

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Phisico-Chimique
Filière : Biochimie
Option :Pharmacologie moléculaire



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Evaluation des activités biologiques d'une
plante médicinale locale**

Carthamus caeruleus.L

Présenté par :

ARROUDJ Lydia et ZITOUNE Chahrazed

Soutenu le : 22 juin 2017 à 11h

Devant le jury composé de :

Mme.HAMOUM.M

Mr.BELKACEM. N

Mr.OUCHEMOUKH.S

MAB

MAA

MCA

Président

Encadreur

Examineur

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Nous remercions d'abord le bon DIEU le tout puissant de nous avoir accordé la santé et le courage pour accomplir ce travail.

Nous tenons tout d'abord à remercier très vivement notre encadreur Mr BELKACEM NASSIM enseignant à l'Université Abderrahmane Mira pour avoir accepté de codiriger ce travail. Qu'il soit également remercier pour sa disponibilité permanente, son aide, et ses précieux conseils et surtout sa gentillesse.

Nous tenons également à témoigner notre profonde gratitude à :

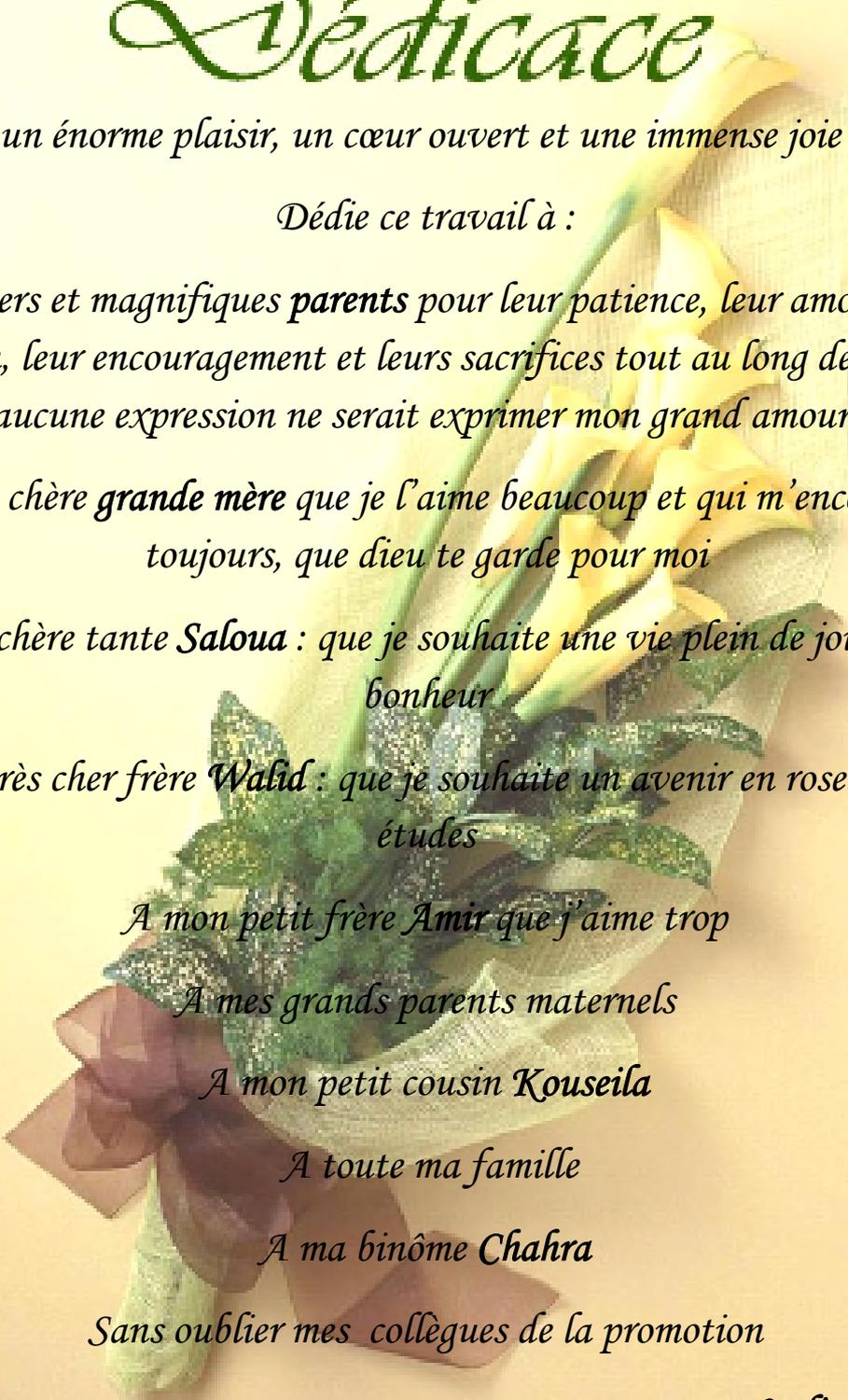
Monsieur HAMOUM.M, Madame BOUGOUFA.K et Monsieur OUCHEMOUKH.S pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Nous tenons également à remercier la technicienne de laboratoire BPC Mademoiselle TABTI Naima et Mademoiselle SALMI.A pour son soutien tout au long de la période de la pratique.

Et à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de notre travail.



Dédicace



Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que je

Dédie ce travail à :

*Mes chers et magnifiques **parents** pour leur patience, leur amour, leur soutien, leur encouragement et leurs sacrifices tout au long de ma vie aucune expression ne serait exprimer mon grand amour,*

*A ma chère **grande mère** que je l'aime beaucoup et qui m'encourage toujours, que dieu te garde pour moi*

*A ma chère tante **Saloua** : que je souhaite une vie plein de joie et de bonheur*

*A mon très cher frère **Wafid** : que je souhaite un avenir en rose dans ses études*

*A mon petit frère **Amir** que j'aime trop*

A mes grands parents maternels

*A mon petit cousin **Kouseila***

A toute ma famille

*A ma binôme **Chahra***

Sans oublier mes collègues de la promotion

Lydia

Dédicace



Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que je

Dédie ce travail à :

*Mes chers et **magnifiques** parents pour leur patience, leur amour, leur soutien, leur encouragement et leurs sacrifices tout au long de ma vie aucune expression ne serait exprimer mon grand amour, que dieu les gardes*

*A mon très chers frères **Faycel, syphax et samy**: à qui je souhaite tout le bonheur du monde*

A mes grands parents maternels et paternels

A toute ma famille

A mabinôme Lydia

A mes amis

Sans oublier mes collègues de la promotion.

Chahra zed

Dédicace



TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION.....1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

*Chapitre I : Présentation botanique de *Carthamus caeruleus*.L*

I.1. Genre carthamus	3
I.2. Présentation botanique de <i>carthamus caeruleus</i> .I	Erreur ! Signet non défini.
I.2.1.Classification systématique	3
I.2.2. Description	3
I.2.3. Distribution Géographique	4
I.3. Composition phytochimique des racines de la plante	4
I.4. Actions et utilisations traditionnelles	4

Chapitre II: Activité antioxydante

II.1. Radicaux libres et leurs dommages.....	5
II.1.1. Origine des radicaux libres	5
II.2. Le processus d'oxydation	5
II.3. Le stress oxydant.....	6
II.4. Les antioxydants.....	7
II.4.1. Les sources d'antioxydants.....	7
II.5.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	8
II.5.1. Méthode de DPPH.....	9
II.5.2. Test de la reduction du fer (FRAP).....	9

Chapitre II: Activité antimicrobienne

III.1. Micro-organismes.....	11
I.1. DESCRIPTION DES MICROORGANISMES ETUDIES	11
III.2. Les antimicrobiens.....	12
III.2.1. Antibiotiques	12
III.2.2. Les composés phenoliques.....	12
III.3.Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	13
III.3.1. Méthode de diffusion sur discs	13

III.3.2. Méthode de diffusion en milieu solide	13
III.3.3. Méthode de dilution en milieu liquide.....	13

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL & METHODES

I. Matériel	14
I.1. Matériel végétal	14
I.2. Matériel biologique	14
I.2.1. Les souches microbiennes utilisées.....	14
II. Méthodes	15
II.1. Détermination de la teneur en eau	15
II.2. Méthodes d'extraction	15
II.2.1. Extraction par macération.....	15
II.2.2. Extraction par soxhlet.....	16
II.2.3. Préparation d'une crème cicatrisante.....	16
II.2.4. Fractionnement de l'extrait éthanolique	16
II.3. Calcul du rendement	17
II.4. Analyse phytochimique	18
II.2.1. DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX	18
II.2.2. Dosage des flavonoïdes	18
II.2.3. Dosage des tannins.....	19
II.5. Evaluation, in vitro, de l'activité antioxydante.....	20
II.5.1. Méthode de réduction du radical libre DPPH	20
II.5.2. Méthode de réduction du fer (FRAP)	20
II.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	21
II.6.1. Isolement des souches	21
II.6.2. Préparation de l'extrait	21
II.6.3. Préparation de l'inoculum	21
II.6.4. Mise en test	22
II.7. Evaluation de l'activité cicatrisante.....	22
II.8. Analyse statistique	22

RESULTATS & DISCUSSION

I. Détermination de la teneur en eau.....	23
II. Calcul de rendement	23
II.1. Les rendements des trois extractions : hydro-alcoolique, aqueuse et par soxhlet.....	23
II.1.1. Rendement de l'extraction hydro-alcoolique.....	23

II.1.2 Rendement d'extraction par soxhlet (ethanolique).....	25
II.1.3. Rendement de la crème cicatrisante et de l'extrait aqueux	25
II.4. Rendement des fractions de l'extrait ethanolique obtenu par soxhlet	26
III. Analyse phytochimique	26
III.1. Dosage des polyphenols totaux.....	26
III.1.1. Teneur en polyphenols des extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux	27
III.1.2. Teneur en polyphenols des fractions	28
III.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	28
III.2.1. Teneur en flavonoïdes dans les extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux	29
III.2.2. Teneur en flavonoides des fractions de l'extrait ethanolique	30
III.3. Dosage des tannins.....	30
III.3.1. Teneur en tannins des trois extractions : ethanolique, hydroalcoolique et aqueux	31
III.3.2. Teneur en tannins des fractions de l'extrait éthanolique	31
IV. Evaluation, in vitro, de l'activité antioxydante.....	31
IV.1. Méthode de réduction du radical libre DPPH	31
IV.1.1 Evaluation de l'activité anti-radicalaire au DPPH des différents extraits éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux	32
IV.1.2 Evaluation de l'activité anti-radicalaire au DPPH des différentes fractions.....	33
IV.2. Méthode de réduction du fer (FRAP)	34
IV.2.1 Evaluation du pouvoir réducteur des différents extraits éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux.....	35
IV.2.2. Evaluation du pouvoir réducteur des différentes fractions	36
V. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	36
VI. Evaluation de l'activité cicatrisante.....	37
<i>CONCLUSION</i>	38

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

❖ **LISTE DES ABBREVIATIONS :**

ABTS : acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AH : antioxydant

AlCl₃: Trichlorure d'aluminium

ATB : antibiotique

BHA : butyle hydroxytoluène

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DPPH : 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EAG: Equivalent en acide gallique

EC: Equivalent catéchine

EQ: Equivalent quercétine

ERO : Espèces réactifs d'oxygène

Fe : Fer

FeSO₄ : Sulfate de fer

FRAP : Ferric Reducing-Antioxidant Power

HCL : acide chlorhydrique

IC₅₀: Concentration inhibitrice de 50% des radicaux libre

L[·] : Radicale lipidique

LOO[·] : radicale peroxyde

MS : Masse sèche.

