

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Alimentaires

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude du profil phénolique
et des activités antioxydante et
biologiques de *Asplenium ceterach***

Présenté par : **Sidhoum Rekia**

Soutenu le : **26 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme Chougui N.

Mr Bachir bey M.

Mme Brahmi N.

MCA

MCB

MAA

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018



Remerciements

Tout d'abords, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté de réaliser ce travail.

Avant tout développement sur cette expérience, il apparait opportun de commencer ce mémoire par des remerciements.

Mes vifs remerciements vont aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je remercie en premier lieu Mr Bachir bey Mostapha pour avoir accepté d'être mon encadreur de mémoire de fin de cycle, de m'avoir guidé et soutenu durant toute la période de travail.

Je tiens à remercier Mme Chougui de m'avoir fait l'honneur de présider le jury et Mme Brahmi d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

J'exprime ma profonde gratitude à mes Co-promotrices au sein de Merinal (Kamelia) et Saidal (Mme Halli et Mme Belkadi) pour leurs aides, leurs orientations, et leurs conseils.

Je tiens également à remercier tous le personnel des deux laboratoires Merinal et CRD de Saidal et aussi l'équipe de recherche du laboratoire de Biochimie Alimentaires.

Enfin, je remercie un par un tous ceux qui ont participé à ma formation et à la réalisation de ce travail de près ou de loin.





Dédicace

Je dédie ce travail

*A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui
m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de
persévérance, de tendresse, d'amour et de force et dont je suis
fière et reconnaissante d'avoir comme parents,*

Pour vous :

Mes très chers et irremplaçables,

Frères : Mohand, Arris et Yaghmorassen

Mes très chers oncles : Sghir, Ahmed et Samir

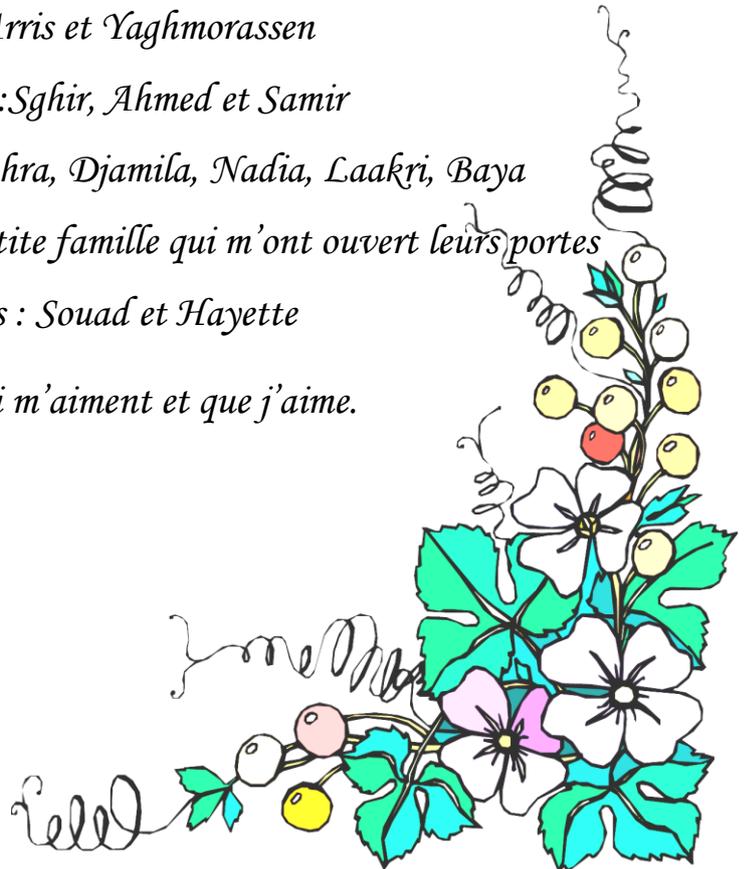
Mes tantes : Nacera, Anissa, Djohra, Djamila, Nadia, Laakri, Baya

Sans oublier mon oncle Kamel et sa petite famille qui m'ont ouvert leurs portes

A mes chères amies : Souad et Hayette

A toutes personnes qui m'aiment et que j'aime.

Rekia Sidhoum



Liste des figures

| N° | Titre | Page |
|----|---|------|
| 1 | Structures des acides cinnamique et benzoïque | 4 |
| 2 | Exemple d'alcaloïdes : la morphine | 6 |
| 3 | Unité isoprénique | 7 |
| 4 | Réponse inflammatoire | 9 |
| 5 | Schéma d'une coupe longitudinale de rein représentant ses principales structures vasculaires et urinaires | 11 |
| 6 | Site d'action des diurétiques | 12 |
| 7 | Photographie de <i>Asplenium ceterach</i> | 13 |
| 8 | Photographie de <i>Asplenium ceterach</i> dans son lieu d'habitat | 15 |
| 9 | Site géographique du lieu de récolte de la plante | 15 |
| 10 | Lot des souris Albinos | 16 |
| 11 | Lot des rats Albinos Wistar | 16 |
| 12 | Schéma récapitulatif des différentes étapes du travail | 17 |
| 13 | Photographie de <i>Asplenium ceterach</i> après séchage | 17 |
| 14 | Poudre végétale obtenue après broyage | 18 |
| 15 | Photographie de l'HPLC-DAD | 21 |
| 16 | Induction de l'inflammation | 23 |
| 17 | Administration de l'extrait de <i>Asplenium ceterach</i> par voie orale (gavage) | 24 |
| 18 | Photographie du sacrifice des animaux par rupture de la nuque | 24 |
| 19 | Cage à métabolisme | 26 |
| 20 | Homogénéisation des deux phases huileuse et aqueuse de la pommade anti-inflammatoire | 27 |
| 21 | Chromatogramme de l'extrait de <i>Asplenium ceterach</i> obtenu à 280 nm | 31 |
| 22 | Chromatogramme de l'extrait de <i>Asplenium ceterach</i> obtenu à 320 nm | 32 |
| 23 | Chromatogramme de l'extrait de ² obtenu à 350 nm | 32 |
| 24 | Pourcentage de réduction du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de la plante | 34 |
| 25 | Pourcentages d'excrétion urinaire volumétrique en fonction du temps | 39 |
| 26 | Aspect de la pommade à l'œil nu (à gauche) et sous microscope optique (au milieu en noir et blanc et à droite en couleur) (Grossissement 10x40) | 40 |
| 27 | Supplément alimentaire diurétique élaboré : <i>Sidhoum</i> | 40 |

Liste des tableaux

| N° | Titre | Page |
|-----------|--|-------------|
| I | Sous-classes des flavonoïdes et leurs structures de bases | 5 |
| II | Caractéristiques des souris utilisées pour l'activité anti-inflammatoire | 16 |
| III | Caractéristiques des rats utilisés pour de l'activité diurétique | 16 |
| IV | Résultats du screening phytochimique de <i>Asplenium ceterach</i> | 28 |
| V | Identification et quantification des composés phénoliques de <i>Asplenium ceterach</i> par HPLC-DAD | 33 |
| VI | Activité antioxydante de <i>Asplenium ceterach</i> et pourcentage de réduction du DPPH | 34 |
| VII | Résultats qualitatifs de l'activité antimicrobienne de l'extrait phénolique de <i>Asplenium ceterach</i> | 35 |
| VIII | Résultats de l'activité anti-inflammatoire du témoin | 36 |
| IX | Résultats de l'activité anti-inflammatoire de <i>Asplenium ceterach</i> | 36 |
| X | Résultats de l'activité anti-inflammatoire de la référence | 37 |
| XI | Résultats de l'activité diurétique de l'espèce <i>Asplenium ceterach</i> | 38 |
| XII | Résultats de l'activité diurétique du témoin | 38 |
| XIII | Résultats de l'activité diurétique de la référence | 38 |

Table des matières

| | |
|---------------------------|----------|
| Introduction | 1 |
|---------------------------|----------|

Synthèse bibliographique

| | |
|--|-----------|
| I. Plantes médicinales et principes actifs | 3 |
| 1. Composés phénoliques | 3 |
| 1.1. Acides phénoliques | 4 |
| 1.2. Flavonoïdes | 4 |
| 1.3. Tanins..... | 5 |
| 1.4. Lignines | 6 |
| 2. Alcaloïdes | 6 |
| 3. Terpènes..... | 7 |
| II. Propriétés biologiques des composés phénoliques | 7 |
| 1. Propriété antioxydante | 8 |
| 2. Propriété anti-inflammatoire..... | 8 |
| 3. Activité antimicrobienne | 9 |
| 4. Activité diurétique | 10 |
| 4.1. Diurèse | 10 |
| 4.2. Rappel physiologique du rein | 10 |
| 4.3. Diurétiques..... | 11 |
| III. Généralités sur <i>Asplenium ceterach</i> | 13 |

Expérimentation

| | |
|---|-----------|
| I. Matériel et méthodes | 15 |
| 1. Matériel biologique | 15 |
| 1.1. Matériel végétal | 15 |
| 1.2. Matériel microbiologique | 16 |
| 1.3. Matériel animal..... | 16 |
| 2. Méthodes | 17 |
| 2.1. Récolte, séchage et broyage de la plante médicinale..... | 17 |
| 2.2. Screening phytochimique de <i>Asplenium ceterach</i> | 18 |
| 2.2.1. Préparation de l'infusé à 5% | 18 |
| 2.2.2. Mise en évidence des anthocyanes | 18 |
| 2.2.3. Mise en évidence des leucoanthocyanes..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.4. Mise en évidence des tannins totaux..... | 19 |
| 2.2.5. Mise en évidence des quinones..... | 19 |
| 2.2.6. Mise en évidence des saponosides..... | 19 |
| 2.2.7. Mise en évidence des Alcaloïdes..... | 20 |
| 2.2.8. Mise en évidence des coumarines..... | 20 |
| 2.2.9. Mise en évidence des flavonoïdes..... | 20 |
| 2.3. Extraction et dosage des composés phénoliques de <i>Asplenium ceterach</i> | 20 |
| 2.3.1. Extraction..... | 20 |
| 2.3.2. Dosage des composés phénoliques totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu..... | 20 |
| 2.3.3. Dosage des composés phénoliques par HPLC-DAD..... | 21 |
| 2.4. Activité antioxydante de <i>Asplenium ceterach</i> | 21 |
| 2.5. Activités biologiques de <i>Asplenium ceterach</i> | 22 |
| 2.5.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne..... | 22 |
| 2.5.2. Activité anti-inflammatoire..... | 22 |
| 2.5.3. Activité diurétique..... | 25 |
| 2.6. Mise en forme galénique..... | 26 |
| 2.6.1. Formulation d'une pommade anti-inflammatoire..... | 26 |
| 2.6.2. Formulation d'un Supplément alimentaire diurétique..... | 27 |
| II. Résultats et discussion..... | 28 |
| 1. Screening phytochimique..... | 28 |
| 2. Analyse quantitative et qualitative des composés phénoliques..... | 30 |
| 2.1. Teneur en composés phénoliques totaux..... | 31 |
| 2.2. Identification des composés phénoliques par HPLC-DAD..... | 31 |
| 3. Activité antioxydante..... | 35 |
| 4. Activités biologiques de <i>Asplenium ceterach</i>..... | 35 |
| 4.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne..... | 35 |
| 4.2. Activité anti-inflammatoire..... | 36 |
| 4.3. Activité diurétique..... | 37 |
| 5. Mise en forme galénique..... | 39 |
| 5.1. Formulation d'une pommade anti-inflammatoire..... | 39 |
| 5.2. Formulation d'un Supplément alimentaire diurétique..... | 40 |
| Conclusion..... | 41 |
| Références bibliographiques | |
| Annexe | |

Introduction

Introduction

Plusieurs recherches se sont intensifiées sur les plantes médicinales qui sont utilisées à des fins thérapeutiques suite à l'évolution des moyens et méthodes d'analyse. L'intérêt particulier pour ces plantes est leurs aptitudes à l'élaboration et l'accumulation des micronutriments doués de propriétés préventives et curatives d'innombrables pathologies.

De nombreuses substances d'origine végétale, tels que les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes, sont recherchées pour leurs variables activités biologiques et propriétés thérapeutiques pour plusieurs maladies dont les maladies cardiovasculaires, neuro-dégénératives (Tacouri *et al.*, 2013).

Il est estimé que près de 50% des agents thérapeutiques utilisés proviennent de sources naturelles, alors que moins de 10% des espèces végétales ont été étudiées pour leurs activités biologiques. Cela indique qu'il subsiste encore une grande marge de progression et que l'étude approfondie des espèces végétales pourrait mener à la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques (Anton et Lobstein, 2005).

L'Algérie, de par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédologie et de grandes variations climatiques auxquelles s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement de cultures adaptées aux plantes médicinales (Belouad, 2001). Cependant, rares sont les plantes médicinales qui ont fait l'objet d'études scientifiques approfondies. *Asplenium ceterach* est un exemple éloquent d'espèce qui n'échappe pas à cette règle et cela malgré son utilisation dans la médecine folklorique locale. Toutes ces considérations nous ont amenés à envisager des possibilités de valorisation des effets thérapeutiques de cette dernière en vue d'en bénéficier et encourager sa culture du fait qu'elle soit rare et peu exploitée.

C'est dans un cadre de contribution à la valorisation de notre patrimoine naturel que s'inscrit cette investigation dont l'objectif est la caractérisation phénolique ainsi que l'étude des activités antioxydante et biologiques de *Asplenium ceterach*.

