424
Pipéracilline + Tazobactam	-	-	27,7±0,141
Aztreonam (ATM)	-	-	30,845±0,7
Cefsulodine (CFS)	-	-	30,725±0,035

16 antibiotiques standards sont testés sur 3 souches bactériennes gram (+) et gram (-), on observe que les différents types de souches réagissent différemment aux antibiotiques étudiés (Boudjouref, 2011).

À l'exception de l'oxacilline, la souche *S. aureus* a manifesté une sensibilité vis-à-vis tous les antibiotiques, sauf cet effet est plus faible pour les antibiotiques: K- TE- CN.

De même pour *E. coli*, l'antibiotique FEP possède un effet faible. Quand *P. aeruginosa* elle est sensible aux antibiotiques utilisés (Tab.9). (Boudjouref, 2011).

La méthode de disque a permis de déterminer l'action des extraits de la plante dissouts dans le DMSO sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

Tous les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées ce qui confirme que la plante d'*Artemisia campestris* est douée de propriétés antimicrobiennes (Boudjouref, 2011).

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* se révèle la plus résistante pour tous les extraits. La souche de *Staphylococcus aureus* est plus résistante que les souches d'*E. Coli* et *Proteusmirabilis*.

La CMI a été déterminée pour les différentes souches microbiennes (Tab.9): la souche de *P.aeruginosa* ne montre aucune sensibilité pour tous les extraits, La souche d'*E. Coli* a été la plus sensible aux extraits de la plante avec une CMI de 0.5 mg/ml, tandis que les deux autres souches *S. aureus* et *P. mirabilis* semblent plus résistantes que la souche d'*E. Coli* avec des CMI de 1.8 mg/ml et 0.75, pour l'extrait de chloroforme et 1.8 mg/ml et 1.5 mg/ml pour l'extrait d'acétate d'éthyle respectivement. (Boudjouref, 2011).

Tab.10: Activité antibactérienne des extraits d'*Artemisia campestris* exprimée en concentration minimale inhibitrice (mg/ml). (Boudjouref, 2011).

Extrait \ Souche	CHL	AE	OH
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.8	1.8	1.8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	/	/	/

<i>E.coli</i> ATCC25922	0.5	0.5	0.5
<i>P. mirabilis</i> <i>Ssp</i>	0.75	1.5	/

Conclusion générale

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Dans le présent travail, différents aspects d'*Artemisia campestris* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimique et activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits bruts.

L'extraction de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes et flavonols était conséquente.

L'activité antioxydante obtenu par certains auteurs des différents extraits d'*Artemisia campestris* a été évaluée par deux méthodes: le test blanchissement du β -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH. Pour le premier test les résultats ont montré que l'oxydation du β -carotène est efficacement inhibée par les extraits testés. En effet, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans les extraits les plus polaires, il s'agit en occurrence de l'éthanol et de l'acétate d'éthyle. Pour le test de réduction du radical libre DPPH, l'activité antiradicalaire est élevée dans l'extrait le plus polaire (extrait éthanolique), par contre elle est faible pour les deux autres extraits.

L'activité antimicrobienne par d'autres auteurs a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion disque, Les résultats indiquent que les trois extraits possèdent une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées sauf la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui manifeste une résistance pour tous les extraits.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

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

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Abderrazak M., Joël R.** (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. P- 177.
- **Akrout A., Chemli R.C., Chrief., Hammami M.**(2001). Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *J. Flavour Fragr.* 16,337–339.
- **Akrout., Ahmed. , Gonzalez. , Lidia Alarcon., EL JANI., Hajer., et al.** (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*. Vol, 49.no, 2.p-342-347.
- **Aniya Y., Shimabukuro M., Shimoji M., Kohatsu M., Gyamfi M.A., 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.
- **Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z.**(1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 2,15850-15855.
- **Aliyiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., and Chinou I. B.** (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 40, 4168-4170.