MRSA : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Na₂CO₃: Carbonate de sodium

NaOH: Hydroxyde de sodium

O₂^{·-} : Radical superoxyde

OH[·] : radicale hydroxyle

LISTE DES ABBREVIATIONS

TEAC :Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

TPTZ : 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine

VITC : Vitamine C

XO : Xantine Oxydase.

LISTE DES TABLEAUX

❖ **Liste des tableaux :**

<i>N° Tableau</i>	<i>Titre de tableau</i>	<i>Page</i>
<i>I</i>	Classification systématique de <i>Carthamus caeruleus.L</i>	<i>03</i>
<i>II</i>	Les caractères biologiques de différentes souches utilisées	<i>11</i>
<i>III</i>	Caractéristiques des différents extraits obtenus en variant les différents paramètres.	<i>24</i>
<i>VI</i>	La teneur moyenne en polyphénols totaux de l'extrait en mg EAG/g d'extrait.	<i>27</i>
<i>V</i>	Le pouvoir réducteur des fractions.	<i>36</i>

LISTE DES FIGURES

❖ **LISTE DES FIGURES :**

<i>N° Figure</i>	<i>Titre de figure</i>	<i>Page</i>
01	Image de <i>Carthamus caeruleus.l</i>	04
02	Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.	05
03	Peroxydation d'une portion de chaîne d'acide gras.	06
04	Facteurs intervenants dans le stress oxydatif.	07
05	Structure chimique du radical libre DPPH•(2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle)	09
06	Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl)	09
07	Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	10
08	Mécanismes d'action des antibiotiques	12
09	Poudre des rhizomes de <i>Carthamus caeruleus.L</i>	14
10	Schéma du protocole de fractionnement de l'extrait éthanolique des rhizomes de <i>Carthamus caeruleus.L</i>	17
11	Teneur en humidité de la poudre des rhizomes de <i>Carthamus caeruleus.L</i>	23
12	Image de la crème traditionnelle et le surnageant récupéré	25
13	Les rendements des fractions de l'extrait éthanolique	26
14	Courbe d'étalonnage d'acide gallique	27

LISTE DES FIGURES

15	Teneur en polyphénols dans les différentes fractions de l'extrait éthanolique (Soxhlet).	28
16	Courbe d'étalonnage de la Quercétine.	29
17	La teneur moyenne en flavonoïdes de l'extrait en mg EQ/g d'extrait	29
18	Teneur des différentes fractions en flavonoïdes	30
19	Courbe d'étalonnage de Catéchine	30
20	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les standards, la Vit C et la BHA	32
21	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux.	32
22	Pourcentage d'inhibition de radical DPPH des différentes fractions	33
23	l'IC50 des différentes fractions	34
24	Courbes d'étalonnages de FeSO ₄ et acide ascorbique.	35
25	Le pouvoir réducteur des différents extraits des rhizomes de <i>Carthamus caeruleus.L.</i>	35
26	Zones d'inhibition données par l'extrait éthanolique contre : (1) <i>Staphylococcus aureus</i> et (2) <i>lesteria innocua</i>	37
27	Photographie montrant les résultats d'un test sur un individu ayant appliqué la crème traditionnelle : A :zone de brulure+1 ^{ère} application ; B :3 ^{ème} jour ; C :après 10 jours ; C : le 15 ^{ème} jours	38

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

La plante fût le premier recours de l'être humain pour soulager les douleurs, traiter ou prévenir un état pathologique, tout en ignorant les composés principaux responsables de ces effets miraculeux.

Dans le but d'améliorer l'état de santé, les patients des pays développés ou ceux en voie de développement font souvent recours à la thérapie médicale à cause de son efficacité. En raison des effets secondaires qui peuvent être engendrés par cette thérapie médicale et aussi son coût relativement élevé, beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits bruts des plantes qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (**Yakhlef et al., 2011**).

La médecine traditionnelle est facilement accessible et son coût est abordable, son utilisation a connu un regain d'attention et d'intérêt dans le monde, notamment en Chine où environ 40% de l'ensemble des soins de santé relèvent de la médecine traditionnelle (**OMS, 2003**).

Dans certaines régions d'Algérie, en Kabylie notamment, la médecine naturelle occupe toujours une place de choix dans le traitement de nombreuses pathologies, parmi ces remèdes naturels on cite *Carthamus caeruleus L*. Les extraits des rhizomes de *Carthamus caeruleus L* sont utilisés pour traiter les brûlures grâce à ces propriétés astringentes (**Hamadi et al., 2014**). les extraits de plantes médicinales contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribués diverses activités biologiques dont l'activité anti-oxydante et anti-microbienne (**Ghazghazi et al., 2013**).

Dans ce contexte, les objectifs à atteindre par ce présent travail sont :

- ❖ L'optimisation du protocole d'extraction à partir des rhizomes de *Carthamus caeruleus.L* ;
- ❖ Extraction par différents procédés ;
- ❖ Evaluation de l'activité antioxydante et analyse phytochimique de surnageant de la crème, de l'extrait hydro-alcoolique et de l'extrait éthanolique et ses fractions ;

- ❖ Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique ;
- ❖ Evaluation de l'effet cicatrisant de la crème cutanée des rhizomes.

Pour atteindre ces objectifs notre travail a été effectué dans le laboratoire de Biologie Physico-chimique, Faculté de Science de la Nature et de la Vie, Université Abderahmane Mira (Targa Ouzemour) Béjaia.

La présentation de nos travaux est répartie comme suit :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique et la présentation botanique de *Carthamus caerelues.L*, ainsi que la présentation les travaux scientifiques réalisés sur la même plante.

La deuxième partie concerne l'expérimentation réalisée sur la plante étudiée pour atteindre les objectifs précédemment cités.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Genre *carthamus*

Le nom générique découle du mot arabe Kurthum, qui signifie "teinture" (Kartam) (Beniston, 1984). C'est une plante à fleurs qui a des rapports avec les chardons (Lamarck et Marie, 1785). *Carthamus* est un membre de la tribu des cynarées, sous-famille tubuliflores, et de la famille des Astéracées. Il comprend 25 espèces (Murthy et Anjani, 2008).

I.2. Présentation botanique de *carthamus caeruleus.l*

Etymologie : *caeruleus* s'applique aux fleurs « de la couleur du ciel ».

Floraison : Avril-juillet

Habitat : Champs, terrains incultes, commun partout (Beniston, 1984)

I.2.1. Classification systématique

L'espèce *Carthamus caeruleus* appartient à la systématique suivante : (Quezel et Santa, 1993)

Tableau 01: classification systématique de *Carthamus caeruleus.L*

Règne	Embranchement	Sous-embranchement	Famille	Sous-famille	Genre	Espèce
Plante	Cynarées	Centaureine	Astéracées	Carduoidées	<i>Carthamus</i>	<i>Carthamus caeruleus</i>

I.2.2. Description

L'espèce *Carthamus caeruleus* est connue également sous le nom carduncelle bleu appartient à la famille des asteraceae ; est une plante vivace à tige dressée et velue, haute de 0.2 à 0.6 m, ses feuilles glabres ou pubescentes, les supérieures sont fortement dentées et piquantes, les fleurs sont bleues à corolle tubuleuse. Les fruits du *Carthamus caeruleus* sont des akènes (Bowles, 2010 ; boullard, 2001).



Figure 01: Image de *Carthamus caeruleus.L*

I.2.3. Distribution Géographique

C'est une espèce peu commune qu'on peut rencontrer dans les terrains maigres de provence et de Corse. Elle préfère les lieux secs et ensoleillés du Bassin Méditerranéen. Elle est originaire du Sud-Ouest de l'Asie, d'orient, mais réponde depuis dans le reste de l'Asie, en Afrique du Nord, en Australie et dans les deux Amériques, ainsi qu'en Europe (**boullard, 2001 ; Miolane, 2004**).

I.3. Composition phytochimique des racines de la plante

Le rhizome est particulièrement riche en : **amidon** (0.23 ± 0.01 g/g de masse humide), **stérois** (à effet hypocholestérolémiant), **saponines**, **acides gras polyinsaturés** et **mucilages** (ont un pouvoir calmant sur les tissus irrités) (**Hamadi et al., 2014**).

I.4. Actions et utilisations traditionnelles

La plante étudiée est très connue dans le Nord Algérien notamment en Kabylie, ses rhizomes sont utilisés dans le traitement des brûlures cutanées sous forme de crème préparée à partir des rhizomes préalablement lavés et épluchés puis les faire bouillir dans de l'eau. La crème obtenue est appliquée directement sur la partie brûlée et des résultats spectaculaires ont été observés chez des personnes traités par cette dernière.

II.1. Radicaux libres et leurs dommages

L'oxygène est une molécule indispensable aux processus vitaux, à la respiration cellulaire et la vie en général. Cette molécule peut entraîner des dommages cellulaires importants par formation de dérivés oxygénés activés tel que les radicaux libres.

Les radicaux libres sont des composés chimiquement instables porteurs d'électrons non appariés et qui réagissent avec d'autres molécules, les déstabilisant à leur tour, et induisent ainsi une réaction en chaîne. Ces composés chimiques sont dits oxydants responsables du phénomène d'oxydation des lipides, dénaturation des protéines, ils peuvent aussi causer des altérations au niveau de l'ADN, augmentant les possibilités de mutation. Le radical hydroxyle (OH^\bullet) et le radical super oxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) sont les radicaux les plus réactifs. (Goudable et Favier, 1997).