Pour mener à terme cette problématique, le présent travail est scindé en deux grandes parties, une partie bibliographique où sont indiquées quelques généralités sur les plantes médicinales, les principes actifs en particulier les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques et enfin une description de la plante médicinale étudiée : *Asplenium ceterach*. La deuxième partie, expérimentale, où sont décrits, en premier lieu, le matériel et méthodes utilisés et, en deuxième lieu, l'ensemble des résultats obtenus concernant : le screening phytochimique, les analyses quantitatives et qualitatives des composés phénoliques ainsi que les différentes activités biologiques (activité antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire et diurétique). Eventuellement, deux formes galéniques à savoir une pommade anti-inflammatoire et un supplément alimentaire diurétique sont élaborées.

Synthèse bibliographique

I. Plantes médicinales et principes actifs

Dans le code de la santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médical. C'est-à-dire qu'elle est présentée pour ses propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (Ghabrier, 2010).

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (Sanago, 2006). On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale, car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels. Aujourd'hui, les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (Iserin *et al.*, 2001).

Les substances naturelles existantes chez les différentes plantes médicinales, servent souvent de modèle à la préparation synthétique de nouveaux médicaments ou produits de beauté (Schmidt, 2012).

Les principes actifs sont des molécules contenues dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale (Pelt, 1980). Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'Homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou desséchées, il peut être cité comme des parties utilisées des racines, des écorces, des sommités fleuries, des feuilles, des fleurs, des fruits, ou encore des graines (Benghanou, 2012).

1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou composés phénoliques forment une grande classe de molécules chimiques trouvées chez les plantes au niveau des tissus superficiels, ce sont des composés phytochimiques polyhydroxylés et comprennent au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Ils sont subdivisés en sous-classes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignines, les tanins... (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principal à la vie de la plante, dans la défense contre les pathogènes, principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes et la protection contre les rayonnements UV (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, ils peuvent être estérifiés, étherifiés et liés à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Figure 01) (Wichtl et Anton, 2009).

Les acides phénoliques possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques (Médicament à base d'aspirine dérivée de l'acide salicylique) (Iserin *et al.*, 2001).

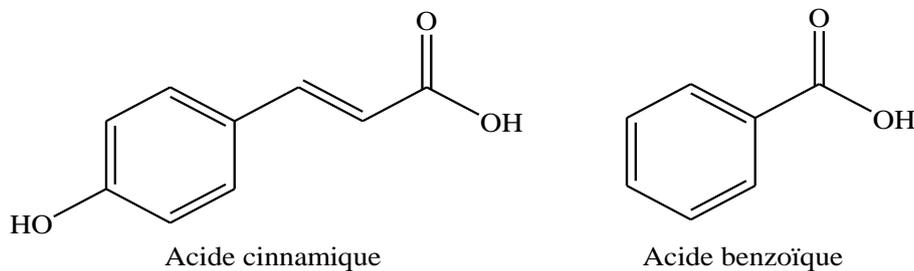


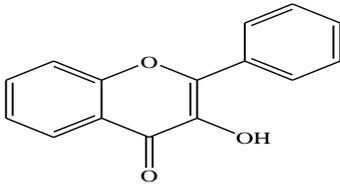
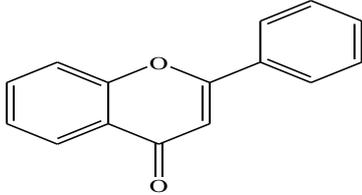
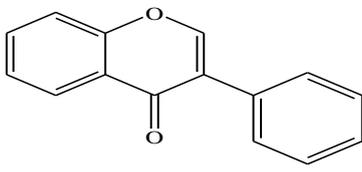
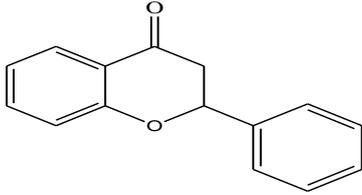
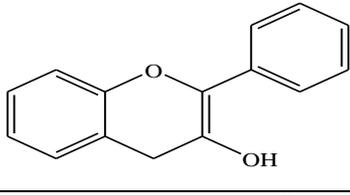
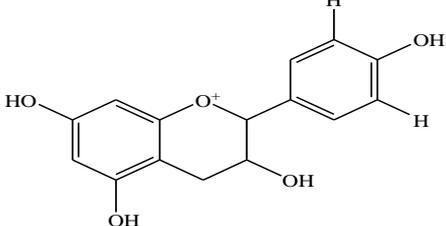
Figure 01 : Structures des acides cinnamique et benzoïque (Bruneton, 2009).

1.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde dérive du latin « *flavus* » qui signifie la couleur « jaune ». Ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plantes à côté des chlorophylles et des caroténoïdes (Wichtl et Anton, 2009). Leur structure chimique de base est tricyclique : C₆-C₃-C₆.

Les flavonoïdes sont généralement des antibactériens (Wichtl et Anton, 2009). Ils peuvent être exploités de plusieurs manières dans l'industrie cosmétique, alimentaire et pharmaceutique (les fleurs de trèfle rouge traitent les rhumes et la grippe en réduisant les sécrétions nasales), comme certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales (Iserin *et al.*, 2001). Les différentes structures de bases des sous-classes des flavonoïdes sont regroupées dans le Tableau I.

Tableau I : Sous-classes des flavonoïdes et leurs structures de bases
(Harborne et Williams, 2000).

| Sous-classe | Structure de base |
|-------------|--|
| Flavonols |  |
| Flavones |  |
| Isoflavones |  |
| Flavanones |  |
| Flavan-3-ol |  |
| Anthocyanes |  |

1.3. Tanins

Le terme « *tanin* » provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux (Hopkins, 2003). Les tanins sont des métabolites secondaires de certaines plantes supérieures. Ils se retrouvent dans toutes les parties du végétal (racines, écorces, feuilles, ...). Ces molécules phénoliques sont utilisées par les plantes pour se protéger de certains parasites.

On distingue deux catégories :

- Les tanins condensés sont des polymères d'unités de flavonoïdes reliées par des liaisons fortes de carbone, sont non hydrolysables, mais peuvent être oxydés par les acides forts libérant des anthocyanidines (Hopkins, 2003).
- Les tanins hydrolysables sont des polymères à base de glucose qui forme avec les unités d'acide gallique des liaisons ester (Hopkins, 2003).

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure, elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal (Iserin *et al.*, 2001).

1.4. Lignines

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

2. Alcaloïdes

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, de caractère alcalin et de structures complexes (noyau hétérocyclique). Ils se trouvent dans plusieurs familles des plantes telles le café, le tabac.... La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont des drogues, comme la morphine (Figure 02), et d'autres sont toxiques (Wichtl et Anton, 2009).

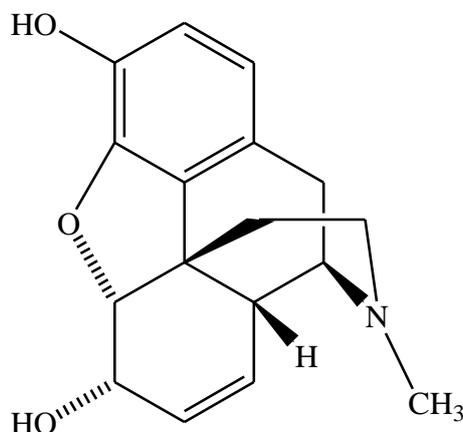


Figure 02 : Exemple d'alcaloïdes : la morphine (Osborn et Lanzotti, 2009).

Certains alcaloïdes sont utilisés comme moyen de défense contre les infections microbiennes (Nicotine, caféine, morphine, lupinine) (Hopkins, 2003) et comme molécules anti cancéreuses (vincristine et vinblastine) (Iserin *et al.*, 2001).

3. Terpènes

Les terpénoïdes sont une vaste famille de composés naturels de près de 15000 de molécules différentes avec un caractère généralement lipophile. Leur grande diversité est due à la variation du nombre d'unité de base : l'isoprène (C_5H_8)_n (Figure 03) qui rentre dans la chaîne principale dont sont distingués les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes... (Wichtlet Anton, 2009). Ces molécules ont diverses propriétés et peuvent être sous forme d'huiles essentielles qui se comporte en parfums et contribue dans le goût des aliments, des pigments (carotène), des hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol) (Hopkins, 2003).

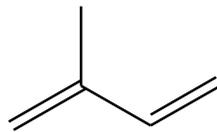


Figure 03 : Unité isoprénique (Osbourn et Lanzotti, 2009).

II. Propriétés biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques, appelés aussi composés phénoliques, sont issus de deux grandes voies métaboliques, la voie de l'acide shikimique et celle de l'acétate. Ce sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). La présence des composés phénoliques dans quasiment toutes les parties du végétal, lui confère une protection considérable en lui assurant une survie dans les différentes conditions environnementales. Ces métabolites sont doués de plusieurs rôles au sein de la plante dont sont cités : la lutte contre les agents pathogènes tels que les bactéries et les champignons ou autres comme les rayons UV et l'élévation de la température qui se traduit par l'accroissement de la teneur en composés phénoliques (Beloued, 1998). L'astringence donnée par les composés phénoliques est due à la précipitation des protéines salivaires (Mohammedi, 2006). La couleur de la plante due à la présence des substances organiques colorantes essentiellement la chlorophylle et les composés phénoliques (flavonoïdes, anthocyanes) qui couvrent une grande gamme de couleurs, du rouge à l'ultra-violet en passant par le jaune (Madi, 2010).

1. Propriété antioxydante

Dans les conditions normales, les radicaux libres sont produits en permanence avec de faibles quantités et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans ce cas, la balance oxydants/antioxydants est en équilibre et l'organisme se protège par différents systèmes antioxydants contre les radicaux formés. Si un déséquilibre se produit en faveur des oxydants, il y aura le phénomène de stress oxydatif qui est impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington), de désordre pathologique, mais également dans le phénomène du vieillissement (Pincemail *et al.*, 2002 ; Durand *et al.*, 2003).

L'effet antioxydant des plantes médicinales est dû à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001). En raison de ces activités, plusieurs actions leurs sont attribuées comme les activités antiallergiques, antiarthrogénique, anti-inflammatoire, antibactérienne...(Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2009).

Les composés phénoliques protègent contre les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'action : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes (Hodek *et al.*, 2002), soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont impliqués dans l'initiation des réactions radicalaires, soit par l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker *et al.*, 1996 ; Benavente-Garcia *et al.*, 1997).

2. Propriété anti-inflammatoire

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité. L'inflammation est un processus habituellement bénéfique ; son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires (Figure 04). Parfois, l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire (Schoroderet, 1992).

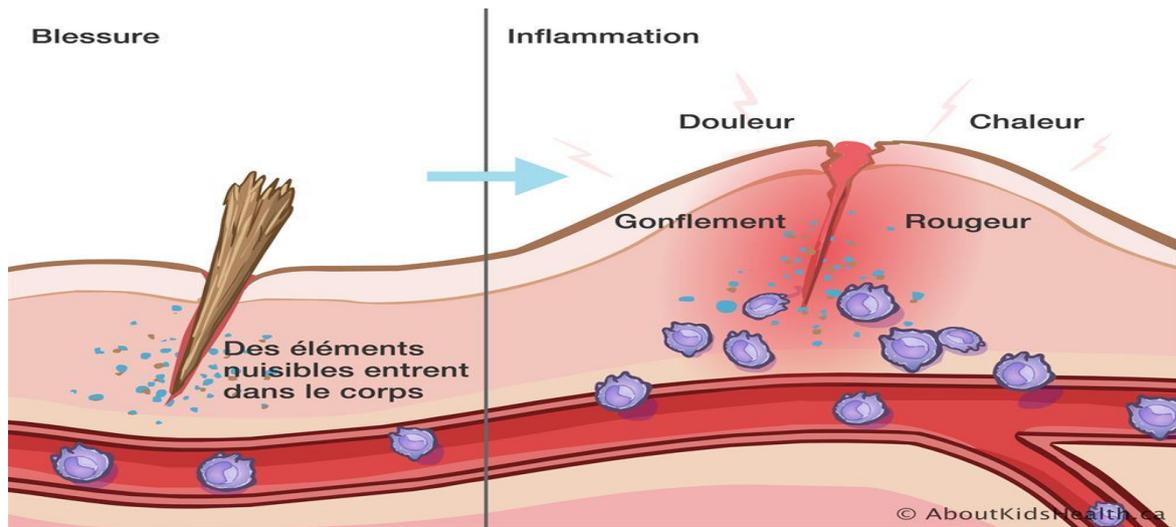


Figure 04 : Réponse inflammatoire (Anonyme 1, 2018).

Des études ont démontré que les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire par l'inhibition de l'enzyme NOS (nitrique oxyde synthase) responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation (Lahlah, 2008).

3. Activité antimicrobienne

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques. Ces derniers sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire. Les composés phénoliques notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis les microorganismes. Le mécanisme de toxicité est lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrase) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Billing et Sherman, 1998).

4. Activité diurétique

4.1. Diurèse

La diurèse est une fonction vitale pour l'être vivant par laquelle l'organisme excrète tous les déchets provenant de la combustion cellulaire, une fois qu'il a gardé les substances nécessaires pour se nourrir et produire de l'énergie, c'est la fonction de l'élimination (Hallouët et Borry, 2009).

4.2. Rappel physiologique du rein

Le rein est un organe qui pèse environ 250g (Figure 05) qui traite plus de 170 L de sang pour produire environ 1L d'urine. Il assure quatre rôles : le maintien de la composition en eau et en électrolytes du plasma, le contrôle de la pression artérielle, le contrôle de l'hématopoïèse grâce à la sécrétion d'érythropoïétine, la sécrétion de calcitriol provenant du métabolisme de la vitamine D3 (Touitou, 2007). Le rein est constitué d'une population d'organites élémentaires, les néphrons. Chaque rein contient environ un million de néphrons, dont chacun comporte deux parties : le glomérule de filtration, ayant un rôle capital dans le début de formation de l'urine primitive (filtrat du plasma) et le tube urinifère constitué du tube contourné proximal relié par l'anse de Henlé au tube contourné distal qui contribue progressivement à l'élaboration de l'urine définitive (Touitou, 2007).