B

- **Belhattab R.** (2007). Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et antiaflatoxinogène d'extraits de *Origanum glandulosum Desf* et *Marrubium vulgare L* (Famille des Lamiaceae). Thèse de Doctorat d'état, UFA-Sétif, Algérie.
- **Benchelah A. C., Bouziane H., Maka M.** (2004). Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie* vol. 2.no 6.p- 191-197.
- **Ben Sassi A., Harzallah Skhiri F., Aouni M.**(2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J. Pharmaco. Bio.* 45 (5) ,421–428.
- **Boizot N., Charpentier J.P.**(2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra.* p- 79-82. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008) .
- **Boudjelal., Amel., Henchiri., Cherifa., Sari., Madani., et al.**(2013). Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of ethnopharmacology.* Vol,148. no 2, p -395-402.
- **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.p- 85-96.
- **Boudjouref M.**(2001)1. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister En Biochimie. Biochimie appliquée .Université Ferhat Abbes, Sétif. p -17-99.

- **Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B.** (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 4 (6), 7.(cited in Mohammedi Z,2005).
- **Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., and Rice-Evans C.** (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 330,1173-1178.
- **Bruneton J.** (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3^{ème} Ed Techniques et documentations. Paris. p-227-310-312-313-314-494.

C

- **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.
- **Chan., Kelvin.** Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*. (2003). vol. 52, no 9, p -1361-1371.
- **Chaudhry P.S., Cabrera J., Juliani H.R., Varma S.D.** (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1995.
- **Cohen Y et Jacquot C.** (2001). Pharmacologie. 5^{ème} Ed. Masson. Paris. p 350.
- **Cotelle N.** (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 569-590.(cited in Yakhlaf G, 2009).
- **Canillac N., and Mourey A.** (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* On *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and *coliform* bacteria. *Food Microbiol.* 18, 261– 268.

D

- **Dacosta Y.** (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. p -317. (cited in - Djemai Zoueglache S, 2008).
- **Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., et Capasso F.** (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life. Sci.* 65 (4) , 337-53.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker. P- Vidal N.** (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J. Food Chem.* 97 , 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.
- **Djidjel 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.

E

- **Effendi L., Yajun Y. et al.**(2008). Functional expression of a P-450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli* .*Metab. Eng.* 8,172-181.
- **Elghozi J.L., Duval D.** (1992). Pharmacologie 2^{ème} Ed : Médecine Flammarion. Paris. p-289.

F

- **Favier A.** (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. p -108-115.
- **Ferchichi L., Merza J., Landreau A., Le Ray A.M., Legseir B., Seraphin D., and Richomme. P.**(2006). Occurrence of isocoumarinic and phenolic derivatives in *Artemisia campestris* L. subsp. *campestris*. *Biochem Syst. and Ecol.* 34 ,829-832.
- **Fuhrman . B ., LavyA., and Aviram M.** (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61,549-554. cited in Yakhlaf G,2009).

G

- **Galeotti F., Barille E., Curir P., Dolci M., and Lanzotti V.** (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry. letters.* 1,44-48.
- **Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V.** (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control.* 19,835–841.
- **Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M.**(2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème}Ed TEC&DOC. Paris. P-275. cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- **Giulia Di Carlo, Nicola Mascolo, Angelo A. Izzo, and Francesco Capasso.**(1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65 (4) ,337-353.
- **Graham H.D.**(1992). Stabilisation of the Prussian blue colour in the determination of polyphenols.*J. Agric. Food Chem.* 40, 801-805.

H

- **Halliwell B.**(1994). Free radicals and antioxidants.*Nutr.Rev.*52,253-265.(cited in Yakhlaf G, 2009).
- **Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., and Kinoshito T.**(1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 48, 125-129.
- **Harborne J.B., and Williams C.A.**(2000). Advances in flavonoid research since 1992 *Phytochemistry*. 55,481-504.
- **Huang G., Jiang J., and Dai D.**(2008). Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.*7 (9) ,1335-1338.
- **Hurabielle M., and Eberle J.**(1982). Flavonoids of *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*. *Planta Med.* 46 (2) ,124–125.
- **Huang D., Ou B. and Prior R.L.**(2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays.*J of Agr Food chem.*53,1841-1856.