II.1.1. Origine des radicaux libres

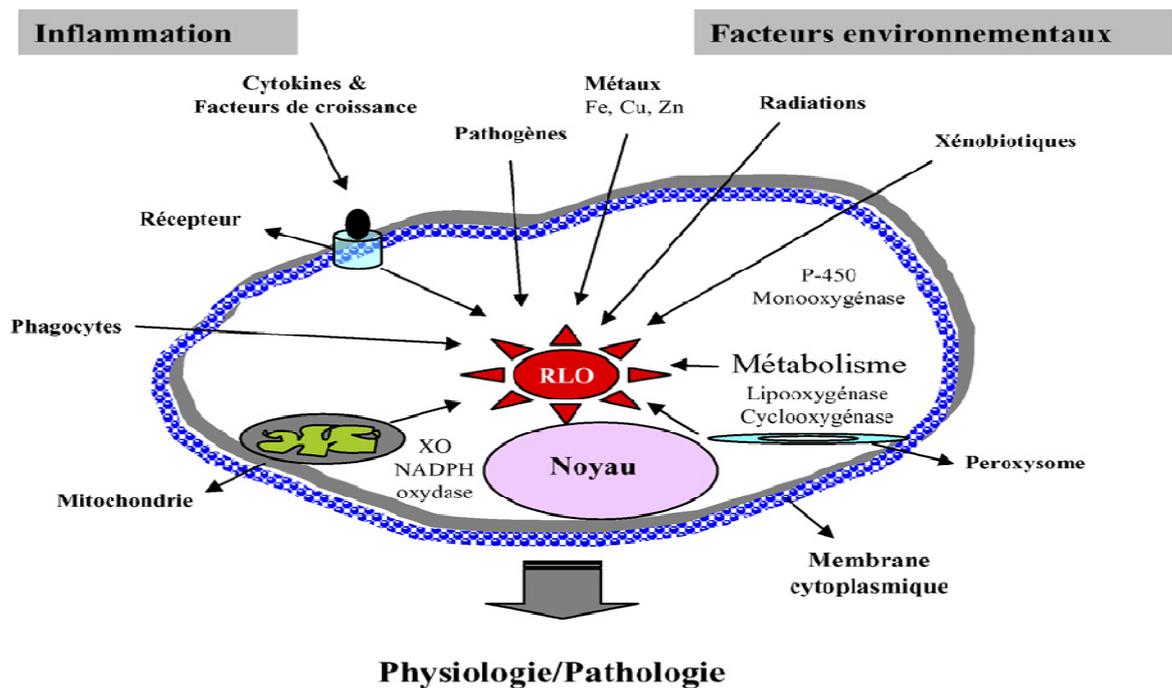


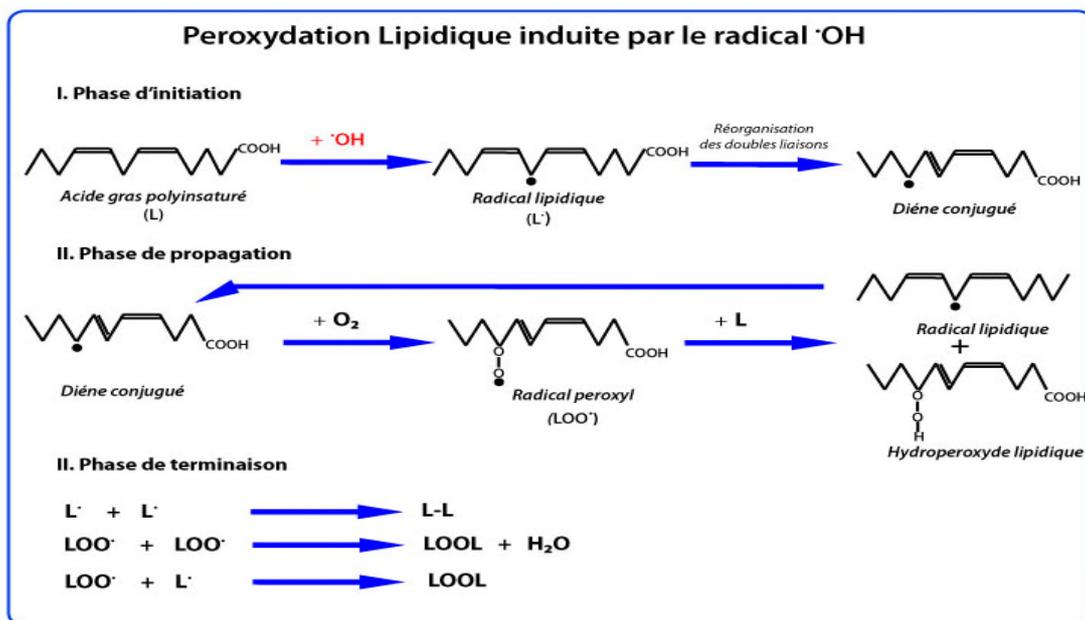
Figure 02 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso et al.,2007)

II.2. Le processus d'oxydation

L'oxydation est un processus biochimique par lequel le corps produit des radicaux libres responsables de réactions en chaîne d'attaque et de destruction des molécules

biologiques. Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire et se déroulent en 3 phases :

- ❖ La phase de déclenchement : où se forme un radical libre. L'arrachement des protons est facilité par la chaleur, rayonnements ou catalyseurs ;
- ❖ La phase de propagation : où l'oxygène fixé donne un radical peroxyde qui réagit avec une autre molécule et conduit à un néo-radical libre et un hydro-peroxyde ;
- ❖ La phase de terminaison : où se recombinent différents radicaux formés (Marc *et al.*,2004).



❖ **Figure 03** : Peroxydation d'une portion de chaîne d'acide gras (Marc *et al.*,2004)..

II.3. Le stress oxydant

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives d'oxygène (ERO), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants. Les ERO non détoxiquées par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules notamment les lipides, les protéines et l'ADN. (Koechlin.Ramonatxo,2006)



Figure 04 : Facteurs intervenants dans le stress oxydatif (Koechlin.Ramonatxo,2006).

II.4. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui peuvent réduire les radicaux libres (Thomas, 2010) par leur transformation en molécules stables et non réactives (Koechlin.Ramonatxo, 2006). Elles sont bénéfiques à la santé en neutralisant les dommages cellulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres) (Benbrook, 2005).

II.4.1. Les sources d'antioxydants

- ✓ L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces répartis en deux types :

Les antioxydants enzymatiques : synthétisés dans l'organisme.

Les antioxydants non enzymatiques : sont des piègeurs de radicaux libres dont la plus part sont apportés par l'alimentation on cite les antioxydants du règne végétal (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les antioxydants du règne végétal :

Les polyphénols : 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, pollen, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines...etc (Boizot et Charpentier, 2006). Ces molécules sont des antioxydants caractérisées par diverses autres activités : anticancéreuse, antimicrobienne et anti-inflammatoire...etc.

Par le biais de leurs activités pharmacologiques diverses, ils peuvent prévenir la modification oxydative par neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou décomposition des peroxydes par l'intermédiaire de leurs activités anti-oxydantes (**Ladoh et al., 2014**).

Flavonoïdes : L'appellation « Flavonoïde » qui en latin (= flavus) est dû à leur couleur jaune qu'ils engendrent (**Wilson, 1987**), formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones. Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié : plus de 4000 flavonoïdes ont déjà été identifiés (**Harborne, 1989 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**). Leur variation quantitative et qualitative est selon le stade de développement du végétal (**Fritch et Griesbach, 1975**).

Les flavonoïdes ont des propriétés antioxydantes importantes, ils peuvent neutraliser divers radicaux libres, chélater des métaux et inhiber la peroxydation lipidique. Ils peuvent jouer un rôle important dans la réduction et la prévention des maladies cardiovasculaires, notamment la diminution de l'oxydation des lipoprotéines et une action antiagrégant plaquettaire (**Descamps et al., 2006**).

Tannins : Les tannins sont des composés phénoliques. Le terme « tannin » ou « tanin » vient de la source de tannins utilisés pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes (**Dangles et al., 1992**). Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins (**Horne et al., 2002**).

II.5.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de la capacité anti-oxydante on cite : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) or ABTS (2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonate), DPPH+ (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl) ...etc (**Georgieva et al., 2010**).

II.5.1. Méthode de DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α, α -diphényl β picrylhydrazyle) fût l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité anti-oxydante des composés phénoliques (**Popovici et al.,2009**).

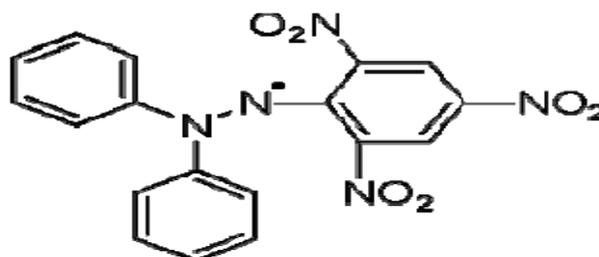


Figure05 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) (**Popovici et al.,2009**).

Principe :

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH passe d'une coloration violette à une coloration jaune (**Prior et al., 2005**).

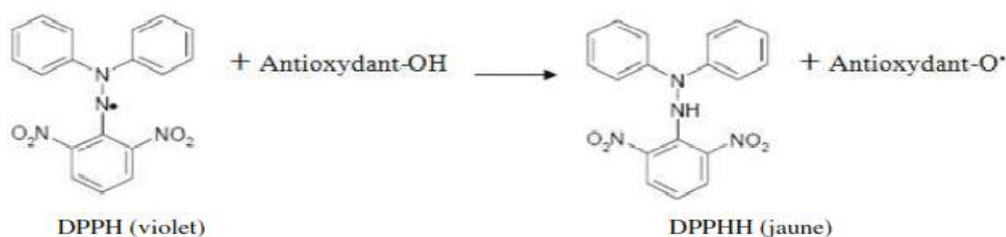


Figure 06 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) (**Congo, 2012**).

II.5.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

Principe :

Le test de FRAP est un essai simple, rapide et reproductible. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreux Fe^{2+} . Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant

l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**).

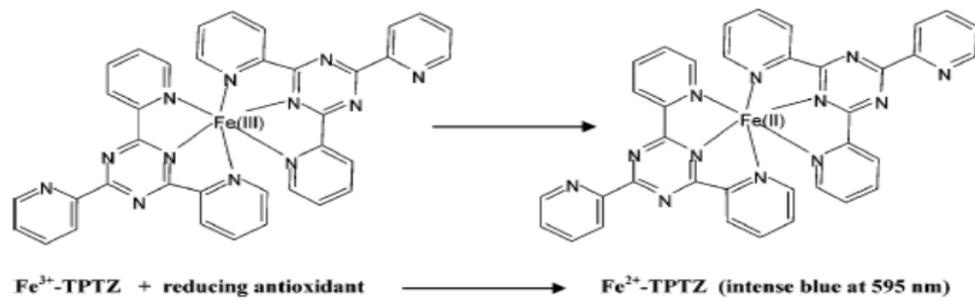


Figure 07 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (**Prior et al.,2005**).

L'utilisation profuse d'antibiotiques commerciaux et de pesticides synthétiques pour la protection des êtres humains et des cultures est nocive pour la santé, l'écosystème et l'environnement. L'incidence croissante d'agents pathogènes résistants aux médicaments à la fois d'importance clinique et agricole a conduit les chercheurs à l'exploitation des plantes médicinales qui ont la capacité intrinsèque à résister à des microorganismes pathogènes grâce aux composés naturels actifs à propriétés antimicrobiennes qu'elles possèdent pour traiter les pathologies infectieuses (Das1 *et al.*,2009).

III.1. Micro-organismes

Les microorganismes forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu. C'est leur seul point commun, car ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie. Les microorganismes se composent : des bactéries, des protozoaires, des champignons (Mycètes) microscopique, des algues et virus (Nicolas *et al.*, 1992)

I.1. DESCRIPTION DES MICROORGANISMES ETUDIÉS

Tableau 02 : Les caractères biologiques des différentes souches utilisées

Microorganisme	Caractéristiques
<i>Escherichia coli</i>	C'est un bacille Gram négatif assez typique, mesurant 1 µm de long par 0,35µm de largeur. C'est un aérobie facultatif le plus courant dans l'intestin inférieur des mammifères peuvent être pathogènes en provoquant de graves maladies : les entéro-hémorragies et les péritonites. (Blount, 2015.)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Le PA ou bacille pyocyanique est un germe à Gram négatif. Pathogène opportuniste parfois commensal de sujets sains. (Henri, 2002).
<i>Staphylococcus aureus</i>	Le <i>Staphylococcus aureus</i> est un organisme à Gram positif, agent pathogène opportuniste et colonisateur fréquent de l'épithélium. Provoque des es inflammations sévères et septicémies. (MRSA) (Grema <i>et al.</i> , 2015).
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> est une bactérie Gram positive, aérobie ou facultativement anaérobie, mobile en forme de tige de sporulation largement distribuée dans l'environnement. Sa pathogénicité est associée à la production d'exo-enzymes destructrices de tissus (Bottone, 2010).
<i>Klebsiella pneumonie</i>	<i>Klebsiella pneumonie</i> , un membre de la famille des Enterobacteriaceae, est un bacille fermenté en forme de tige, Gram-négatif et lactose avec une capsule proéminente (Li <i>et al.</i> , 2014).