La formation de l'urine passe par deux étapes : une filtration glomérulaire qui donne l'urine primitive ou ultra filtrat glomérulaire, résultant de l'ultra filtration du plasma circulant dans les capillaires glomérulaires et qui est libéré dans la capsule de Bowman (Moulin et Peraldi, 2007). Suivie d'un remaniement tubulaire pendant lequel certaines substances sont sécrétées ou réabsorbées aboutissant à l'urine définitive qui va s'écouler dans les tubes collecteurs (Querin et Valiquette, 2004).

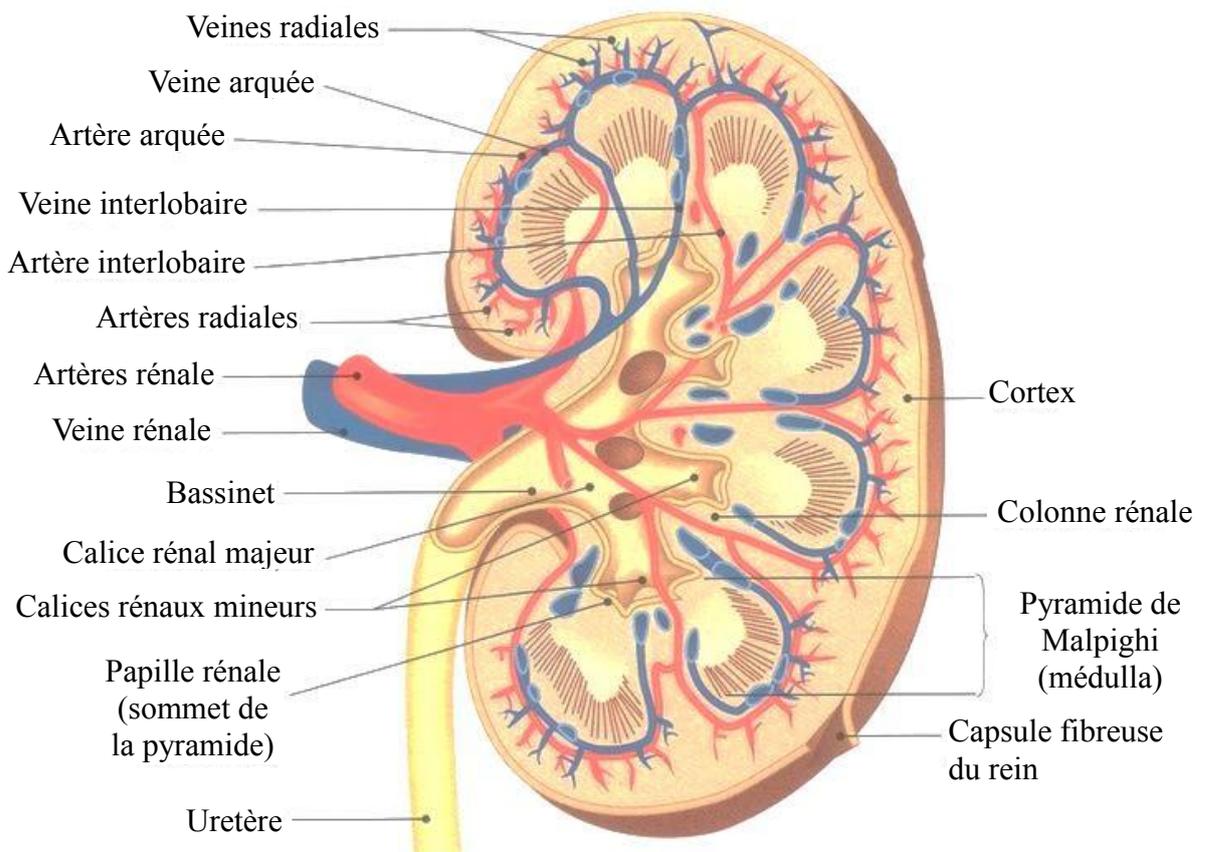


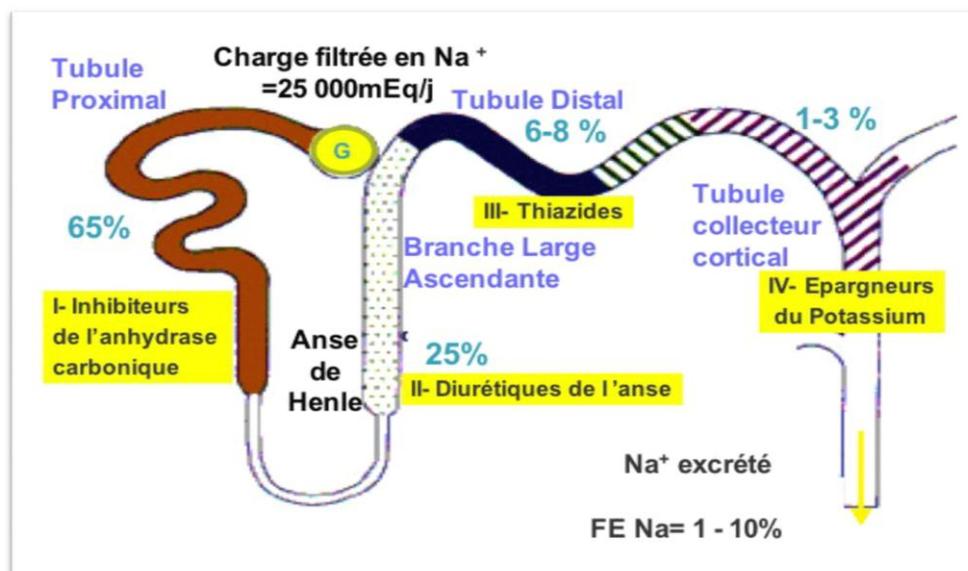
Figure 05 : Schéma d'une coupe longitudinale de rein représentant ses principales structures vasculaires et urinaires (Anonyme 2, 2018).

4.3. Diurétiques

Les diurétiques sont un groupe diversifié de composés chimiques, qui partagent la capacité à augmenter l'excrétion de sodium nette rénale (effet natriurétique). Les diurétiques cliniquement sont très importants, car le principal déterminant du volume de liquide extracellulaire est la teneur totale en sodium extracellulaire. Ainsi, pour être efficace dans la correction de volume du liquide extracellulaire, le volume plasmatique et la pression artérielle, les diurétiques doivent susciter la natriurèse, qui est peut être obtenue soit en diminuant la réabsorption du sodium tubulaire ou en augmentant la charge de sodium filtré ou encore par une combinaison de ces effets (Palmer ,1997 ; Okusa et Ellison, 2008 ; Donald et Warkentin, 2011).

Les diurétiques peuvent être divisés en quatre classes (Figure 06) selon le site d'action le long du néphron (Moulin et Peraldi, 2007) :

- **Les diurétiques proximaux** : ce sont les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (Acétazolamide) et les substances osmotiques (Mannitol).
- **Les diurétiques de l'anse** : furosémide (Lasilix), bumétamide (Burimex), pirétanide (Eurelix); ils inhibent la réabsorption de sodium dans la branche ascendante de l'anse de Henlé.
- **Les diurétiques thiazidiques** : ce sont des dérivées du benzothiazide, et sont donc des sulfamides : hydrochlorothiazide (Esidrex), chlortalidone (Hygroton), indapamide (Fludex). Ils inhibent la réabsorption de sodium sur la partie proximale du tube distal, au niveau du segment de dilution.
- **Les diurétiques du tube collecteur cortical** : ils regroupent l'amiloride (Modamide), et les antialdostérone, spironolactone (Aldactone), éplérénone (Inspra); ils ont en commun la capacité de s'opposer à l'échange Na/K.



FE Na = fraction excrétée de sodium

Figure 06 : Site d'action des diurétiques (Anonyme 3, 2018).

Les substances de synthèse employées pour stimuler la diurèse provoquent souvent des effets secondaires indésirables. Avec l'utilisation du furosémide ou de diurétique épargnant le potassium souvent des troubles électrolytiques sont observés. L'acidose plasmatique accompagnée d'hypokaliémie peut-être grave après un traitement avec les diurétiques inhibiteurs de l'anhydrase carbonique et leur effet extra rénal gênant (Beaux, 1991).

III. Généralités sur *Asplenium ceterach*

La plante qui fait l'objet de ce travail est appelée *Asplenium ceterach*, dénommée aussi Doradille ou encore Herbe dorée de la famille des Aspleniaceae dite en Kabyles « Tahchicht waman tassa », en arabe « Kessar lahjar » et *Arabian ceterach* ou bien Finger Fern en anglais.

Asplenium ceterach est une plante vivace de 5-15 cm, à souche courte, épaisse, gazonnante (Figure 07). Ses feuilles sont en touffe, roulées en crosse dans leur jeune âge, étalées, à pétiole court et couvert d'écailles, étroitement oblongues, pennatiséquées, à lobes courts, ovales-obtus, entiers ou crénelés, alternes, confluent, épais, glabres et verts en dessus, couverts en dessous d'écailles brillantes d'abord argentées puis roussâtres. La fructification est disposée à la face inférieure des feuilles en sores allongés, droits, épars, placés obliquement sur la nervure médiane, dépourvus d'indusie. Adaptée à la sécheresse ; par temps sec les feuilles s'enroulent et présentent les écailles qui limitent l'évapotranspiration. C'est une plante commune des rochers et vieux murs calcaires (Trewick *et al.*, 2004).

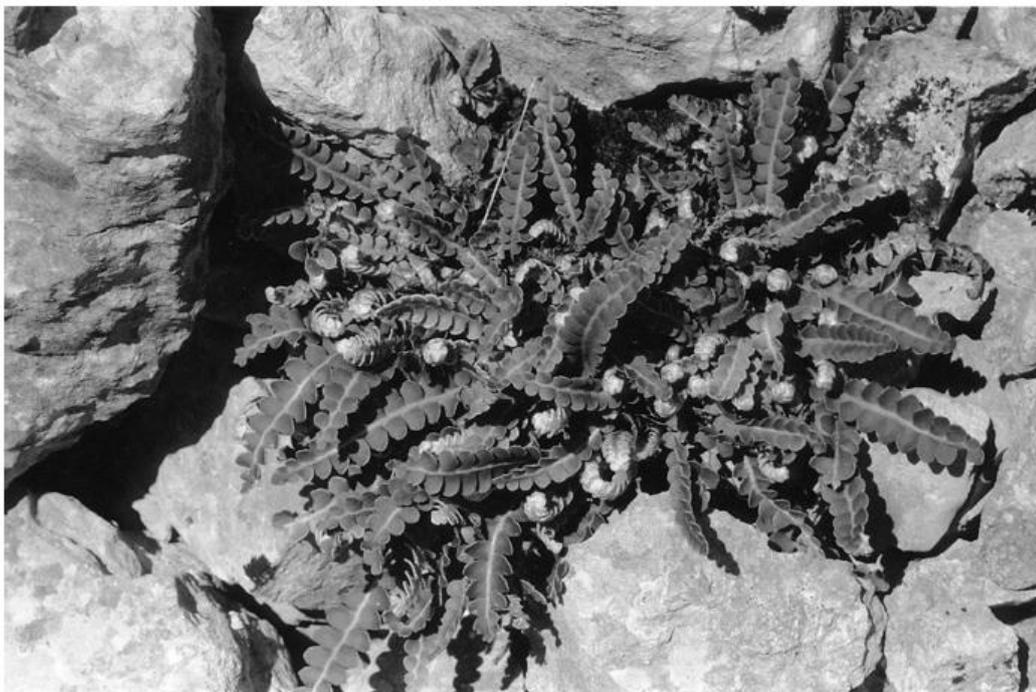


Figure 07 : Photographie de *Asplenium ceterach* (Trewick *et al.*, 2004).

La classification de *Asplenium ceterach* est donnée comme suit (Anonyme 4, 2018):

- Règne :** Plantae ;
- Sous-règne :** Tracheobionta ;
- Division :** Pteridophyta ;
- Classe :** Filicopsida ;
- Ordre :** Polypodiales ;
- Famille :** Aspleniaceae ;
- Genre :** *Asplenium* ;
- Espèce :** *Asplenium ceterach*.

La plante médicinale *Asplenium ceterach* est peu étudiée, néanmoins quelques propriétés et utilisations traditionnelles ont été rapportées comme son usage contre les calculs rénaux, la diarrhée, les troubles intestinaux, la névralgie ainsi que les troubles de la prostate et gastro-intestinaux (Karadeniz *et al.*, 2015). L'infusion, faite en faisant bouillir 20 g de plante entière dans 1 L d'eau pendant 20 min, est un excellent diurétique par prise de 2 à 3 tasses par jour (Antonone *et al.*, 1988). Il est publié dans le journal « The Lancet » que le traitement par une décoction de *Asplenium ceterach* fait partie des singularités thérapeutiques des calculs biliaires (The Lancet, 1887). Cette plante est douée également d'un potentiel antioxydant intéressant et des activités antimicrobiennes et protectrices contre les dommages de l'ADN (Berk *et al.*, 2011).

Expérimentation

I. Matériel et méthodes

Ce présent travail est porté sur l'étude du profil phénolique et les activités biologiques de *Asplenium ceterach*. Les différentes analyses sont déroulées durant une période de trois mois allant du mois de mars au mois de mai. L'extraction et la caractérisation des composés phénoliques totaux de la plante médicinale ainsi que son activité antimicrobienne sont réalisées au niveau des Laboratoires de la SARL Merinal de Dar El Bida-Alger. Les activités antioxydante et biologiques ainsi que l'élaboration de deux formes galéniques sont faites au Centre de Recherche et Développement de Saidal d'Alger au Gué de Constantine.