I

- **Iinuma M., Tsuchiya H., Sato M., Yokoyama J., Ohyama M., Ohkawa Y., Tanaka T., Fujiwara S., and Fujii T.** (1994). Flavanones with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.*J. Pharm. Pharmacol.* 46 ,892-895.
- **Iniesta-Sanmartin E., Barberan F.A.T., Guirado A., and Lorents F.T.**(1990). Antibacterial flavonoids from *Helichrysum picardii* and *H. italicum*. *Planta Medica*. 56,648-649.

J

- **Jacques B., and André R.** (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. p - 217-219-220-223-225.
- **Jerkovic J., Mastelic M. Milos., Juteau F., Masotti V and Viano J.** (2003). Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia *Flavour. Fragr. J.* (18) ,436–440.
- **Joa O.M., Vasconcelos., Artur M.S.S and Jose A.S.C.** (1998). Chromones and flavones from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*. 49 (5) ,1421-1424.
- **Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., and Simic M.G.** (1994). Flavonoids as antioxidants.*J. Am. Chem. Soc.*116 ,4846-4851.
- **Jürgen R., Paul S., Ulrike S., and Reinhard S.**(2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed.*16, 79–90.
- **Juteau F., Masotti V., Bessière J-M., Viano J.** (2002). Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol.* (30) , 1065-1070.
- **Joa O.M., Vasconcelos., Artur M.S.S and Jose A.S.C.** (1998). Chromones and flavones from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*. 49 (5) , 1421-1424.

K

- **Khanbabae K and Ree T.R.**(2001). Tannins:Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. 18 ,641-649.cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- **Kreitschitz., Agnieszka et Vallés., Joan.**(2007).Achene morphology and slime structure in some taxa of *Artemisia L.* and *Neopallasia L.*(Asteraceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*.vol, 202. no 7.p -570-580.
- **Krippeit-Drews P., Lang F., Haussinger D. and Drews G.**(1994).H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells .*Pflugers Arch.* 426,552-554.
- **Kundan S., and Anupam S.**(2010). The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *J. Pharm. Biol.*p -1-9.
- **Kyeong W.Y., Anwar M., and Jong H.K.**(2007). Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp. *caudata*on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology.* 50 (3) ,358-361.
- **Kang D.G., Yun C.K., and Lee H.S. (2003).** Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacol.* 87,231-236.
- **Kaur C and Kapoor H.C.**(2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables .*Food. Sci.Technol.* 37 , 153-161. cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

L

- **Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L.**(2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.*J.Acta.biologica. szegediensis.* 47 (1-4) , 119-125.Cited in Mohammedi Z, (2005).
- **Lutge U., Kluge M., Bauer G.** (2002). *Botanique 3ème Ed : Technique et documentation.* Lavoisier .Paris.p-211.
- **Lopes-Lutz D., Alviano D., Alviono C. S. and Kolodziejczyk. P.** (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry.* 69, 1732-1738.
- **Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. and Lee C. Y.**(2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7292-7295.

M

- **Mahmoud N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., and Hay A.J.** (1993). Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir.Res.* 46(7) ,1257-71.
- **Marfak A.**(2003). Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. p - 6-7-10.
- **Martinez-Cayuela M.** (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.*77,147-161.
- **Medic–Saric M., Jasprica I., SmolcicBubaloA., and Momar A.** (2003). Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic

Acids.*CroaticaChemicaActa* .77 (1-2) ,361-366. cited in Mohammadi Z, 2005).

- **Middleton and Elliott J.** (1996). Biological properties of plant flavonoids an overview. *Int. J. Pharmacol.* 34 (5) ,344-348.

- **Mila I., and Scalbert A.**(1994). Tannin antimicrobial properties through iron deprivation a new hypothesis.International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance. 381(2) ,749-755.