III.2. Les antimicrobiens

III.2.1. Antibiotiques

Le terme « antibiotique » (issu des termes grecs «anti», signifiant « contre » et bios, « vie »), est toute substance d'origine naturelle produite par un microorganisme (habituellement une bactérie ou une moisissure) capable d'inhiber la croissance ou de détruire d'autres microorganismes (Chevalier, 2012).

Le mécanisme d'action des antibiotiques est résumé dans le schéma suivant :

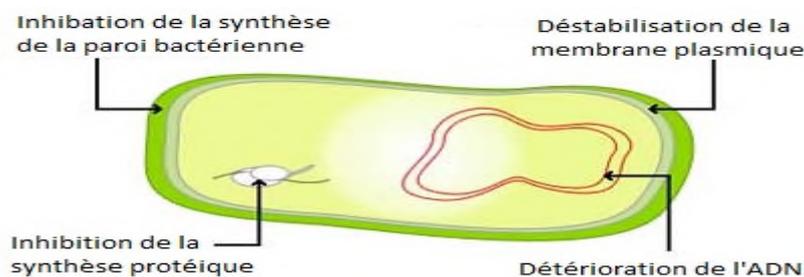


Figure 08: Mécanismes d'action des antibiotiques (Chevalier, 2012).

III.2.2. Les composés phénoliques

Les phénols notamment les acides phénoliques, les quinones, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines présentent un effet antimicrobien et servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes pathogènes (Das1 *et al.*, 2009). Leur toxicité relative pour les microorganismes est liée au site (s) et au nombre de groupes hydroxyles du composé phénolique, dont une hydroxylation accrue entraîne une toxicité importante (Cowan, 1999).

❖ Les flavonoïdes

Ces composés sont des bons inhibiteurs d'enzymes et sont reconnus pour leurs propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires (Massaux, 2012).

❖ Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques divisés en deux groupes : tanins hydrolysables et tanins condensés. Leur mode d'action antimicrobienne peut être lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

III.3.Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

III.3.1. Méthode de diffusion sur discs

A partir de colonies de chaque souche, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau physiologique. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0.5 Mc Farland. Un inoculum est alors obtenu, et ensemencé par inondation sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller Hinton. Des disques stériles de papier filtre imprégnés de différents extraits sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (**Bolou *et al.* , 2011**).

III.3.2. Méthode de diffusion en milieu solide

Avec un emporte - pièce des puits sont creusés dans la gélose de Mueller-Hinton coulée dans des boîtes de Pétri et ensemencées par un germe - test. Les diamètres d'inhibition sont mesurés autour des puits après une pré-incubation de 45 mn à température ambiante et une incubation à l'étuve à 37° C pendant 18 heures (**Biyiti, 2004**).

III.3.3. Méthode de dilution en milieu liquide

Cette méthode consiste à distribuer dans une série de tubes à hémolyse l'inoculum bactérien contenant des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, sauf un tube qui servira de témoin positif. Une observation à l'œil nu est ensuite réalisée, après une incubation de 24 heures à 37°C. On dit que la culture est positive dans les tubes où le trouble est nettement visible. La CMI est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible (**Ganière *et al.*, 2004 ; Kamagate *et al.*, 2001**).

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL & METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

L'étude est portée sur les rhizomes d'une espèce de la famille des Asteraceae qui est *Carthamus caeruleus*.L, récoltée au mois de mars 2017 dans la région de Tichy.

Les rhizomes sont nettoyés à l'eau, épluchés et laissés sécher à l'obscurité pendant 3 jours, dans un endroit sec et aéré, puis dans l'étuve à 40°C pendant 3 jours pour compléter le séchage.

Le matériel végétal, une fois séché est réduit en poudre avec un broyeur électrique, qui est ensuite tamisé par un tamis de 250 µm de diamètre afin d'avoir une poudre fine et homogène de couleur marron clair, puis stocké dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière (Figure 09).



Figure 09 : Poudre des rhizomes de *Carthamus caeruleus*.L

I.2. Matériel biologique

I.2.1. Les souches microbiennes utilisées

Cinq souches bactériennes ont été utilisées : *Escherichia coli* (25922), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Staphylococcus aureus* (25923), *Lesteria innocua* (74915), *Bacillus cereus* (10876) et *Klebsiella pneumoni* (700603). Les souches bactériennes nous ont été fournies par le laboratoire Microbiologie, Université Abderahmane Mira Béjaia.

II. Méthodes

II.1. Détermination de la teneur en eau

La méthode utilisée est la dessiccation par évaporation. On procède à la dessiccation du matériel végétal à une température de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ dans une étuve ventilée jusqu'à un poids constant. La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation (**Audigié *et al.*, 1978**).

La teneur en eau est calculée par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

H% : Teneur en eau.

M₁ : Masse d'échantillon avant dessiccation.

M₂ : Masse d'échantillon après dessiccation.

II.2. Méthodes d'extraction

II.2.1. Extraction par macération

Une extraction solide-liquide a été réalisée avec l'optimisation du protocole pour avoir le meilleur rendement en variant les paramètres suivants :

Solvant : Eau distillée, Ethanol 70% et Ethanol 96%.

Ratio : 1/10, 1/6 et 1/3.

Température : 80, 60 et 40°C.

Temps d'agitation : 30min, 15min et 5min à 1100rpm.

Le mélange est ensuite directement filtré avec un papier filtre Whatman, l'opération est répétée trois fois jusqu'à épuisement de la poudre (la dernière extraction nous donne une couleur très claire).

Une centrifugation est ensuite réalisée à une vitesse de 3500 tours/min pendant 10min pour éliminer les éventuelles particules de la poudre suspendues dans le filtrat.

Le solvant riche en substances extraites, a été récupéré dans un ballon puis évaporé à sec sous pression réduite à 40°C en utilisant un Rotavapeur. L'extrait ainsi récupéré a été placé dans l'étuve à la même température (40°C) pendant 48 heures pour avoir l'extrait sec.

L'extrait brut est ensuite conservé dans des tubes bien fermés à l'abri de la lumière à 4°C.

II.2.2. Extraction par soxhlet

Environ 26g de poudre sèche sont introduits dans une cartouche en cellulose qui est soumise à une extraction avec le soxhlet en utilisant environ 200ml d'éthanol 96% jusqu'à épuisement de la poudre.

II.2.3. Préparation d'une crème cicatrisante et de l'extrait aqueux

Suivant un procédé traditionnel qui consiste à faire bouillir 15g de rhizomes fraîches préalablement écrasés dans 100ml d'eau pendant 3min, et laissées macérer durant 24h, afin d'obtenir une crème cicatrisante prête à l'application directe sur la zone brûlée.

D'une autre part une autre préparation de la crème est effectuée dans laquelle le surnageant de cette dernière a été récupéré, un mélange hydro-alcoolique est ensuite rajouté à cette crème suivi d'une agitation dans le but d'extraire le maximum de composés actifs, puis filtré avec un papier filtre Watman. Le filtrat est additionné au surnageant pour donner l'extrait aqueux.

II.2.4. Fractionnement de l'extrait éthanolique

Environ 2.9 g de l'extrait éthanolique brut sec a subi un fractionnement par une série de solvants à polarité croissante suivant la méthode donnée par **Rached, (2009)**.

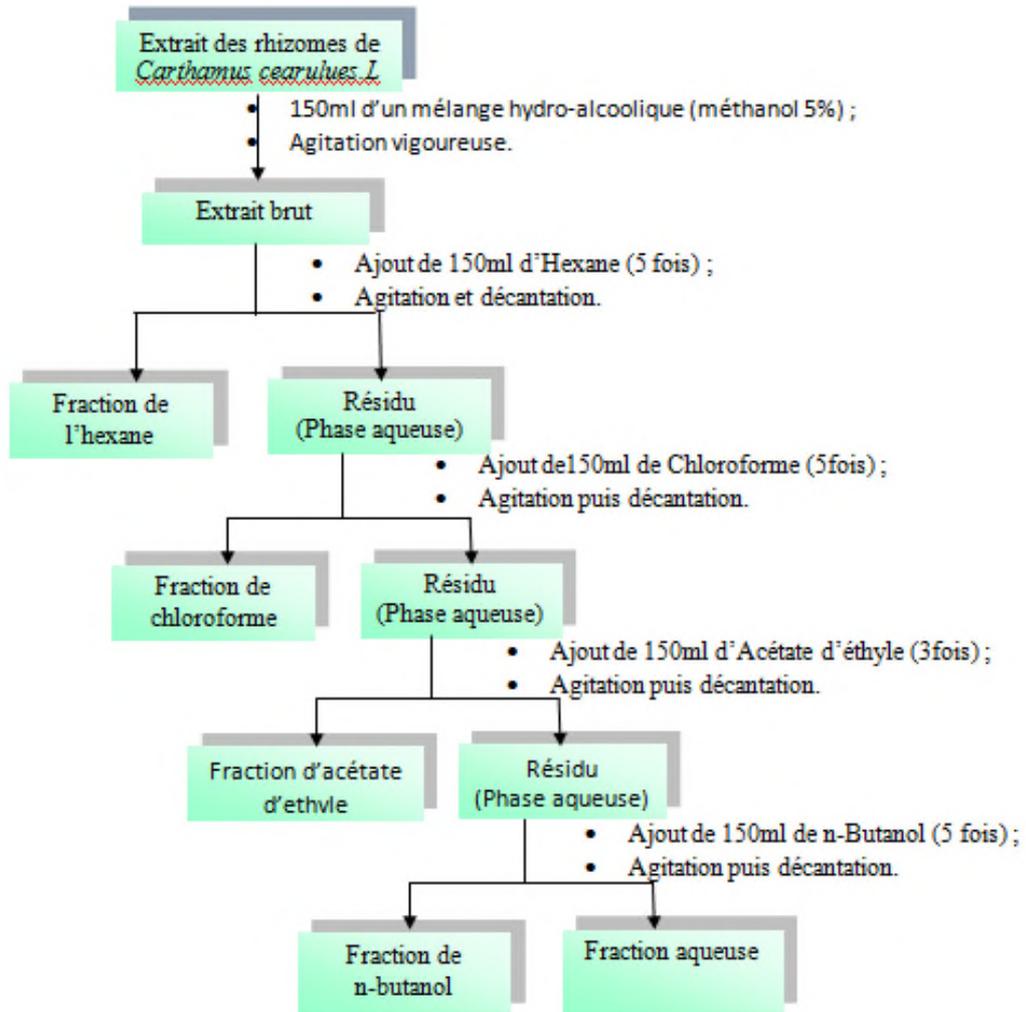


Figure 10 : Schéma du protocole de fractionnement de l'extrait éthanolique des rhizomes de *Carthamus caeruleus.L*

Chaque fraction obtenue subit une évaporation au rotavapeur à 40°C à basse pression, puis le séchage est complété dans l'étuve.

II.3. Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait brut sec a été calculé pour les différents échantillons (éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux) et aussi pour les fractions de l'extrait éthanolique (Aceth, n-But, Chl, Hex et Aq) par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{M}{M_0} \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal utilisé.