1. Matériel biologique

1.1. Matériel végétal

La présente étude est réalisée sur la partie aérienne de *Asplenium ceterach*, plante médicinale appelée localement « Tahchicht waman tassa » (Figure 08). La plante provient de la commune de Fenaïa Ilmaten de la willaya de Bejaïa (Figure 09) distante de 36 km du chef-lieu de la wilaya de Bejaïa. L'échantillon est récolté durant la période du mois de mars au mois d'avril de l'année 2017 sur une altitude de 400-450m.



Figure 08 : Photographie de *Asplenium Ceterach* dans son



Figure 09 : Site géographique du lieu de récolte de la plante.

1.2. Matériel microbiologique

Les souches bactériennes utilisées pour l'activité antimicrobienne de *Asplenium ceterach* sont isolées à partir de la banque des souches. Il s'agit de cinq souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *Salmonella sp.*) et deux champignons : une levure *Candida albicans* et une moisissure *Aspergillus brasiliensis*.

1.3. Matériel animal

Les activités biologiques de *Asplenium ceterach* sont réalisées sur les souris (Figure 10) pour l'activité anti-inflammatoire et sur les rats (Figure 11) pour l'activité diurétique qui sont fournis par le laboratoire de pharmacotoxicologie. Les caractéristiques des animaux sont montrées dans les tableaux II et III.



Figure 10 : Lot des souris Albinos

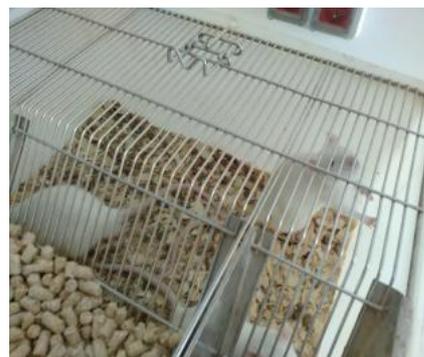


Figure 11 : Lot des rats Albinos Wistar

Tableau II : Caractéristiques des souris utilisées pour l'activité anti-inflammatoire

| Étude | Animal | Sexe | Poids | Nombre | Alimentation | Conditions d'hébergements |
|-----------------------------|----------------|------------------|--------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Activité anti-inflammatoire | Souris Albinos | Mâle/ Femelle | 26-28g | 15 souris réparties en trois lots | Granulés, Eau de ville | 20-24°C Éclairage : 10H/24H |

Tableau III : Caractéristiques des rats utilisés pour l'activité diurétique

| Étude | Animal | Sexe | Poids | Nombre | Alimentation | Conditions d'hébergements |
|---------------------|---------------------|------|----------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Activité diurétique | Rats Albinos Wistar | Mâle | 150-200g | 15 rats répartis en trois lots | Granulés, Eau de ville | 20-24°C Éclairage : 10H/24H |

2. Méthodes

L'ensemble des étapes de ce travail est représenté dans le schéma de la [figure 12](#).

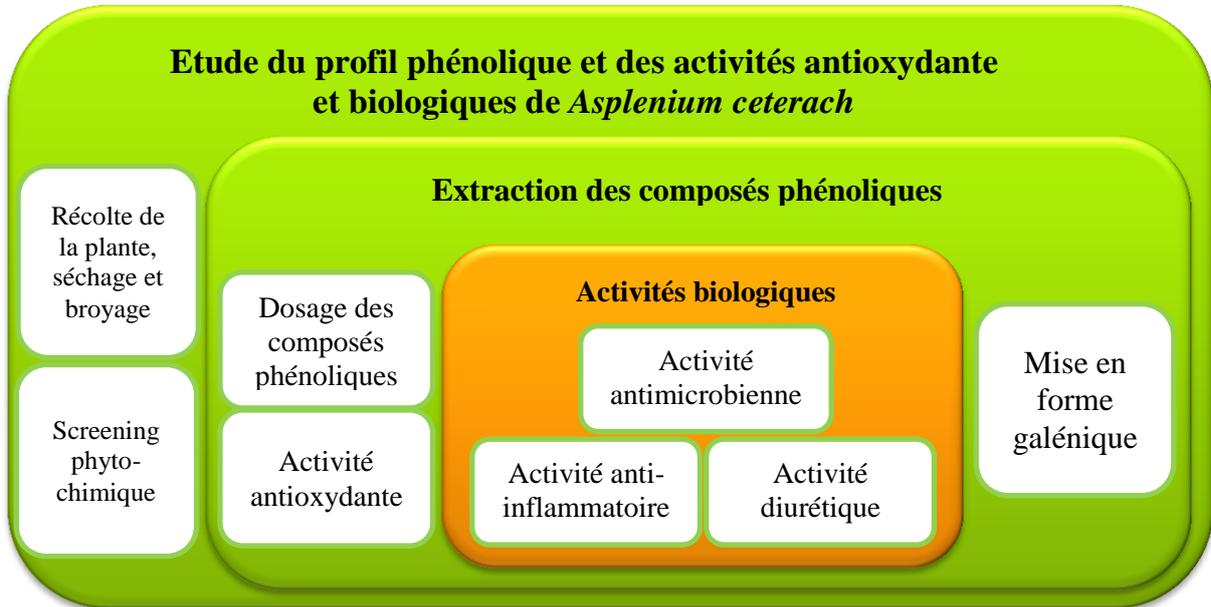


Figure 12 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du travail

2.1. Récolte, séchage et broyage de la plante médicinale

La partie aérienne de la plante récoltée est séchée à l'air libre et à l'abri du soleil et de l'humidité pendant 15 jours, cette étape est réalisée dans le but de diminuer la teneur en eau de la plante ([Figure 13](#)), réduisant ainsi les réactions d'altération chimique, enzymatique et bactérienne ainsi de permettre un broyage efficace.



Figure 13 : Photographie de *Asplenium ceterach* après séchage

La plante séchée est broyée et réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique à hélice (Philips, enapem®) puis tamisée à l'aide d'un tamis de mailles de 250 μm . La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'air et de l'humidité ([Figure 14](#)) et elle constitue la matière qui servira à la réalisation des différentes analyses du présent travail.



Figure 14 : Poudre végétale obtenue après broyage

2.2. Screening phytochimique de *Asplenium ceterach*

Le screening phytochimique est un ensemble de tests effectués soit sur la poudre soit sur l'infusé à 5% pour mettre en évidence la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires. La méthode de screening phytochimique utilisée est celle adoptée par [Tona *et al.* \(1998\)](#) et [Longaga *et al.* \(2000\)](#).

2.2.1. Préparation de l'infusé à 5%

L'infusé à 5% est préparée par l'addition de 5g de poudre à 100 ml d'eau distillée bouillante. Après 15-20 minutes, le mélange est filtré et le filtrat obtenu est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

2.2.2. Mise en évidence des anthocyanes

La mise en évidence de la présence des anthocyanes est effectuée suivant trois tests : le premier consiste à rajouter quelques gouttes d'HCl (Acide chlorhydrique) à 5 ml d'infusé. Le deuxième est réalisé par la mise en ébullition de 1g de poudre végétale dans 10ml d'éthanol pendant 10 min, après filtration, le zinc métallique ainsi que quelques gouttes d'HCl sont rajoutés au filtrat. Le troisième test consiste à rajouter quelques gouttes d'ammoniaque $\frac{1}{2}$ à 5 ml d'infusé. En présence d'anthocyanes, une coloration rouge se développe pour les deux premiers tests et une coloration bleue pour le troisième.

2.2.3. Mise en évidence des leucoanthocyanes

Une aliquote de 2g de poudre végétale sont ajoutés à 20 ml du mélange propanol/acide chlorhydrique (1/1), le mélange est mis dans un bain-marie bouillant pendant quelques minutes. Une coloration rouge se développe en présence des leucoanthocyanes.

2.2.4. Mise en évidence des tannins totaux

À 5 ml d'infusé, sont rajouter quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 5%. La réaction donne une coloration bleu noire en présence des tannins.

a. Tanins catéchiques

15 ml d'infusé sont additionnés à 7 ml du réactif de Stiany. La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchiques.

b. Tanins galliques

À 5 ml d'infusé, sont rajouter 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 . La réaction donne une coloration bleu foncée en présence des tanins galliques.

2.2.5. Mise en évidence des quinones

a. Quinones libres

2g de poudre végétale humectés par 2 ml d'acide chlorhydrique (1N) sont mis en contact pendant 3 heures avec 20 ml de chloroforme, puis le mélange est filtré. Le filtrat est mélangé avec 5 ml d'ammoniaque (1/2). La formation d'une coloration rouge indique la présence des quinones libres.

b. Quinones combinées

À 2g de poudre végétale sont additionnés 5 ml d'acide sulfurique (2 N) puis porter à reflux pendant 2 heures. La solution est filtrée et la poudre est réextraite par 20 ml de chloroforme. Le chloroforme est évaporé puis l'extrait sec est homogénéisé avec l'ammoniaque (1/2). La réaction donne une coloration rouge en présence de quinones combinées.

2.2.6. Mise en évidence des saponosides

Les saponosides sont mis en évidence par deux méthodes. Soit par introduction de 5ml d'HCl à 0,1 N et de 5ml de NaOH à 0,1 N dans deux fioles différentes. Ces deux dernières sont additionnées de 2 à 3 gouttes de l'infusé. La présence des saponosides se traduit par la formation des mousses. Soit par l'ajout de quelques gouttes d'acétate de plomb à 2 ml d'infusé, qui se manifeste par la formation d'un précipité blanc en présence de saponosides.

2.2.7. Mise en évidence des Alcaloïdes

Faire macérer 5g de poudre végétale humectés avec l'ammoniaque (1/2) pendant 24 heures dans 50 ml d'un mélange éther/chloroforme (3/1). Le filtrat est mélangé avec l'acide chlorhydrique 2N. Des réactions de précipitation sont effectuées sur la solution chlorhydrique. En présence d'alcaloïdes, le réactif de Dragendorff donne un précipité rouge.

2.2.8. Mise en évidence des coumarines

Faire bouillir à reflux 2g de poudre dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 minutes puis filtrer. À 5 ml du filtrat, sont ajoutés 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'HCl à 10%. Formation d'un trouble indique la présence des coumarines.

2.2.9. Mise en évidence des flavonoïdes

À 5 ml d'infusé, sont additionnés 5 ml d'HCl, un copeau de magnésium (Mg) et 1 ml d'alcool isoamylique. La réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.

2.3. Extraction et dosage des composés phénoliques de *Asplenium ceterach*

2.3.1. Extraction

L'extraction des composés phénoliques totaux est réalisée par macération de 1g de poudre végétale avec 10ml de solvant (méthanol grade HPLC) sous agitation magnétique pendant ½ heure. L'extrait est séparé de la poudre par filtration. La poudre est ré-extraite deux autres fois en utilisant 10ml du méthanol. Les trois filtrats récupérés sont mélangés et le solvant est éliminé par un évaporateur rotatif à 65°C (Température d'ébullition du méthanol).

2.3.2. Dosage des composés phénoliques totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

La teneur en composés phénoliques totaux est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu suivant [Singleton et Rossi \(1965\)](#). L'extrait méthanolique de la plante (200µl) et 500 µl de carbonate de sodium sont ajoutés à 750 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 60 min de réaction dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à

740 nm. Le contenu phénolique total est exprimé en μg par gramme de matière sèche suivant la courbe d'étalonnage réalisée par acide gallique ($y = 11,64x - 0,019$. $R^2 = 0,998$).

2.3.3. Dosage des composés phénoliques par HPLC-DAD

Le profil phénolique de *Asplenium ceterach* est déterminé par une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, Figure 15) avec un détecteur à barrettes de diodes (DAD) réglé à trois longueurs d'onde (280, 320 et 350 nm).



Figure 15 : Photographie de l'HPLC-DAD

Pour l'élution des composés phénoliques, une phase mobile constituée d'acide formique (A) et d'acétonitrile (B) est utilisée avec un débit de 1ml/min. Pour la phase stationnaire, il s'agit d'une colonne LiChrosorb RP-18 (250 x 4,0 mm, 5 μm). Le volume d'échantillon injecté dans la colonne est de 10 μl et le système est réglé à une température de 30°C. Le gradient d'élution utilisé est comme suit : 5% (B) : durant les deux premières minutes, 02-12 min : 5-95% (B), 12-12,2 min : 95-5% (B) et 5% (B) jusqu'à 20 min.

2.4. Activité antioxydante de *Asplenium ceterach*

L'activité antioxydante de la plante étudiée est évaluée par le radical libre diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH $^{\bullet}$). Un volume de 50 μl de différentes concentrations de l'extrait est ajouté à 950 μl de la solution méthanolique du DPPH $^{\bullet}$ fraîchement préparée puis l'absorbance est mesurée à 515 nm après 30min d'incubation à l'obscurité. Les résultats sont exprimés par la concentration inhibitrice à 50% (IC50) en utilisant la courbe de la régression linéaire du pourcentage de réduction de DPPH $^{\bullet}$ en fonction de la concentration de l'extrait de la plante (Braca *et al.*, 2001).