- **Minami., Motoyasu., Suzuki., Minori., Hosokawa., Keizo., et al.**(2010) .Preliminary survey of taxonomical problems, pharmacognostical characteristics, and chloroplast DNA polymorphisms of the folk medicinal herb *Artemisia campestris* from the Ryukyu Islands, Japan. *Journal of natural medicines.* vol. 64, no 2, p- 239-244

- **Mirjalili. M.H., Tabatabaei S.M.F., Hadian J., Nejad S.E.,and Sonboli A.**(2007). Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia*from Iran. *J. Essent. OilRes.* 19,326–329

- **Mookerjee B.K., Lee T.P., Logue G.P., Lippes H.A., and Middleton E.** (1986). The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo. Res.* 213 ,511- 20.

- **Mucciarelli., Marco., Caramiello R., Maffei M., et al.** (1995).Essential oils from some *Artemisia* species growing spontaneously in North-West Italy. *Flavour and Fragrance Journal.* Vol, 10. no, 1, p- 25-32.

N

- **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.

- **Namgoong S.Y., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., and Kim H.P.** (1994). Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 54 (5),313-20.

- **Nauciel. C., and Vildé J.L.**(2005). Bactériologie médicale, 2^{ème}Ed. Masson . Paris. p- 5- 10.

O

- **Ong K.C., and Khoo H.E.** (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life. Sci.* 67 ,1695-1705.

P

- **Paris M et Hurabielle.** (1981). Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.p-102-103-104-107.

- **Patrick B., Jean L., and Michel S.** (1988). Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{er} Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. p -100-108-274.

- **Pavela R.** (2009). Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against

Culexquinquefasciatus Say larvae (Diptera: Culicidae). *J. Parasitol Res.* 105,887–892.

Q

- **Quezel et Santa. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique .Paris. Tome I,p-990.
- **Quézel., Pierre et Santa., Sébastien. (1963).**Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

R

- **Rauter A.P., Branco I., TostaoZ ., Pais M.S., Gonzalez A.G et Bermejo J.B.(1989).** Flavonoids from *Artemisia campestris Subsp Maritima*. *Phytochemistry.* 28 (8),2173-2175.
- **Richard C et Kiredjian M.(1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucelle, Bordetella. 2^{ème} édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. p-42-43.
- **Romero M.R., Efferth T., Serrano M.A., Castano B., Macias R.I., Briz O, and Marin J.J. (2005).** Effect of artemisininartesanate as inhibitors of hepatitis B virus production in an “in vitro” system.*Antivir Res.* 68,75-83.
- **Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., and Mata R. (1992).** Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 35, 275-283.

S

- **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.
- **Sefi M., Fetoui H., MakniM., 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.
- **Seyoum A., Asres K., and El-Fiky F.K. (2006).** Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry.* 67,2058–2070.
- **Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method.Enzymol.* 299, 152-178.
- **Sanchez-Moreno C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of Foods Sci. Tech.* 8 ,121-137.
- **Skergot M., Kotnik P., Hadolin.M.,Hras A.R., and SimonicM., Knez Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* 89 ,191-198.
- **Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J.(2004).** Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. p. 71-132

T

- **Tim C.T.P, and Andrew J. L.**(2005). Antimicrobial activity of flavonoids.*Int. J. Antimicrob. Ag.*26,343–356.

V

- **Valant-Vetschera K.M., Fischer R., and Wollenweber E.** (2003). Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol.* 31,487-498.

W

- **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*, vol. 2, no 10 . p- 17.
- **Wilfred .V et Ralph .N.** (2006). *Phenolic compound biochemistry* Ed Springer .USA. p- 24.
- Wan J., Wilcock A., and Coventry M.J.(1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonashydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* 84,152–158.

Y

- **Yanishilieva N.V.I et Marinova E.M.** (1995). Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry.* 54, 337-382.cited in DjemaiZoueglache S,(2008).
- Yang J., Guo J., and Yuan J.**(2008). In vitro antioxidant properties of rutin .*LWT.*41, 1060- 1066. cited in DjemaiZoueglache S,(2008).
- **Yi Z., Yan Y., Liang Y., and Zeng B.** (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of PericarpiumCitriReticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid.*LWT,* 41 ,597 603.