II.4. Analyse phytochimique

L'analyse phytochimique a été réalisée sur :

- ❖ Les différents échantillons : éthanolique (obtenu par soxhlet), hydro-alcoolique (obtenu par macération) et aqueux (filtrat et surnageant de la crème cicatrisante).
- ❖ Les différentes fractions de l'extrait éthanolique (fraction de l'hexane (Hex), d'acétate d'éthyle (Aceth), de chloroforme (Chl), de n-Butanol (n-But) et aqueuse (Aq)).

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Selon la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu décrite par **Wong, (2006)**. La concentration testée pour les échantillons : éthanolique et hydro-alcoolique est la 2000µg/ml, et la 1000 µg/ml pour l'extrait aqueux. Une concentration de 1000µg/ml a été testée pour les fractions Aceth, n-But, Chl et Aq, et 2000µg/ml pour la fraction Hex.

Mode opératoire

- 200µl de l'échantillon ;
- Ajouter 1ml d'une dilution de 1 :10 de réactif Folin-Ciocalteu dans l'eau distillée ;
- Incubation de la solution pendant 5min ;
- Ajouter 800µl de carbonate de sodium Na₂CO₃ (75g /l dans l'eau distillée) ;
- Agitation vigoureuse avec un vortex;
- Incubation pendant 1heure à température ambiante à l'obscurité ;
- L'absorbance est lue à 765 nm par spectrophotomètre contre un blanc sans extrait (éthanol+ Folin-Ciocalteu+ de carbonate de sodium).

Le taux de polyphénols totaux dans les différents échantillons testés a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0-100µg/ml), utilisé comme standard dans les mêmes conditions.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'échantillon (mg EAG /g d'échantillon).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium de **Bahorun et al.,(1996)** est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les échantillons de *Carthamus caerelues L.*

Une concentration de 4000µg/ml a été testée pour les extraits éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux. Pour les différentes fractions de l'extrait éthanolique la concentration testée est la 2000 µg/ml.

Mode opératoire

- Prélever 1 ml d'échantillon ;
- Ajouter 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans l'éthanol) ;
- Incubation pendant 10min à l'obscurité à température ambiante ;
- Lecture de l'absorbance à 415 nm.

La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la Quercétine utilisée comme standard et est exprimée en microgramme d'équivalent de Quercétine par milligramme d'échantillon (**µg EQ/mg d'échantillon**).

II.2.3. Dosage des tannins

Les tannins sont dosés par la méthode de **Ba et al., (2010)**, qui est basée sur la capacité de la vanilline pour produire un complexe coloré avec les unités des tannins en présence de l'acide chlorhydrique.

La teneur en tannins des différents extraits a été déterminée à une concentration de 4000 µg/ml pour l'extrait éthanolique et hydro-alcoolique, et à une concentration de 3000 µg/ml pour l'extrait aqueux. Concernant les fractions Hex, n-But, Aq et Aceth, une concentration de 2000µg/ml a été testée et la 1000 µg/ml pour la fraction Chl.

Mode opératoire :

- 500 µl d'extrait ;
- Ajouter 3ml de la solution vanilline-méthanol 4% (w /v) ;
- Ajouter 1.5 ml d'acide chlorhydrique (HCL) à 37% ;
- Agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex ;
- Incubation pendant 15min à température ambiante à l'obscurité ;
- L'absorbance est lue à 500 nm par spectrophotomètre contre un blanc préparé avec 500µl d'extrait + 3ml méthanol+ 1,5 ml HCL.

La teneur en tannins condensés est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la Catéchine (0-300µg/ml), réalisée dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats

sont exprimés en milligramme d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait (**mg EC/g d'extrait**).

II.5. Evaluation, in vitro, de l'activité antioxydante

II.5.1. Méthode de réduction du radical libre DPPH

Le pouvoir antioxydant des échantillons de *Carthamus cearuleus .L* est évalué selon la méthode de **Annie, (2006)**.

Le pouvoir antioxydant des échantillons a été évalué sur des concentrations de 62.5, 125, 250, 500, 1000, 1500 et 2000 µg/ml pour l'extrait éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux ainsi que pour toutes les fractions de l'extrait éthanolique.

La procédure se déroule comme suit :

- Prélever 1 ml d'échantillon ;
- Ajouter 1ml de DPPH (0,1mM);
- Agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex ;
- Incubation pendant 30 min à température ambiante à l'obscurité;
- L'absorbance est lue à 517 nm par un spectrophotomètre.

Le contrôle est préparé avec 1ml de DPPH + 1ml de méthanol. Les blancs sont préparés par l'addition de 1ml d'extrait (dissous dans l'éthanol) à 1ml de méthanol.

Le pourcentage de réduction du radical DPPH est donné par l'équation suivante :

$$\% \text{ scavenging du radical DPPH} = \frac{A_c - A_E}{A_c} \times 100$$

A_C : Absorbance du contrôle (DPPH+méthanol).

A_E : Absorbance de l'échantillon [Absorbance du test (échantillon +DPPH)- Absorbance du blanc (échantillon+méthanol)].

II.5.2. Méthode de réduction du fer (FRAP)

La méthode utilisée pour la mesure de la puissance des substances des extraits à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺ est la méthode de FRAP décrite par **Thaipong et al.,(2006)**.

Ce test a été effectué sur les différents échantillons (extraits et fractions) à des concentrations de 500µg/ml pour les extraits éthanolique et hydr-alcoolique, 1000µg/ml pour l'extrait aqueux et 1000µg/ml pour les fractions Chl, Aceth, n-But et Aq et 2000µg/ml pour la fraction Hex.

La procédure se déroule comme suit :

Une solution du travail fraîche de réactif FRAP est préparée en mélangeant 2,5ml de tampon acétate (PH= 3.6), 2.5ml TPTZ (2.4.6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) solution (10 mM dans 40mM d'Hcl), 2.5ml de solution de FeCl₃ à 20mM (solubilisé dans l'H₂O) à 37°C et filtrée avant utilisation ;

- 150 µl d'échantillon ;
- Ajout de 2850 µl de solution de FRAP ;
- Incubation pendant 30 min à l'obscurité à 37°C ;
- Les lectures sont effectuées à 593 nm pour les échantillons préalablement centrifugés (pendant 10min à 4000rpm).

II.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne

II.6.1. Isolement des souches

Les différentes souches microbiennes sont repiquées par la méthode de stries sur gélose Meuler Hinton puis incubées à l'étuve à une température de 37°C pendant 48heures.

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait est la méthode de diffusion sur disques de papier filtre placés sur milieu Muller Hinton (38g/l d'eau distillée) (Sacchetti *et al.*, 2005 ; Celiktas *et al.*, 2007).

II.6.2. Préparation de l'extrait

L'extrait est dissout dans le DMSO, le test antimicrobien a été effectué avec cinq concentrations : 60, 30, 15, 7.5 et 3.75mg/ml.

II.6.3. Préparation de l'inoculum

À partir de cultures jeunes des différentes souches, on prélève quelques colonies à l'aide d'une anse platine, puis les décharger dans un tube de 10 ml de l'eau physiologique

stérile. L'opacité de ces suspensions est équivalente à 0.5 Mc Farland mesurée par un densitomètre.

II.6.4. Mise en test

Un écouvillon est imprégné dans les tubes de suspension, puis essoré en pressant contre les parois internes du tube. L'ensemencement est fait en stries serrés de haut en bas pour avoir un tapis qui couvre toute la surface de la boîte de pétri.

Dans des conditions aseptiques, des disques de 6mm de diamètre sont imprégnés de 20µl de chaque concentration de l'extrait éthanolique dissous dans le DMSO (60, 30, 15, 7.5 et 3.75mg/ml) préalablement stérilisées en utilisant un papier filtre seringue (diamètre 0.02µm) et sont placés à laide d'une pince sur les boîtes de pétri, à raison de 6 disques pour chaque boîte. Le DMSO est utilisé comme étant un témoin négatif.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48heures dans l'étuve à 37°C. Après l'incubation, des zones d'inhibition apparaitront autour des disques si l'extrait inhibe la croissance microbienne, les diamètres de ces zones d'inhibition sont ainsi mesurés à l'aide de pied à coulisse digital.

II.7. Evaluation de l'activité cicatrisante

Sur une zone brûlée au niveau du bras d'une étudiante (brûlée accidentellement), la crème préparée traditionnellement a été appliquée après le septième jour de la brûlure, suivant une méthode traditionnelle, au moins 3 fois par jours pendant 15 jours.

II.8. Analyse statistique

Pour chaque échantillon analysé, trois mesures ont été réalisées et les résultats ont été exprimés sous forme de: moyenne \pm écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le Paired T-Test. Les différences ont été significatives à $P \leq 0.05$. Les valeurs des IC50 ont été calculées en utilisant le logiciel GraphPadPrism version (7.03).

RESULTATS & DISCUSSION

I. Détermination de la teneur en eau

Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans la poudre des rhizomes de *Carthamuscaeruleus.L*.

La poudre récupérée renferme un taux d'humidité de $7\pm 0.97\%$ ce qui confère à cette poudre une bonne conservation à long terme car ce taux doit être inférieur à 10% (Audigiét *al.*, 1978).

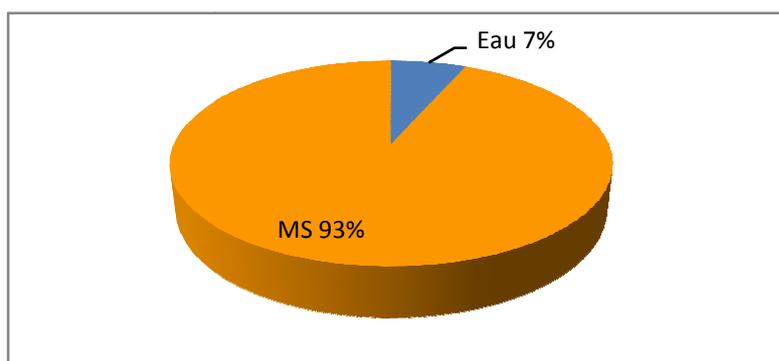


Figure 11 : Teneur en humidité de la poudre des rhizomes de *Carthamuscaeruleus.L*

II. Calcul de rendement

Le pourcentage en extrait brut sec pour les différents extraits (éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux) et de chaque fraction (Hex, Aceth, Chl, n-But et Aq) de l'extrait éthanolique des rhizomes de *Carthamuscaeruleus .L* a été calculé par la formule citée auparavant.

II.1. Les rendements des trois extractions : hydro-alcoolique, aqueuse et par soxhlet

II.1.1. Rendement de l'extraction hydro-alcoolique

- La mise au point des paramètres :

Les résultats obtenus lors de la mise au point des paramètres sont résumés dans le tableau 03:

Tableau 03:Caractéristiques et rendement des différents extraits obtenus en variant les différents paramètres.