2.5. Activités biologiques de *Asplenium ceterach*

2.5.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne

La technique utilisée pour la caractérisation de l'activité antimicrobienne de l'extrait brute des composés phénoliques totaux de la plante étudiée est l'antibiogramme. C'est une méthode de diffusion en milieu gélosé standardisé par NCCLS (National Comite for Clinical Laboratory Standards) cité par [Celiktas et al. \(2007\)](#). Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance des agents bactériens.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne est réalisée comme suit :

- Préparation de la suspension bactérienne à raison de 0,5 Mc Farland mesuré à l'aide d'un densicheck
- Ensemencer par étalement à l'aide d'un râteau étaleur sur les milieux gélosés TSA pour les bactéries et Sabouraud pour les levures et moisissures
- À l'aide d'une pince stérile, placer les disques imprégnés d'extrait de la plante médicinale (différentes dilutions : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16)
- Incuber pendant 24h à 32°C pour les bactéries et à 22°C pendant 5 jours pour les levures et moisissures

2.5.2. Activité anti-inflammatoire

L'objet de ce test est de déterminer l'activité anti-inflammatoire de l'infusé de *Asplenium ceterach* selon le test de Levy ([Singh, 2010](#)).

- Principe

L'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire ([Figure 16-A](#)) de la patte de la souris ou l'application topique du xylène ([Figure 16-B](#)) sur l'oreille de la souris provoquent des réactions inflammatoires qui peuvent être réduites par un produit anti-inflammatoire.

La comparaison des réductions de l'œdème plantaire et topique après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence permet d'évaluer l'activité anti-inflammatoire.



Injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte gauche Application du xylène sur l'oreille droit

Figure 16 : Induction de l'inflammation

- Préparation de l'infusion et les agents inflammatoire et anti-inflammatoire

a- Préparation de l'infusé

Ajouter 100 ml d'eau bouillante à 20 g de poudre de la plante. Laisser infuser pendant 15 minutes et filtrer puis le volume du filtrat est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée (Bruneton, 2009).

b- Préparation de la solution de carragénine (agent inflammatoire plantaire)

Mettre 25 ml d'eau distillée dans un bécher, rajouter progressivement de la carragénine (0,5g), puis ajuster le volume à 50 ml avec de l'eau distillé.

c- Préparation de la solution d'Ibuprofène 200 (agent anti-inflammatoire)

Pour la préparation de cette solution, on utilise Ibuprofène 200 mg à la dose active qui est de 1200 mg/60kg. Sachant que le poids moyen des souris est de 20g, ainsi, la dose à administrer à chaque souris serait de 0,4 mg et chaque souris doit recevoir 0,5 ml de médicament. Donc, dissoudre un comprimé de 200mg dans 100 ml d'eau distillée puis ajuster le volume à 250 ml.

- Mode opératoire

Trois lots de 5 souris chacun sont constitués et sont traités comme suit :

a. Au temps T0

- Un lot témoin : chaque souris reçoit 0,5 ml d'eau distillée par voie orale.

- Un lot essai : chaque souris reçoit 0,5 ml d'infusé de la plante médicinale par voie orale (Figure 17).
- Un lot de référence : chaque souris reçoit 0,5 ml du produit de référence (Ibuprofène 200 mg) par voie orale.



Figure 17 : Administration de l'extrait de *Asplenium ceterach* par voie orale (gavage)

b. Au temps T0 + ½ heure

- Injecter un volume de 25µl de la solution de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souris.
- Appliquer 100µl du xylène pur sur l'oreille droite

N.B : La patte arrière droite et l'oreille gauche de chaque souris servent de contrôle.

c. Au temps T0 + 4h 30min

- Sacrifier les animaux par rupture de la nuque (Figure 18).
- Couper les deux pattes postérieures à hauteur de l'articulation ainsi que les deux oreilles.
- Chaque partie est pesée séparément en utilisant une balance analytique.



Figure 18 : Photographie du sacrifice des animaux par rupture de la nuque

- Calcul du pourcentage de réduction des œdèmes

Le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées (avec l'extrait de plante et d'Ibuprofène 200) par rapport aux témoins est calculé par la formule suivante (Singh, 2010):

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème du témoin} - \% \text{ de l'œdème de l'essai}}{\% \text{ de l'œdème du témoin}} \times 100$$

Sachant que :

Pour les pattes : $\% \text{ de l'œdème} = ((m_{pg}-m_{pd})/m_{pd}) \times 100$

Pour les oreilles : $\% \text{ de l'œdème} = ((m_{od}-m_{og})/m_{og}) \times 100$

Avec

m_{pg} : la moyenne des masses des pattes gauches, m_{pd} : la moyenne des masses des pattes droites.

m_{og} : la moyenne des masses des oreilles gauches, m_{od} : la moyenne des masses des oreilles droites.

2.5.3. Activité diurétique

- Principe

Le principe de cette étude consiste à mesurer le volume de l'excrétion urinaire chez les rats traités avec l'infusé de la plante, avec la Furosémide (un diurétique) ou avec l'eau physiologique.

- Mode opératoire

Trois lots de 5 souris chacun sont constitués et sont traités comme suit :

- Un lot témoin : chaque rat reçoit 50 ml/kg de solution physiologique (NaCl à 0,9%) par voie orale.
- Un lot essai : chaque rat reçoit 50 ml/kg du produit à tester (infusé de la plante) par voie orale.
- Un lot de référence : Chaque rat reçoit par voie orale 50 ml/kg du produit de référence (Furosémide 40mg)

Placer chaque rat dans une cage à métabolisme (Figure 19).

Mesurer la quantité d'urine excrétée toute les heures pendant 6 heures.

Figure 19 : Cage à métabolisme



- Méthode de calcul de l'excrétion urinaire volumétrique

L'excrétion urinaire volumétrique (EUV) est donnée par la formule suivante :

$$\text{EUV (\%)} = \frac{\text{volume recueilli (ml)}}{\text{volume administré (ml)}} \times 100$$

2.6. Mise en forme galénique

2.6.1. Formulation d'une pommade anti-inflammatoire

- Préparation de la phase huileuse

Dans un bécher de capacité de 500 ml, mettre l'huile de vaseline épaisse. Rajouter sous agitation (40trs/min) le myristate d'isopropyle pendant quelques minutes, puis rajouter le propylène glycol à une température de 50°C.

- Préparation de la phase aqueuse

La phase aqueuse est formée par l'infusé de plante. Une aliquote de 0,3g de la poudre de la plante (équivalent à 2 gélules) sont extrait par 20 ml d'eau distillée bouillante.

- Préparation de l'émulsion

La phase aqueuse est transférée dans la phase huileuse sous agitation par un ultraturax à une vitesse de 80 trs/min (Figure 20) jusqu'à l'obtention de l'aspect de la pommade requis.



Figure 20 : Homogénéisation par ultra-turax des deux phases huileuse et aqueuse de la pommade anti-inflammatoire.

2.6.2. Formulation d'un Supplément alimentaire diurétique

Afin d'exploiter l'effet positif de l'activité diurétique de *Asplenium ceterach*, une forme galénique en gélules est élaborée. Le remplissage des gélules, de poids unitaire de 0,15g de poudre de *Asplenium ceterach*, est réalisé à l'aide d'une géluleuse à l'échelle pilote et gélules ainsi formées sont conditionnées dans des flacons en verre fumés.

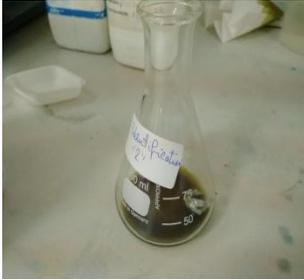
II. Résultats Et discussion

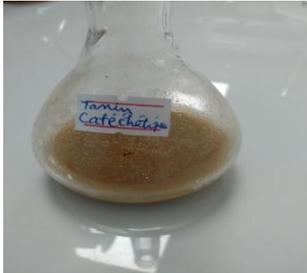
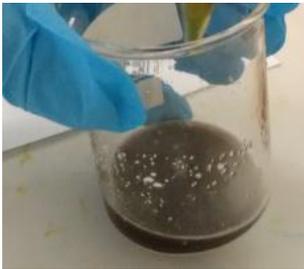
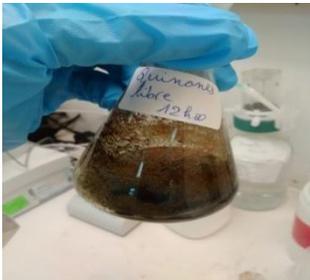
La partie des résultats et discussion est scindée en quatre sections. La première traite le screening phytochimique de la plante, la caractérisation qualitative et quantitative des composés phénoliques sont étudiées dans la deuxième, la troisième section étudie les activités antioxydante et biologiques : antimicrobienne, anti-inflammatoire et diurétique et enfin la formulation d'une pommade anti-inflammatoire et d'un supplément alimentaire diurétique à base de *Asplenium ceterach* est traitée dans la dernière section.

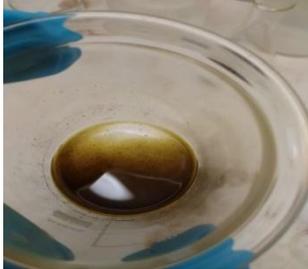
1. Screening phytochimique

Les résultats de la caractérisation phytochimiques réalisée sur l'infusé et la poudre végétale de la plante médicinale étudiée sont résumés dans le [tableau IV](#). Les tests indiquent que la plante *Asplenium ceterach* renferme de nombreuses classes de métabolites secondaires, dont les leucoanthocyanes et les tanins (catéchiques et galliques) sont les plus abondants. Les quinones libres, les coumarines et les flavonoïdes sont également présents avec des taux appréciables. Cependant, le screening phytochimique ne révèle pas la présence des anthocyanes, des quinones combinées, des saponosides ainsi que des alcaloïdes dans la plante étudiée.

Tableau IV : Résultats du screening phytochimique de *Asplenium ceterach*.

| Métabolites | Résultats | Photographies |
|-------------------------|-----------|---|
| Anthocyanes | - |  |
| Leucoanthocyanes | ++++ |  |

| | | |
|----------------------------------|-------------|---|
| <p>Tanins totaux</p> | <p>++++</p> |  |
| <p>Tanins catéchiques</p> | <p>++</p> |  |
| <p>Tanins galliques</p> | <p>+++</p> |  |
| <p>Quinones libres</p> | <p>++</p> |  |
| <p>Quinones combinées</p> | <p>-</p> |  |
| <p>Saponosides</p> | <p>-</p> | <p>/</p> |

| | | |
|---------------------------|-----------|--|
| <p>Alcaloïdes</p> | <p>-</p> |  |
| <p>Coumarines</p> | <p>++</p> |  |
| <p>Flavonoïdes</p> | <p>++</p> |  |

Avec :

(-) : Absence de métabolites

(+) : Faible teneur en métabolites

(++) : Moyenne teneur en métabolites

(+++): Forte teneur en métabolites

(++++): Très forte teneur en métabolites

2. Analyse quantitative et qualitative des composés phénoliques

Afin de déterminer la teneur en composés phénoliques de la plante médicinale étudiée, deux méthodes de dosage sont utilisées :

1. Dosage des composés phénoliques totaux par la méthode au Folin-Ciocalteu
2. Quantification et identification des composés phénoliques par HPLC-DAD

2.1. Teneur en composés phénoliques totaux

La méthode de dosage par la méthode au Folin-Ciocalteu est largement utilisée pour la quantification globale des composés phénoliques. Cette méthode se base sur la réaction d'oxydoréduction entre les groupements hydroxyles des composés phénoliques et les acides phosphotungstique et molybdique du réactif de Folin-Ciocalteu. La réduction de ce dernier provoque le changement de sa couleur du jaune-verdâtre au bleu.

Le résultat de dosage de la teneur en composés phénoliques totale de la plante étudiée a révélé une valeur de $7466,67 \pm 148,49 \mu\text{g/g MS}$.

2.2. Identification des composés phénoliques par HPLC-DAD

La méthode HPLC a permis d'identifier et de quantifier les composés phénoliques de *Asplenium ceterach*, en se référant aux temps de rétention et aux surfaces des pics des standards phénoliques.

Les figures 21, 22 et 23 représentent les chromatogrammes obtenus par HPLC aux longueurs d'ondes de 280, 320 et 350nm, respectivement.

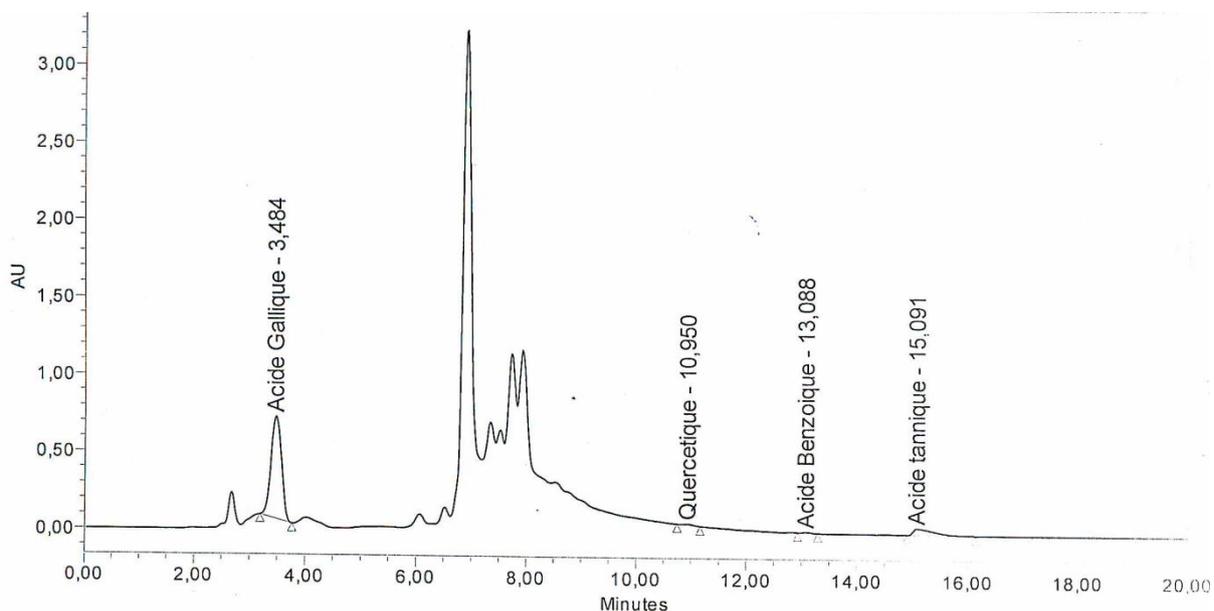


Figure 21 : Chromatogramme de l'extrait de *Asplenium ceterach* obtenu à 280 nm.

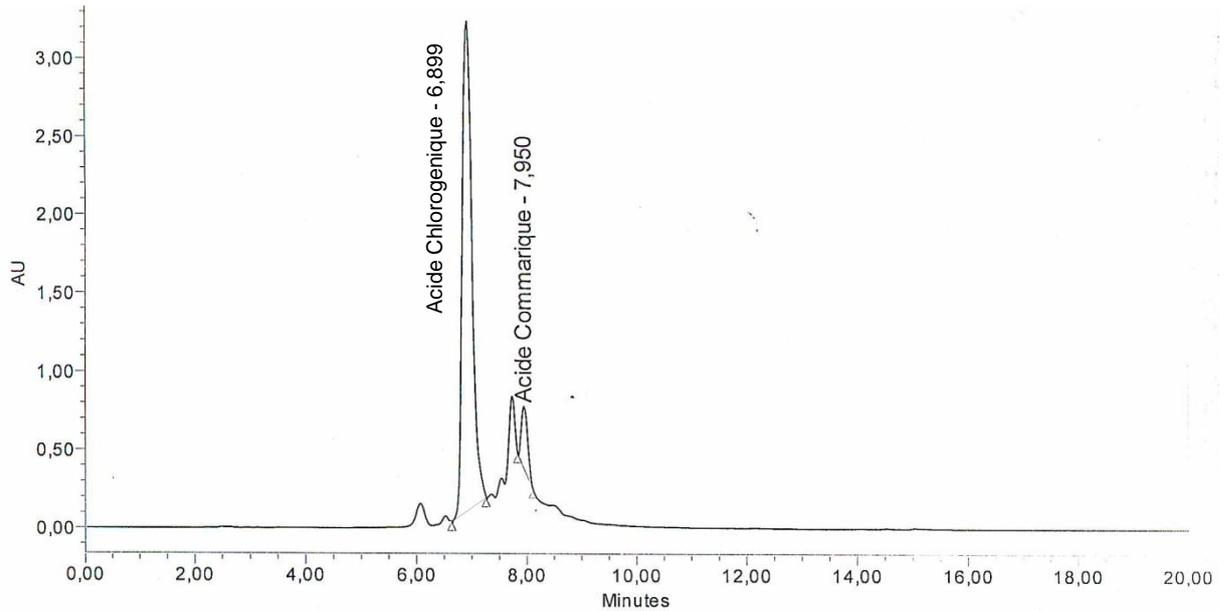


Figure 22 : Chromatogramme de l'extrait de *Asplenium ceterach* obtenu à 320 nm.

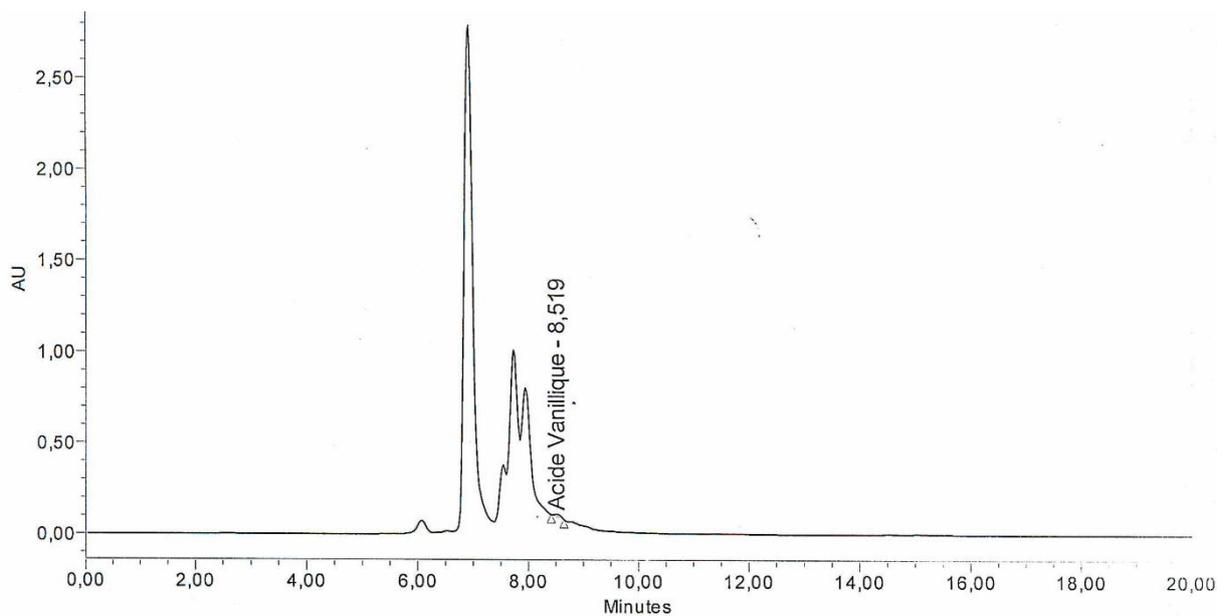


Figure 23 : Chromatogramme de l'extrait de *Asplenium ceterach* obtenu à 350 nm.

Les résultats de l'analyse chromatographique sont regroupés dans le tableau V. Sept composés phénoliques sont identifiés dans *Asplenium ceterach*. Cette dernière montre une teneur très élevée en acide chlorogénique (2818 μ g/g MS), suivi par l'acide gallique (830 μ g/g MS). Elle possède également des taux appréciables en acide vanillique (123 μ g/g MS) et en acide coumarique (101 μ g/g MS) ainsi que de faibles concentrations en quercétine et en acide benzoïque.

Le dosage des composés phénoliques de *Asplenium ceterach* par HPLC indique une teneur globale de (3926 μ g/g MS) cela montre la richesse de cette plante en composés phénoliques.

La comparaison des résultats de dosage des composés phénoliques en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et l'HPLC indique que la teneur obtenue par la première méthode est plus élevée par rapport à la deuxième. Cela pourrait être expliqué par le fait que le Folin-Ciocalteu mesure à travers la réaction d'oxydo-réduction tous les composés susceptibles de réduire le réactif (composés phénoliques, sucres réducteurs, acides aminés...) présent dans l'extrait, alors que la méthode chromatographique est plus précise du fait qu'elle cible le composé d'intérêt, malgré que de nombreux composés qui n'ont pas atteint le seuil de détection sont omis.

Tableau V : Identification et quantification des composés phénoliques de *Asplenium ceterach* par HPLC-DAD.

| Composés | Temps de rétention (min) | Longueur d'onde (nm) | Surface du pic | Concentration (μ g/g MS) |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Acides hydroxybenzoïques | | | | |
| Acide gallique | 3,484 | 280 | 8657895 | 829,56 |
| Acide vanillique | 8,519 | 350 | 112851 | 123,15 |
| Acide benzoïque | 13,088 | 280 | 51459 | 6,88 |
| Acide tannique | 15,091 | 280 | 1055650 | 32,14 |
| Acides hydroxycinnamiques | | | | |
| Acide chlorogénique | 6,899 | 320 | 29407706 | 2817,72 |
| Acide coumarique | 7,950 | 320 | 3204610 | 100,80 |
| Flavonoïdes | | | | |
| Quercétine | 10,950 | 280 | 88687 | 15,94 |
| Total | | | | 3926,19 |

3. Activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de l'extrait de la plante étudiée est réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Différentes concentrations de l'extrait de la plante sont préparées (60-240 μ g/ml) et sont testées contre la solution de DPPH. Les absorbances ainsi que les pourcentages de réduction de DPPH sont regroupés dans le [tableau VI](#).

Tableau VI : Activité antioxydante de *Asplenium ceterach* et pourcentage de réduction du DPPH

| Essai | Concentration de l'échantillon (µg/ml) | Absorbance à 515 nm | Pourcentage de réduction |
|------------------|--|---------------------|--------------------------|
| Contrôle | 0 | 0,599 | 0 |
| Abs ₁ | 60 | 0,47 | 21,54 |
| Abs ₂ | 120 | 0,374 | 37,73 |
| Abs ₃ | 180 | 0,298 | 50,25 |
| Abs ₄ | 240 | 0,214 | 64,27 |

Afin d'exprimer les résultats de l'activité antioxydante en IC50, une courbe de régression linéaire est tracée par les pourcentages de réduction de DPPH en fonction des concentrations de l'extrait (Figure 24). Il est constaté d'après la courbe, que les pourcentages d'inhibition du DPPH sont linéairement proportionnels à la concentration en extrait, cela est confirmé par la valeur élevée du coefficient de détermination ($R^2 = 0,988$).

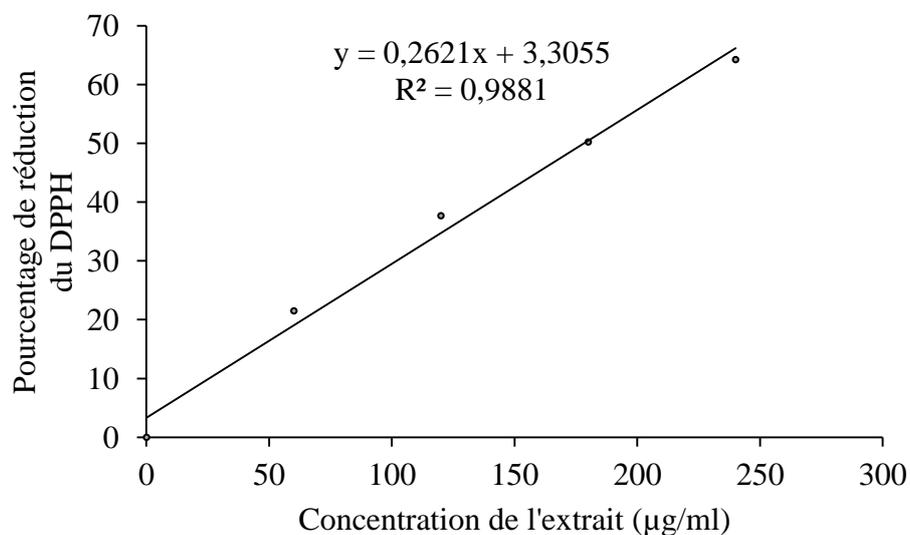


Figure 24 : Pourcentage de réduction du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de la plante

La concentration inhibitrice à 50% (IC50) est définie comme étant la concentration de l'extrait qui permet de réduire le pourcentage d'inhibition du DPPH à 50% et il est inversement proportionnel à la capacité antioxydante.

En utilisant l'équation de régression linéaire $Y=0,262x + 3,305$ avec $Y = 50\%$

$$\Rightarrow IC50 = \frac{50 - 3,305}{0,262} \Rightarrow IC50 = 187,23\mu\text{g/ml}$$

La plante *Asplenium ceterach* présente une IC50 de 187,23µg/ml.

4. Activités biologiques de *Asplenium ceterach*

4.1. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne, réalisée par la méthode d'antibiogramme, est testée sur 7 souches : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *E.coli*, *Salmonella sp.*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Le [tableau VII](#) regroupe les résultats de l'activité antimicrobienne.

Tableau VII : Résultats qualitatifs de l'activité antimicrobienne de l'extrait phénolique de *Asplenium ceterach*.

| Souches \ Dilution | Extrait brut | Dilution 1/2 | Dilution 1/4 | Dilution 1/8 | Dilution 1/16 |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | - | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | + | + | + | - | - |
| <i>E. coli</i> | + | + | + | - | - |
| <i>Salmonella sp.</i> | + | + | + | - | - |
| <i>Candida albicans</i> | - | - | - | - | - |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> | - | - | - | - | - |

Avec (-) : Croissance microbienne ; (+) : Inhibition de la croissance microbienne

L'extrait de *Asplenium ceterach* montre une activité antimicrobienne vis-à-vis trois souches : *Bacillus subtilis*, *E.coli* et *Salmonella sp.* jusqu'à la dilution de 1/4 correspondant à la concentration de 0,625µg/ml. Tandis que l'extrait de *Asplenium ceterach* ne présente pas une activité antimicrobienne contre les souches : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.

En terme de cette partie, il est évident que l'extrait phénolique de *Asplenium ceterach* exerce une activité inhibitrice sur certaines souches microbiennes réputées être résistantes. Cependant, une étude approfondie est nécessaire pour la détermination des concentrations minimales inhibitrice et microbicide.

4.2. Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de *Asplenium ceterach* est faite par induction d'une inflammation aigue sur les pattes et les oreilles des souris en utilisant le caragénine et le xylène, respectivement. L'inflammation est mesurée par la variation des poids des pattes et des oreilles suite à l'induction ou l'inhibition de la formation de l'œdème.