Paramètres variés		Couleur	Aspect	Rendement % ±l'écart type
Solvant	Eau distillée	Jaune claire	Pale	6.79±0.93
	Ethanol 70%	Brun orangé	Brillant	7.63±0.07
	Ethanol 96%	Brun jaune	Brillant	1.93±0.025
Ratio	1/3	Brun orangé	Brillant	4.66±1.067
	1/6	Brun orangé	Brillant	7.60±0.080
	1/10	Brun orangé	Brillant	8.53±0,315
Température	40°C	Brun orangé	Brillant	7.74±0.1
	60°C	Brun orangé	Brillant	8.51±0,104
	80°C	Brun orangé	Brillant	8.53±0,315
Temps d'agitation	5min	Brun orangé	Brillant	7.17±1.15
	15min	Brun orangé	Brillant	8.5±0.104
	30min	Brun orangé	Brillant	8.4±0.43

D'après les résultats représentés dans le Tableau 03, la nature du solvant influence le rendement de l'extraction qui est de l'ordre de 6.79 ± 0.93 , 7.63 ± 0.07 et $1.93 \pm 0.025\%$ pour l'eau distillée, éthanol 70% et éthanol 96%, respectivement. Le rendement obtenu avec l'eau distillée est nettement meilleur à celui obtenu avec l'éthanol 96%. Cela démontre que l'extrait de la poudre des rhizomes de *Carthamuscaeruleus L* est riche en molécules polaires et hydrophiles. Néanmoins, le mélange hydro-éthanolique 70% a permis la solubilisation d'une quantité plus importante de composants grâce à leur effet conjoint aboutissant à un meilleur rendement. La variation du ratio (masse de la poudre/volume du solvant) de 1/3 à 1/10 entraîne une amélioration du rendement ($p < 0.05$) de 4.66 ± 1.067 à $8.53 \pm 0,315\%$, cela est dû à la présence d'une quantité plus élevée du solvant qui permet la solubilisation d'une quantité plus importante de molécules. La température favorise le rendement de l'extraction en influençant la solubilité des constituants de la plante ; néanmoins, l'augmentation de la température à 80°C a entraîné une variation non significative ($p > 0.05$). L'augmentation de la durée d'agitation de 5 à 15min a abouti à l'amélioration du rendement qui est dû à un temps de contact plus important permettant la dissolution d'une quantité plus élevée de molécules.

Toutefois, l'augmentation de temps d'agitation à 30 min n'a pas entraîné une variation significative ($p > 0.05$). D'après ces résultats, on peut déduire que le meilleur rendement de l'extraction hydro-alcoolique est obtenu avec l'éthanol 70%, ratio 1/10 à 60°C pendant 15min à 1100tour /min.

II.1.2 Rendement d'extraction par soxhlet (éthanolique)

L'extrait obtenu a une couleur brune orangée, avec un aspect brillant, et qui révèle un rendement de 3.17 ± 0.17 %. Ce rendement est nettement meilleur à celui obtenu avec la macération avec l'éthanol 96% qui est de l'ordre de 1.93 ± 0.02 %. L'extraction avec le soxhlet permet l'épuisement de la poudre utilisée en ses substances pouvant être solubilisées dans le solvant utilisé qui se renouvelle constamment en contact de l'échantillon aboutissant à un meilleur rendement.

II.1.3. Rendement de la crème cicatrisante et de l'extrait aqueux

- Après une macération de 24h, deux phases ont été formées :
 - ❖ Une crème à effet cicatrisant d'une couleur beige et insoluble dans l'eau avec un rendement de 9.43% ;
 - ❖ Un surnageant coloré.
- L'extrait aqueux obtenu à partir de la crème cicatrisante (composé de surnageant et de filtrat) a donné un rendement de 0.92%.



Figure12 :Image de la crème traditionnelle et le surnageant récupéré.

II.4. Rendement des fractions de l'extrait éthanolique obtenu par soxhlet

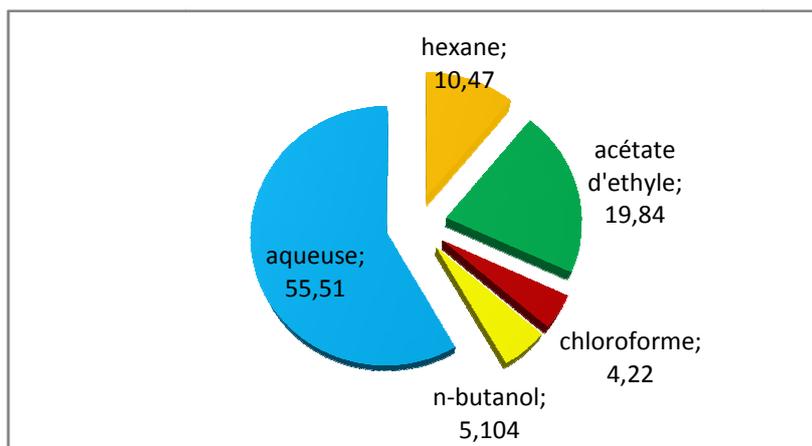


Figure13 :Les rendements des fractions de l'extrait éthanolique

La Figure 13 montre les pourcentages de chaque fraction calculés à partir de 2.9g de l'extrait éthanolique obtenu par soxhlet. Le rendement des fractions Hexane (Hex), Chloroforme (Chl), Acétate d'éthyle (Aceth), n-Butanol (n-But) et Aqueuse (Aq) est de 10.47, 4.22, 19.84, 5.104 et 55.51%, respectivement. Le meilleur taux (plus de la moitié de l'extrait) est obtenu dans la dernière phase du protocole de fractionnement, qui est la phase aqueuse. Cela est en accord avec les résultats obtenus lors de l'optimisation de l'extraction hydro-alcoolique et confirme que l'extrait de la poudre des rhizomes de *Carthamuscaerulus*. Lest très riche en substances qui sont de nature hydrophile.

III. Analyse phytochimique

L'étude phytochimique a été réalisée sur :

- ❖ Les différents extraits : éthanolique(soxhlet), hydro-alcoolique et aqueux.
- ❖ Les fractions de l'extraitéthanolique (soxhlet) : **Hex, Chl,Aceth, n-Butet Aq.**

III.1. Dosage des polyphenols totaux

La teneur en polyphénols a été déterminée selon la méthode de Folinciocalteu.

Le Folin-Ciocalteu réagit avec la solution d'extrait aboutissant à l'apparition d'une coloration bleue proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (**Bentabetet al.,2014**). Les concentrations en polyphénols totaux sont estimées en utilisant

l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique représentée dans la Figure 14 :

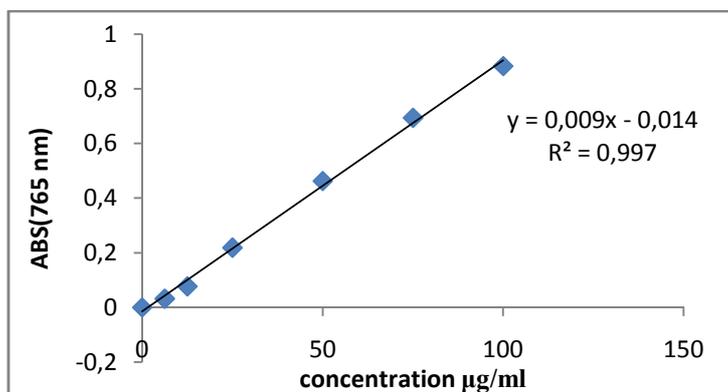


Figure 14 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Les résultats obtenus sont rapportés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de la matière végétale sèche (**mg EAG/g d'extrait**).

III.1.1. Teneur en polyphénols des extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux

Le tableau 04 présente les résultats obtenus :

Tableau04 : la teneur moyenne en polyphénols totaux de l'extrait en **mg EAG/g d'extrait**

Extrait	Teneur en polyphénols en (mg EAG/g d'extrait)
• Ethanolique	17.56±0.96
• Hydro-alcoolique	11.80±0.14
• Aqueux	14.95±1.22

La Tableau 04 montre les teneurs en polyphénols totaux dans les différents extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux qui sont respectivement de l'ordre de 17.56±0.96, 11.80 ±0.14 et 14.95±1.22mg EAG/g d'extrait. D'après ces résultats, la teneur la plus élevée est obtenue dans l'extrait éthanolique ($P < 0.05$) tandis, que la différence entre les teneurs en polyphénols entre l'extrait hydro-alcoolique et aqueux n'est pas significative ($P > 0.05$). Néanmoins, ces teneurs sont relativement faibles par rapport à la teneur donnée par **Toubaneet al.,(2017)** qui est de l'ordre de 190.98 mg EAG/g d'extrait. Comparativement à

d'autres extraits de plantes qui sont riches en polyphénols, la teneur de l'extrait de plante *Carthamuscaeruleus L* reste faible.

III.1.2. Teneur en polyphénols des fractions

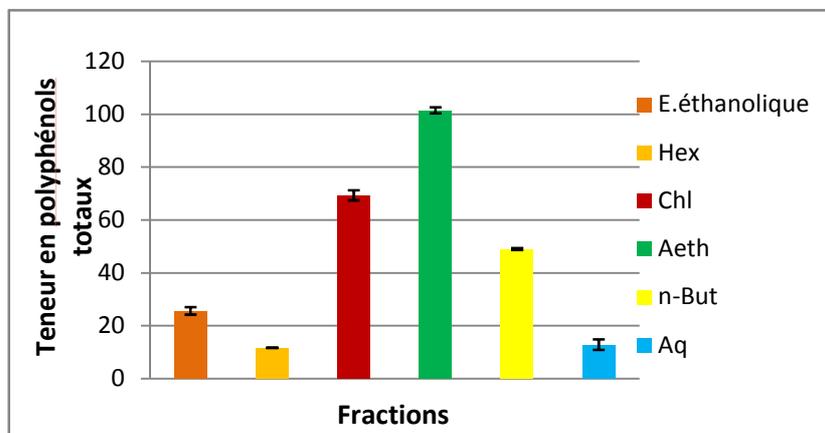


Figure 15: Teneur en polyphénols dans les différentes fractions de l'extrait éthanolique (Soxhlet).

La Figure 15 montre les résultats des teneurs en polyphénols dans les différentes fractions : Hex, Chl, Aeth, n-But et Aq de l'extrait éthanolique qui sont de l'ordre de 11.63 ± 0.04 , 69.31 ± 1.88 , 101.46 ± 1.13 , 48.98 ± 0.37 et $12,88 \pm 2.01$ mg EAG/g de fraction, respectivement. La fraction Aceth affiche la teneur la plus élevée ($P < 0.05$), ce qui est en accord avec l'étude réalisée par **Boumerfeg, (2010)** qui ont trouvé la teneur la plus importante dans la fraction d'Aeth qui est de l'ordre de 38.791 mg EAG/g d'extrait, nettement inférieure aux résultats de notre étude. On peut noter aussi que les polyphénols sont concentrés principalement dans les fractions Aceth, Chl et n-But qui représentent environ 38% de l'extrait brut, alors qu'une faible quantité en polyphénols est présente dans les fractions Hex et Aq (environ 69% de l'extrait brut). Ce qui est en accord avec la faible teneur en polyphénols dans l'extrait éthanolique brut.

III.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Dans le but de quantifier les flavonoïdes dans les échantillons de *Carthamuscaeruleus.L*, la méthode de trichlorure d'aluminium a été suivie (**Talbi et al., 2015**). La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la Quercétine et est exprimée en milligramme d'équivalent de Quercétine par gramme d'extrait (**mg EQ/g d'extrait**).

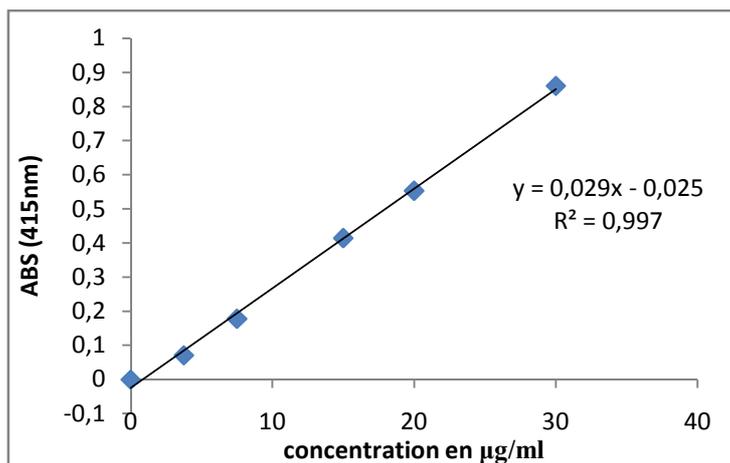


Figure 16: Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

III.2.1. Teneur en flavonoïdes dans les extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux

Le Figure 17 représente les résultats obtenus :

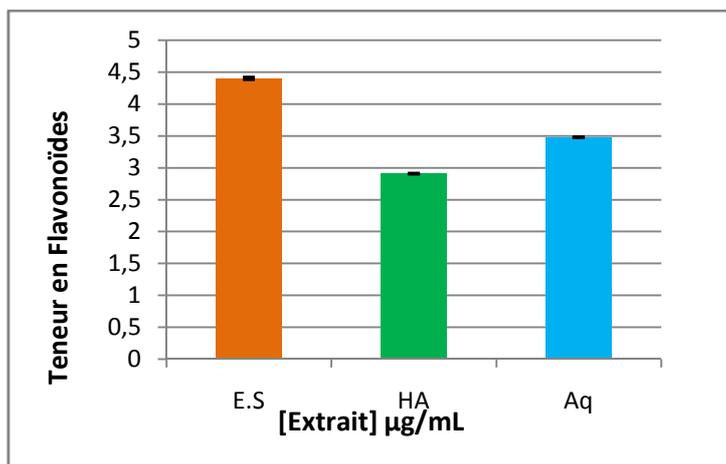


Figure17 : La teneur moyenne en flavonoïdes des l'extraits en mg EQ/g d'extrait

La Figure 17 montre la teneur en flavonoïdes dans les différents extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux qui est de l'ordre de 4.40 ± 0.02 , 2.91 ± 0.007 et 3.48 ± 0.01 mg EQ/g d'extrait. La teneur la plus élevée a été trouvée dans l'extrait éthanolique ($P < 0.05$). Ces résultats révèlent que les extraits de la poudre de *Carthamus caruleus* sont pauvres en flavonoïdes. Cela a rendu le dosage un peu compliqué, vu qu'il a fallu tester des concentrations supérieures à 1 mg/ml colorées qui rend difficile la révélation de la présence des flavonoïdes. Pour cela, nous avons testé trois concentrations 1, 2 et 4 mg/mL contre un blanc qui contient respectivement 1 mL de chaque concentration testée et 1 mL d'éthanol.

III.2.2. Teneur en flavonoïdes des fractions de l'extrait ethanologique

La Figure 18 présente la teneur en flavonoïdes des différentes fractions : Aceth et n-But qui est de l'ordre de $5,58 \pm 0,06$ et $4,16 \pm 0,09$ mg EQ/g de fraction et absence des flavonoïdes dans les fractions Hex, Chl et Aq. La meilleure teneur est obtenue dans la fraction Aeth puis dans la fraction n-But ($P < 0,05$). La teneur en flavonoïdes dans la fraction Aceth est proche de celle obtenue par Belkhiri, (2009) qui est de l'ordre de $6,68 \pm 0,32$ mg EQ/g de fraction.

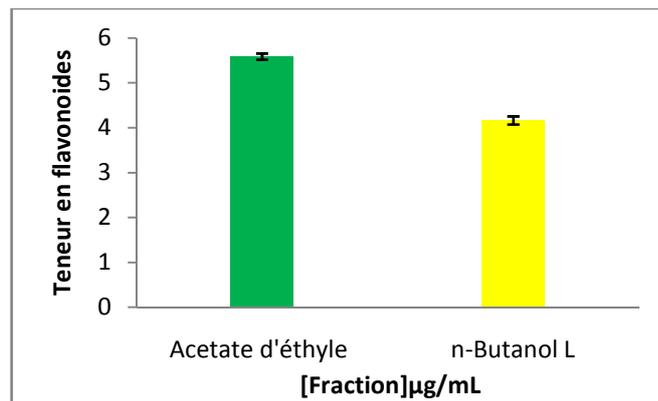


Figure 18 : La teneur des différentes fractions en flavonoïdes

III.3. Dosage des tannins

Afin de déterminer la contenance en tannins des extraits des rhizomes de *Carthamus caeruleus* L, la méthode de la vanilline en milieu acide est utilisée. Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir de différentes concentrations de standard Catéchine. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de la Catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g d'extrait)

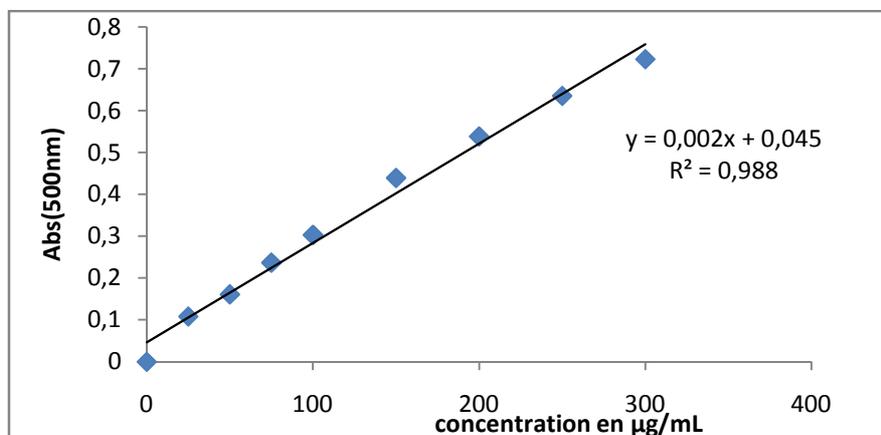


Figure 19: Courbe d'étalonnage de Catéchine

III.3.1. Teneur en tannins des trois extractions : éthanolique, hydroalcoolique et aqueux

D'après les tests réalisés sur la concentration 4 mg/ml pour les extraits éthanolique et hydro-alcoolique ; et 3 mg/ml pour l'extrait aqueux, nous n'avons pas révélé la présence des tannins.

III.3.2. Teneur en tannins des fractions de l'extrait éthanolique

Les dosages effectués sur les différentes concentrations 1mg/ml, 2mg/ml et 4 mg/ml des différentes fractions de l'extrait éthanolique indiquent l'absence des tannins dans toutes les fractions (Hex, Chl, n-But et Aq), et une teneur de l'ordre de $6.08 \pm 0.02 \mu\text{gEC/g}$ de la fraction Aceth. Néanmoins, cette faible teneur et les concentrations élevées testées (coloration foncée) ne permettent pas de détecter la couleur caractéristique de la présence des tannins. La faible teneur en tannins dans la fraction Aceth est en accord avec les résultats de l'étude réalisée par **Hamadiet al.,(2014)**.

IV. Evaluation, in vitro, de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydant a été réalisée sur les différents extraits éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux ainsi que sur les fractions Aceth, Chl, Hex, n-but et Aqobtenues à partir de l'extrait éthanolique.

IV.1. Méthode de réduction du radical libre DPPH

L'activité anti-radicalaire des différents extraits a été évaluée par le test de DPPH, qui est un test simple et rapide, il est très répondeu dans le dépistage antioxydant(**Prior et al.,2005**).

La Figure 20 représente les pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les standards utilisés, l'acide ascorbique et la BHA.

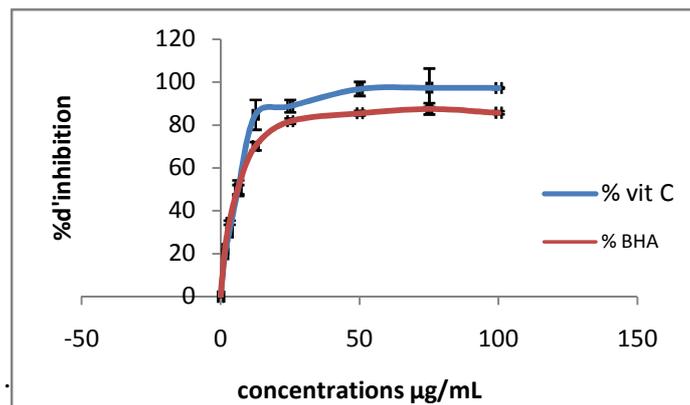


Figure 20 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les standards, la Vit C et la BHA

D'après ces résultats, on constate que la Vit C est plus efficace que la BHA avec un taux d'inhibition maximal de l'ordre de 93.93 ± 8.46 et 81.76 ± 8.46 , respectivement, atteints à la concentration de $25 \mu\text{g/mL}$. La concentration inhibitrice 50% (IC 50) est de l'ordre de 6.72 ± 0.07 et $7.6 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ pour la vit C et la BHA, respectivement. Ce qui indique que la Vit C est plus puissante que la BHA dans l'effet scavenger du radical DPPH.

IV.1.1 Evaluation de l'activité anti-radicalaire au DPPH des différents extraits éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux

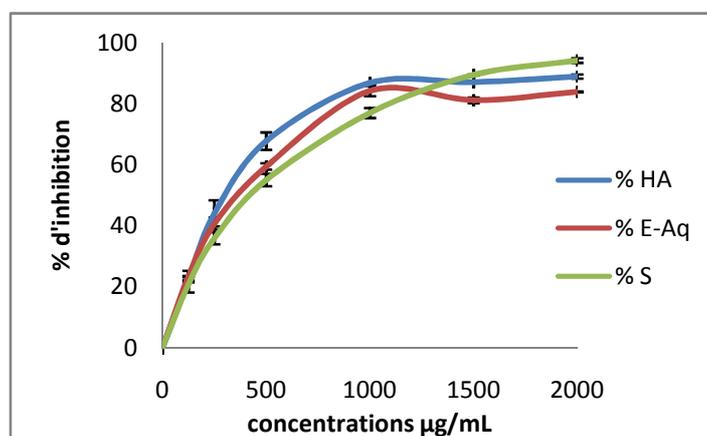


Figure 21 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux .

La Figure 21 montre les pourcentages d'inhibition du radical DPPH obtenus par les différents extraits. A une concentration de $2000 \mu\text{g/mL}$, les pourcentages d'inhibition du radical

DPPH par l'extrait éthanolique(90.4±7.67%), l'hydro-alcoolique (90.14 ±0.17%) et l'aqueux(85.7±0.1%) sont statistiquement non différents (P>0.05).

Les valeurs d'IC50 de l'acide ascorbique et de la BHA obtenues par le logiciel graphpad sont respectivement de l'ordre de 6.72µg/ml et 7.6µg/ml. En comparant l'IC50 de l'extrait éthanolique (322.966±7.77µg/ml), l'hydro-alcoolique (238,413±14.17µg/ml) et l'aqueux (219,9±3.53µg/ml) des rhizomes de *Carthamuscaeruleus.L* par rapport à celles de l'acide ascorbique et de la BHA, on remarque que l'activité anti-radicalaire de ces extraits est très faible. Ce qui indique que les extraits de poudre des rhizomes de *Carthamuscaeruleus L* ne sont pas de puissants antioxydants. Ces résultats sont en corrélation avec la faible teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes présents dans ces extraits.