Quatre heures et demie après le traitement avec les solutions de caragénine et de xylène, les souris ont développé un œdème au niveau de leurs pattes gauches et oreilles droites. La différence des poids comparativement aux poids des pattes droites et des oreilles gauches non enflammés représente l'œdème formé.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire sont indiqués dans les [tableaux VIII](#) (témoin), [IX](#) (la plante *Asplenium ceterach*) et [X](#) (référence : traité par Ibuprofène 200 mg)

Tableau VIII : Résultats de l'activité anti-inflammatoire du témoin.

| Numéro de la souris | Poids des pattes Droites (g) | Poids des pattes gauches (g) | Poids des oreilles droites (g) | Poids des oreilles gauches (g) |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0,076 | 0,115 | 0,047 | 0,023 |
| 2 | 0,062 | 0,109 | 0,044 | 0,031 |
| 3 | 0,089 | 0,103 | 0,054 | 0,028 |
| 4 | 0,084 | 0,125 | 0,05 | 0,03 |
| 5 | 0,068 | 0,095 | 0,043 | 0,033 |
| La moyenne | 0,076 | 0,109 | 0,048 | 0,029 |
| % de l'œdème | 44,33% | | 64,14% | |

Tableau IX : Résultats de l'activité anti-inflammatoire de *Asplenium ceterach*.

| Numéro de la souris | Poids des pattes droites (g) | Poids des pattes gauches (g) | Poids des oreilles droites (g) | Poids des oreilles gauches (g) |
|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0,120 | 0,157 | 0,045 | 0,028 |
| 2 | 0,138 | 0,169 | 0,050 | 0,038 |
| 3 | 0,125 | 0,174 | 0,057 | 0,030 |
| 4 | 0,133 | 0,160 | 0,031 | 0,033 |
| 5 | 0,118 | 0,163 | 0,037 | 0,033 |
| La moyenne | 0,127 | 0,165 | 0,044 | 0,032 |
| % de l'œdème | 29,81 | | 35,91 | |
| % de réduction de l'œdème | $(44,33-29,81)/44,33 = 32,75\%$ | | $(64,14-35,91)/64,14 = 44,01\%$ | |

Tableau X : Résultats de l'activité anti-inflammatoire de la référence.

| Numéro de la souris | Poids des pattes droites (g) | Poids des pattes gauches (g) | Poids des oreilles droites (g) | Poids des oreilles gauches (g) |
|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0,13 | 0,16 | 0,239 | 0,195 |
| 2 | 0,12 | 0,16 | 0,192 | 0,148 |
| 3 | 0,125 | 0,17 | 0,211 | 0,128 |
| 4 | 0,15 | 0,2 | 0,168 | 0,148 |
| 5 | 0,17 | 0,155 | 0,239 | 0,177 |
| La moyenne | 0,139 | 0,169 | 0,2098 | 0,1592 |
| % de l'œdème | 21,58 | | 31,78 | |
| %de réduction de l'œdème | $(44,33-21,58)/44,33 = 51,32\%$ | | $(64,14-31,78)/64,14=50,45\%$ | |

Les pourcentages de développement de l'œdème chez les souris témoin sont de 44,33% (les pattes) et de 64,14% (les oreilles). Chez les souris du groupe traité avec 0,5ml d'infusé de la plante, une réduction très significative des poids est constaté, par conséquent, des pourcentages intéressants de réduction des œdèmes des pattes et des oreilles sont enregistrés avec 32,75 et 44,01%, respectivement.

Les souris traitées avec l'Ibuprofène 200 mg ont montré une réduction de l'inflammation d'environ de 50% pour les pattes et les oreilles. En vue de ces résultats, la plante étudiée montre une activité anti-inflammatoire comparable à celle de la référence, en particulier pour l'inflammation topique, et mérite de la considérer comme plante anti-inflammatoire.

4.3. Activité diurétique

L'activité diurétique de *Asplenium ceterach* est testée sur des rats. Et afin de monter ladite activité, deux autres lots sont étudiés dont le premier est traité par une solution saline à 0,9% (témoin) et l'autre par un médicament avec le principe actif le Furosémide dosé à 40mg (référence). Les résultats de l'activité diurétique sont résumés dans les [tableaux XI](#) (*Asplenium ceterach*), [XII](#) (témoin) et [XIII](#) (référence : Furosémide)

Les données indiquées dans les tableaux montrent une variation du volume urinaire en fonction du rat et du temps. La mesure des volumes urinaires globaux montre que le traitement avec l'infusé de *Asplenium ceterach* a donnée l'activité diurétique la plus élevée, avec un volume de 7,1ml, comparativement au témoin (5,8ml) et à la référence

(5,7ml). Cela est appuyé par les pourcentages d'excrétion urinaire volumétrique qui sont respectivement de 83,53%, 77,33% et 76,00%.

Tableau XI : Résultats de l'activité diurétique de *Asplenium ceterach*.

| | H ₁ | H ₂ | H ₃ | H ₄ | H ₅ | H ₆ | Somme |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| R₁ | 0,5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 5,50 |
| R₂ | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1,5 | 7,50 |
| R₃ | 0 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 | 6,00 |
| R₄ | 2 | 2,5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 6,50 |
| R₅ | 0 | 2 | 4 | 1 | 2 | 1 | 10,00 |
| Moyenne | 1,3 | 1,9 | 1,8 | 1 | 0,6 | 0,5 | 7,10 |
| EUV% | 15,29 | 22,35 | 21,18 | 11,76 | 7,06 | 5,88 | 83,53% |

R : Rat, H : Heure, EUV% : Excrétion Urinaire Volumétrique

Tableau XII : Résultats de l'activité diurétique du témoin.

| | H ₁ | H ₂ | H ₃ | H ₄ | H ₅ | H ₆ | Somme |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| R₁ | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 6,00 |
| R₂ | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 6,00 |
| R₃ | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 1 | 9,00 |
| R₄ | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4,00 |
| R₅ | 1 | 0,5 | 0,5 | 0 | 1 | 1 | 4,00 |
| Moyenne | 1,8 | 1,3 | 0,1 | 1 | 1 | 0,6 | 5,80 |
| EUV% | 24,00 | 17,33 | 1,33 | 13,33 | 13,33 | 8,00 | 77,33% |

R : Rat, H : Heure, EUV% : Excrétion Urinaire Volumétrique

Tableau XIII : Résultats de l'activité diurétique de la référence.

| | H ₁ | H ₂ | H ₃ | H ₄ | H ₅ | H ₆ | Somme |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| R₁ | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 5,00 |
| R₂ | 0,5 | 1 | 2,5 | 2 | 0 | 0 | 6,00 |
| R₃ | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 6,00 |
| R₄ | 0,5 | 2 | 3,5 | 2 | 0 | 0 | 8,00 |
| R₅ | 0 | 0 | 2 | 1,5 | 0 | 0 | 3,50 |
| Moyenne | 0,2 | 1 | 2,6 | 1,5 | 0,2 | 0,2 | 5,70 |
| EUV% | 2,67 | 13,33 | 34,67 | 20,00 | 2,67 | 2,67 | 76,00% |

R : Rat, H : Heure, EUV% : Excrétion Urinaire Volumétrique

Les pourcentages d'excrétion urinaire volumétrique en fonction du temps sont représentés dans le graphique de la [figure 25](#). Il est constaté que la plante étudiée présente une meilleure activité diurétique entre la deuxième et la troisième heure de l'administration, suivie d'une diminution progressive. L'eau physiologique induit une excrétion importante au début et à la fin. Tandis que, l'utilisation du Furosémide se manifeste par un pic d'excrétion à la troisième heure.

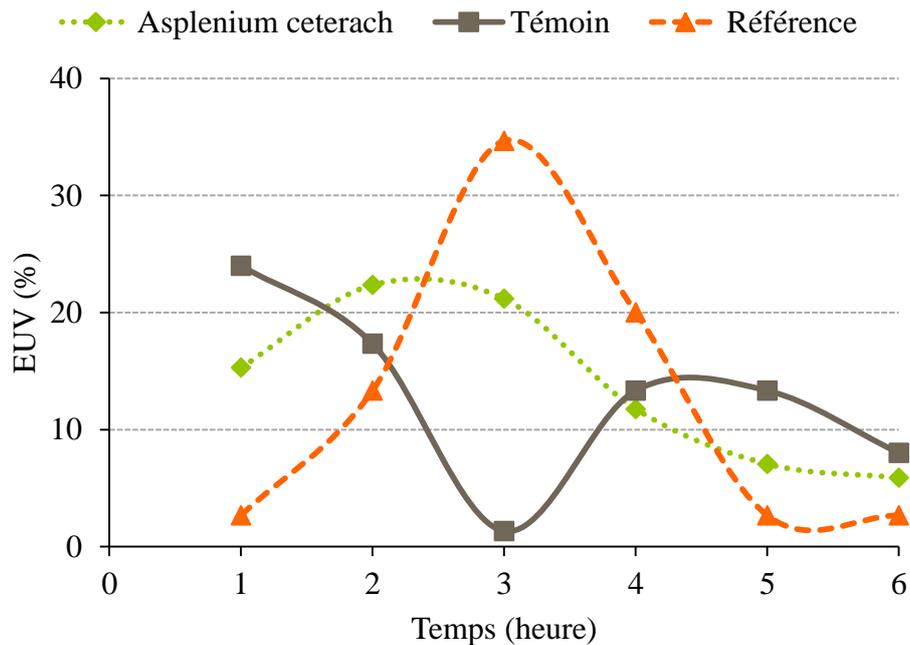


Figure 25 : Pourcentages d'excrétion urinaire volumétrique en fonction du temps.

5. Mise en forme galénique

5.1. Formulation d'une pommade anti-inflammatoire

D'après les résultats positifs obtenus dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire, en particulier contre l'inflammation topique, une production d'une pommade anti-inflammatoire pour une application cutanée serait plus adéquate. Pour cela, une tentative d'élaborer une pommade au niveau des laboratoires de Saidal est opérée. Le mélange des différents ingrédients avec l'infusé de la poudre de *Asplenium ceterach* donne une impulsion d'un aspect homogène et cela est confirmé par la prise de photographies ([Figure 26](#)).

Il serait souhaitable pour cette partie de tester la pommade anti-inflammatoire élaborée et d'évaluer son efficacité *in vivo*, malheureusement, la durée du stage est écoulée. Néanmoins, le test de cette pommade sur certaines personnes proches et sur moi-même a donné des indices éminents.

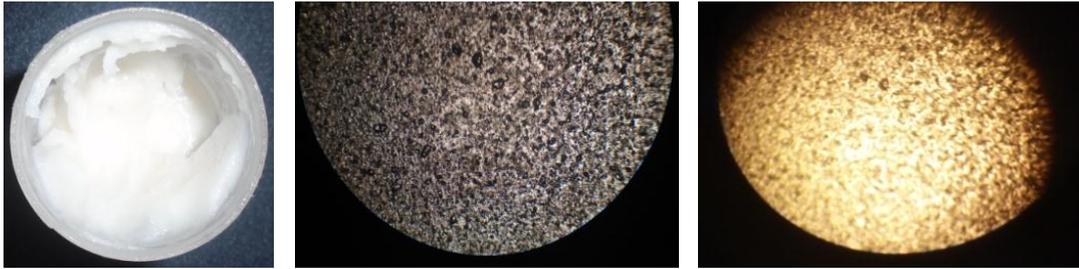


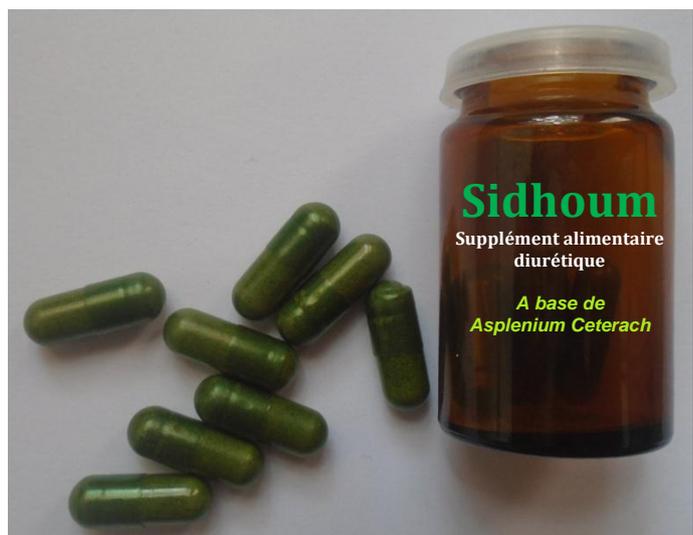
Figure 26 : Aspect de la pommade à l'œil nu (à gauche) et sous microscope optique (au milieu en noir et blanc et à droite en couleur) (*Grossissement 10x40*).

5.2. Formulation d'un Supplément alimentaire diurétique

Vu les résultats de l'activité diurétique prometteurs de *Asplenium ceterach*, un Supplément alimentaire à base de la poudre de plante est élaboré. Pour une meilleure protection de la substance active de la plante médicinale, le Supplément alimentaire est encapsulé dans des gélules de masse unitaire de 0,15g et destiné pour les personnes souffrantes de douleurs en leur facilitant ainsi la sécrétion urinaire. L'appellation de ce Supplément alimentaire que nous avons choisie de donnée est « *Sidhoum* » relativement à l'étudiante Sidhoum Rekia qui a mis en relief cette propriété de la plante *Asplenium ceterach* et ayant développé ce supplément alimentaire (Figure 27).

Vu la durée insuffisante du stage et malgré les résultats intéressants des activités anti-inflammatoire et diurétique de *Asplenium ceterach*, des tests sur les deux produits formulés (stabilité, posologie, toxicité...) ainsi que des essais sur l'Homme sont nécessaires dans l'avenir.

Figure 27 : Supplément alimentaire diurétique élaboré : *Sidhoum*.



Conclusion

Conclusion

La présente investigation fixe comme objective l'étude de la composition phénolique, les activités biologiques ainsi que la mise au point de deux formes galéniques (un anti-inflammatoire topique et un Supplément alimentaire diurétique) à base de *Asplenium ceterach*.

Les résultats du screening phytochimique révèlent la présence de quelques groupes chimiques : Leucoanthocyanes, tanins totaux (galliques et catéchiques), quinones libres, des coumarines et des flavonoïdes. Le dosage des composés phénoliques totaux par la méthode au Folin-Ciocalteu montre une teneur de 7467 $\mu\text{g/g}$ MS indiquant la richesse de *Asplenium ceterach* en ces molécules bioactives. Cela est traduit par une forte activité antioxydante dont la concentration inhibitrice à 50% de DPPH \cdot est de 187 $\mu\text{g/ml}$.

L'analyse de l'extrait méthanolique par HPLC montre la présence de sept composés phénoliques : quatre acides hydroxybenzoïques, deux acides hydroxycinnamiques et un flavonoïde. La teneur globale en composés phénoliques de *Asplenium ceterach* obtenue par HPLC est de 3926 $\mu\text{g/g}$ MS dont l'acide chlorogénique est l'acide phénolique le plus dominant dans *Asplenium ceterach* avec une teneur de 3926 $\mu\text{g/g}$ MS, suivie par l'acide gallique (830 $\mu\text{g/g}$ MS), cela démontre la richesse de cette plante en composés phénoliques.

À travers l'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne, *Asplenium ceterach* exhibe une activité antimicrobienne vis-à-vis les trois souches *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Salmonella sp.*

Les tests pharmacologiques réalisés *in vivo* chez les souris et les rats démontrent que *Asplenium ceterach* possède une activité anti-inflammatoire comparable à celle de l'Ibuprofène, en particulier pour l'inflammation topique, et mérite de la considérée comme plante anti-inflammatoire, et aussi une activité diurétique intéressante qui témoigne que *Asplenium ceterach* pourrait être proposé comme un supplément alimentaire pour son effet diurétique.

Les résultats obtenus lors de cette investigation sont très prometteurs et dans les perspectives d'approfondir cette étude il serait intéressant d'effectuer des analyses sur les deux formulations galéniques obtenues et de réaliser des essais sur l'Homme. Il serait également souhaitable de rechercher la (es) molécule(s) responsable(s) sur les activités anti-inflammatoire et diurétique et d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets.

Références bibliographiques

- Antonone R., De Simone F., Morrica P. & Ramundo E. 1988. Traditional phytotherapy in the Roccamonfina volcanic group, Campania, Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology*. 22(3), 295–306.
- Bardeau F. 2009. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Edit. Fermand Lanore. p.315
- Beaux D. 1991. Etude pharmacologique des propriétés diurétiques d'extraits d'Orthosiphon, de piloselle, de 'Sureau noir, de Fenouil doux et de Busserole chez le rat. Thèse de doctorat, METZ, France, p. 284.
- Belouad A. 2001. Plantes médicinales d'Algérie. Office des Publications Universitaires, Alger. pp. 5–10.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A. & Del Rio J.A. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 4505–4515.
- Benghanou M. 2012. La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, institut de formation paramédical CHETTIA (Alger). p. 56.
- Berk S., Tepe B., Arslan S. & Sarikurkcu C. 2011. Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Asplenium ceterach* DC. *African Journal of Biotechnology*. 10(44), 8902–8908.
- Billing J. & Sherman P.W. 1998. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology* 73(1), 3–49.
- Braca A., Tommasi N.D., Bari L.D., Pizza C., Politi M. & Morelli I. 2001. Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *Journal of Natural Pzhccdroducts*. 64, 892–895.
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Éditions Tec & Doc, Paris, éditions médicales internationales. pp. 483–560.
- Bruneton J. 2009. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales, 4^{ème} édition de médicales internationales (Tec et Doc), Paris. p. 1288.
- Celiktas O.Y., Bedir E. & Vardar Sukan, F. 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*. 101, 1457–1464.
- Donald L. & Warkentin M.D. 2011. Diurétiques. *Health Link*. 811, 1–2.

- Durand G., Polidori A. & Pucci B. 2003. La vectorisation de pièges à radicaux libres. L'actualité chimique. 26–29.
- Ghabrier J.Y. 2010. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France). P. 165.
- Hallouët P. & Borry A. 2009. Bilan des entrées et des sorties, la diurèse. Mémoguide de biologie et de physiologie humaine. 186–191.
- Harborne J.B. & Williams C.A. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*. 55, 481–504.
- Hodek P., Trefil P. & Stiborová M. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*. 139(1), 1–21.
- Hopkins W.G. 2003. *Physiologie végétale*. 2^{ème} édition américaine, de Boeck et Lancier S. A. Paris. p. 514.
- Iserin P. 2001. *Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soins*. Larousse, Paris. p. 335.
- Karadeniz A., Çinbilgel İ., Gün S.Ş. & Çetin A. 2015. Antioxidant activity of some Turkish medicinal plants. *Natural product research*. 29(24), 2308–2312.
- Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C. & Abdelly C. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 2083–2091.
- Lahlah F.Z. 2008. Extraction des flavonoïdes par le butanol, chloroforme à partir *Silybum marianum*, et étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de magistère, université Mentouri Constantine. p. 144.
- Longaga O.A., Vercruyse A. & Foriers A. 2000. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plant in the treatment of dysentery and diarrhoea in *Lomela area*. *Journal of Ethnopharmacology*. 71(3), 411–423
- Madi A. 2010. Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère, université Mentouri Constantine. p. 98.

- Middleton E. J.R., Kandaswami C. & Heoradies T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells. Implications for Inflammation, HeartDisease and Cancer. *Pharmacology Review*. 52, 673–751.
- Mohammedi Z. 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magistère de l'université Abou Bakrbelkaid de Tlemcen. p. 104.
- Moulin B. & Peraldi M.N. 2007.Éléments de physiologie rénale. In *néphrologie*. Ellipses, Paris. pp.13–22.
- Nijveldt R.J., Nood E., Hoorn D., Boelens P., Norren K. & Leeuwen P. 2001. Flavonoids. A review of probable action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*. 74, 418–425.
- Okusa M.D. & Ellison D.H. 2008. Physiology and pathophysiology of diuretic action. Seldin and Giebisch's *The Kidney* (4th Edition). *Physiology and Pathophysiology*. 1051–1094.
- Osborn A.E. & Lanzotti V. 2009. Plant-derived naturels products synthesis, function and application. Edition Springer, New York. pp. 11–35.
- Palmer B.F. 1997. Diuretic Agents. *Clinical Physiology and Pharmacology*, 171–185.
- Pelt J.M. 1980. Les drogues, leur histoire et leurs effets. Édition Doin, Paris. p. 221.
- Pincemail J. Bonjean K. Cayeux K. & Defraigne J.O. 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition, Clinique et Métabolisme*.16. pp. 233–239.
- Querin S., Valiquette L., Runo P. & Cote J. 2004. Anatomie et histologie du rein, des voies urinaires et des organes génitaux masculin in: *la néphrologie et neurologie*, EDISSEM, Maloine, Canada. pp. 3–18.
- Sanago R. 2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako (Mali). p. 53.
- Sarni-manchado P. & Veronique C. 2006. Les composés phénoliques en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France). p. 398.
- Schmidt B.M. 2012. Responsible use of medicinal plants for cosmetics. *HortScience*. 47(8), 985–991.
- Schoroderet M. 1992. Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Volume 2. Edition, Office des publications universitaires (Alger). pp. 523–530

- Singh M., Kumar V., Singh I., Gauttam V. & Kalia A.N. 2010. Anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Mirabilis jalapa* Linn. leaves. *Pharmacognosy research*. 2(6), 364–367.
- Singleton V.L. & Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 16(3), 144–158.
- Tacouri D.D., Ramful-Baboolall D. & Puchooa D. 2013. *In vitro* bioactivity and phytochemical screening of selected spices used in Mauritian foods. *Asian Pacific journal of tropical disease*. 3(4), 253–261.
- Teuscher E., Anton R. & Lobstein A. 2005. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Tec & Doc. Paris, p. 522.
- The Lancet. 1887. The annus medicus. pp. 1-16.
- Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K. & Vlietinck A.J. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 61(1), 57–65.
- Toutou I. 2007. Antihypertenseurs. *Pharmacologie*. 11ème édition. pp. 236–240
- Trewick S.A., Morgan-Richards M. & Chapman H.M. 2004. Chloroplast DNA diversity of *Hieracium pilosella* (Asteraceae) introduced to New Zealand: reticulation, hybridization, and invasion. *American Journal of Botany*. 91(1), 73–85.
- Van Acker S.A., Van Den Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., Bennenkom W.P., Van Der Vijgh W.J & Bast A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*. 20, 331–342.
- Wichtl M. & Anton R. 2009. *Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Édition LAVOISIR, Paris. pp. 38–41.
- Anonyme 1. 2018.
<https://www.aboutkidshealth.ca/Article?contentid=926&language=French> (consulté le 10/06/2018).
- Anonyme 2. 2018. <https://www.toutsurlatransfusion.com/transfusion-sanguine/medecine-transfusionnelle/organes-et-le-sang.php> (consulté le 10/06/2018).
- Anonyme 3. 2018. <http://cuen.fr/lmd/spip.php?article150> (consulté le 10/06/2018).
- Anonyme 4. 2018. https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/84472/tab/taxo (consulté le 10/06/2018).

Annexe

Préparation des solutions pour le screening phytochimique

1- Préparation de l'ammoniaque 1/2 :

Prendre 30 ml d'ammoniaque + 60 ml d'eau distillée.

2- Préparation du HCl à 10% :

20 ml d'HCl sont ajustés à 200 ml avec l'eau distillée.

3- Préparation du KOH à 10% :

10 g KOH est ajusté à 100 ml avec d'eau distillée (bien agiter).

4- Fer chlorure anhydrique à 5% :

5 g de FeCl_3 sont ajustés à 100 ml avec d'eau distillée.

5- Ether chloroforme (3/1) :

60 ml d'éther sont ajoutés à 20 ml avec le chloroforme (Trichloromethane)

6- Préparation de Réactif de drangendroff :

Solution a : 0,85 g de nitrate de bismuth + 40 ml d'eau distillé +10 ml d'acide acétique.

Solution b : 8 g d'iode de potassium + 2 ml d'eau distillé.

-Les deux solutions a et b (15 ml) sont mélangées avec 20 ml d'acide acétique puis le volume est complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

7- Préparation de réactif de stiansy :

2 volumes de formol (50 ml) + 1 volume de HCl 1N (25 ml)

Résumé

L'utilisation des plantes médicinales pour se soigner a suscité la curiosité de nombreux chercheurs et a fait l'objet de plusieurs recherches. L'objectif visé par cette étude est l'analyse phénolique ainsi que l'étude des propriétés biologiques de *Asplenium ceterach*. Les résultats de cette étude révèlent la richesse de *Asplenium ceterach* en métabolites secondaires. Le dosage des composés phénoliques par le réactif Folin-Ciocalteu indique une concentration de 7467µg/g MS. La mesure de l'activité antioxydante montre une concentration inhibitrice à 50% de DPPH[·] de 187,23µg/ml. L'analyse chromatographique des composés phénoliques de l'extrait de la plante indique la présence de sept composés phénoliques avec une teneur globale de 3926µg/g MS dont $\frac{3}{4}$ est présenté par l'acide chlorogénique. Les résultats des activités biologiques montrent que *Asplenium ceterach* est douée de propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire et diurétique. Par conséquent, deux formes galéniques ont été mises au point, une pommade anti-inflammatoire et un Supplément alimentaire diurétique.

Mots clés : *Asplenium ceterach*, composés phénoliques, activités biologiques, activité anti-inflammatoire, activité diurétique.

Abstract

The use of medicinal plants for treatment has aroused the curiosity of many researchers and has been the subject of several studies. The objective of this study was phenolic analysis as well as the study of the biological properties of *Asplenium ceterach*. The results of this study revealed the richness of *Asplenium ceterach* on secondary metabolites. The determination of the polyphenols by the Folin-Ciocalteu reagent indicates a concentration of 7467µg/g MS. The measurement of the antioxidant activity showed a DPPH-IC₅₀ of 187,23µg/ml. The chromatographic analysis of the phenolic compounds of plant extract indicates the presence of seven phenolic compounds with an overall content of 3926µg/g MS, of which $\frac{3}{4}$ were presented by chlorogenic acid. The results of the biological activities showed that *Asplenium ceterach* was endowed with antimicrobial, anti-inflammatory, and diuretic properties. Therefore, two galenic forms have been developed, an anti-inflammatory ointment and a diuretic dietary supplement.

Key words: *Asplenium ceterach*, phenolic compounds, biological activities, anti-inflammatory activity, diuretic activity.

ملخص

قد أثار استخدام النباتات الطبية للعلاج فضول العديد من الباحثين وكان موضوع العديد من الدراسات. الهدف من هذه الدراسة هو تحليل الفينولات وكذلك دراسة الخواص البيولوجية لـ *Asplenium ceterach*. وكشفت نتائج هذه الدراسة عن ثراء *Asplenium ceterach* بالمركبات الثانوية. يشير قياس مادة البوليفينول إلى تركيز 7467 ميكروغرام/غرام. أظهر قياس نشاط مضادات الأكسدة DPPH-IC₅₀ 187.23 ميكروغرام / مل. يشير التحليل الكروماتوجرافي للمركبات الفينولية للمستخلص النباتي إلى وجود سبعة مركبات فينولية بمحتوى إجمالي 3926 ميكروغرام / غرام ، حيث يمثل $\frac{3}{4}$ حمض الكلوروجينيك. أظهرت نتائج الأنشطة البيولوجية أن *Asplenium ceterach* لها خصائص مضادة للميكروبات ومضادة للالتهاب ومدر للبول. لذلك ، تم تطوير شكلين جالينيين ، مرهم مضاد للالتهاب ومكمل غذائي مدر للبول.

مفتاح الكلمات: *Asplenium ceterach* ، مركبات فينولية ، نشاطات بيولوجية ، نشاط مضاد للالتهابات ، نشاط مدر للبول.