L'IC50 de l'extrait éthanolique est meilleur que celui trouvé par **Toubaneet al.,(2017)** qui est de l'ordre de 1500µg/ml, donc l'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique est plus importante. Toutefois, les mêmes auteurs ont trouvé des teneurs plus importantes en polyphénols de l'ordre de 190mg EAG/g d'extrait ce qui n'est pas en accord avec l'IC50 qu'ils ont trouvé.

IV.1.2 Evaluation de l'activité anti-radicalaire au DPPH des différentes fractions

La Figure 22 montre les pourcentages d'inhibition du radical DPPH obtenus par les différentes fractions.

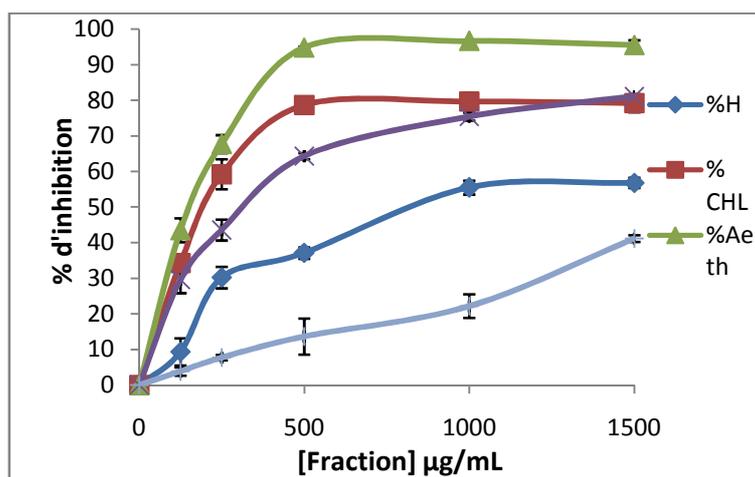


Figure 22: Pourcentage d'inhibition de radical DPPH des différentes fractions.

D'après ces résultats, l'activité anti-oxydante des fractions dans un ordre décroissant est comme suit : Aceth, Chl, n-But, Hex puis Aq avec des IC 50 de l'ordre de 149.28±6.42, 182.42 ±10.86, 297.19±80.52, 815.92 ±25.34 et 1790.52±121.29µg/ml, respectivement

(figure 23). On constate que l'activité est plus marquée dans les fractions qui contiennent une quantité plus grande en polyphénols. La corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et IC50 est faible selon le coefficient de corrélation donné par la courbe ($R^2=0,613$, Figure 01 Annexes 03). Cela indique que l'activité anti-oxydante pourrait être due aussi à d'autres composants autres que les polyphénols présents dans les différentes fractions. Néanmoins, ces valeurs des IC50 sont nettement plus élevées par rapport à celles obtenues avec la BHA et la Vit C surtout pour le cas de la fraction aqueuse majoritaire. Cela est en accord avec la faible activité observée dans l'extrait éthanolique brut. Les substances anti-oxydantes de l'extrait se sont surtout concentrées dans les fractions Aceth, Chl et n-But et beaucoup moins dans la fraction Hex. Alors que la fraction Aq majoritaire présente un pouvoir anti-oxydant plus faible que celui de l'extrait brut.

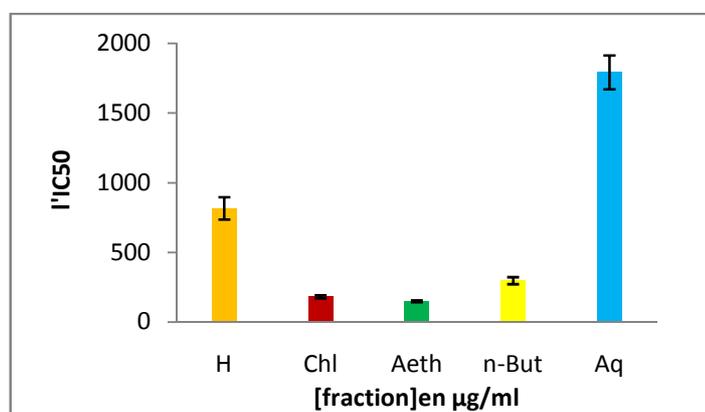


Figure 23 : L'IC50 des différentes fractions

IV.2. Méthode de réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur des différents échantillons (extraits et fractions) des rhizomes de *Carthamuscaeruleus.L* a été évalué selon la méthode de **Thaiponget al.,(2006)**

Dans ce travail, par la méthode de FRAP on a testé les différents extraits des rhizomes de *Carthamuscaeruleus.L*, le $FeSO_4$ et le standard acide ascorbique.

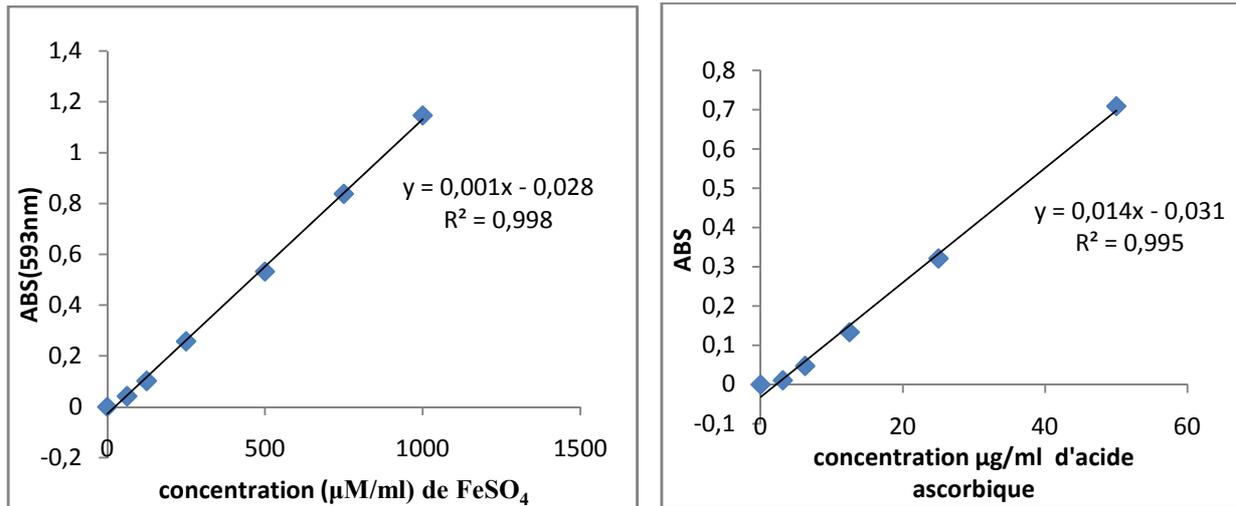


Figure 24: Courbes d'étalonnages de FeSO₄ et acide ascorbique.

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits.

IV.2.1 Evaluation du pouvoir réducteur des différents extraits éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux

La Figure 25 présente le pouvoir réducteur des extraits : éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux qui sont de l'ordre de $235,52 \pm 30,55$, $190,52 \pm 32,94$ et $179,94 \pm 19,31 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ de matière sèche dont la différence est statistiquement non significative ($P > 0,05$). Ces valeurs sont, toutefois, nettement loin de celles obtenues avec le standard, la Vit C, qui est de $12071,66 \pm 1002,26 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ d'échantillon. Ces résultats confirment le faible pouvoir antioxydant des extraits des rhizomes de *Carthamus caeruleus*. Observé dans le test anti-radical DPPH.

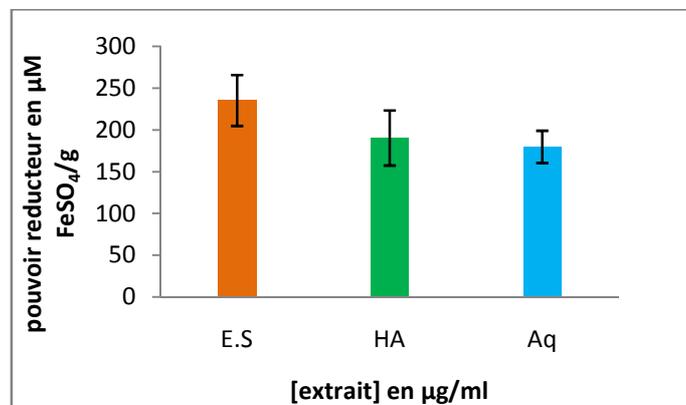


Figure 25 : le pouvoir réducteur des différents extraits des rhizomes de *Carthamus caeruleus*.L.

IV.2.2. Evaluation du pouvoir réducteur des différentes fractions

Le Tableau 05 présente les résultats du pouvoir réducteur des différentes fractions Aq, Hex, Chl, n-But et Aceth qui sont de l'ordre de 73.02 ± 0.962 , 93.73 ± 5.62 , 185.66 ± 8.429 , 74.97 ± 1.272 et 520.25 ± 6.666 $\mu\text{MEq FeSO}_4/\text{g}$ de matière sèche, respectivement ; et de l'ordre de 6.248 ± 0.079 , 7.827 ± 0.462 , 15.506 ± 0.692 , 31.066 ± 0.104 et 43.006 ± 0.547 mg EqvitC/ g, respectivement.

Tableau05: le pouvoir réducteur des fractions.

Fraction	Le pouvoir réducteur en :	
	$\mu\text{M EQ FeSO}_4/\text{g} \pm$ écart type	$\mu\text{M EQ vitC}/\text{g}$ \pm écart type
• Aq	$73,02 \pm 0.962$	$6,248 \pm 0.079$
• Hex	$93,73 \pm 5.62$	$7,827 \pm 0.462$
• Chl	$185,66 \pm 8.429$	$15,506 \pm 0.692$
• N-but	$374,97 \pm 1.272$	$31,066 \pm 0.104$
• Aceth	$520,25 \pm 6.666$	$43,006 \pm 0.547$
• Acide ascorbique	$12071,66 \pm 1002.26$	—

D'après ces résultats, la fraction Aceth présente le pouvoir réducteur le plus important et qui affiche des teneurs en polyphénols les plus élevés. Néanmoins, cette activité reste très faible par rapport au standard utilisé, la Vit C, qui a un pouvoir réducteur de l'ordre de $12071,66 \pm 1002.26$ $\mu\text{M EQ FeSO}_4/\text{g}$ d'échantillon. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le test DPPH.

V. Evaluation de l'activité antimicrobienne

La méthode de diffusion sur disques a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique, de *Carthamuscaeruleus.L* (Sacchetti *et al.*, 2005 ; Celiktasetal., 2007). Les concentrations testées sont : 60, 30, 15, 7.5 et 3.25mg/ml.

Les résultats obtenus indiquent que les souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Klebsiella pneumonie*, ont une forte résistance même à des concentrations élevées vis-à-vis de l'extrait éthanolique avec un diamètre

d'inhibition de 6mm. Alors que les deux souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua* affichent des diamètres d'inhibition de 7 et 8 mm, respectivement ; à la plus grande concentration de 60mg/mL. Toutefois, ces valeurs indiquent que la souche *Listeria innocua* est aussi résistante à l'extrait éthanolique aux concentrations testées. Alors que la souche *Staphylococcus aureus* est probablement sensible à des concentrations supérieures à 60mg/mL.

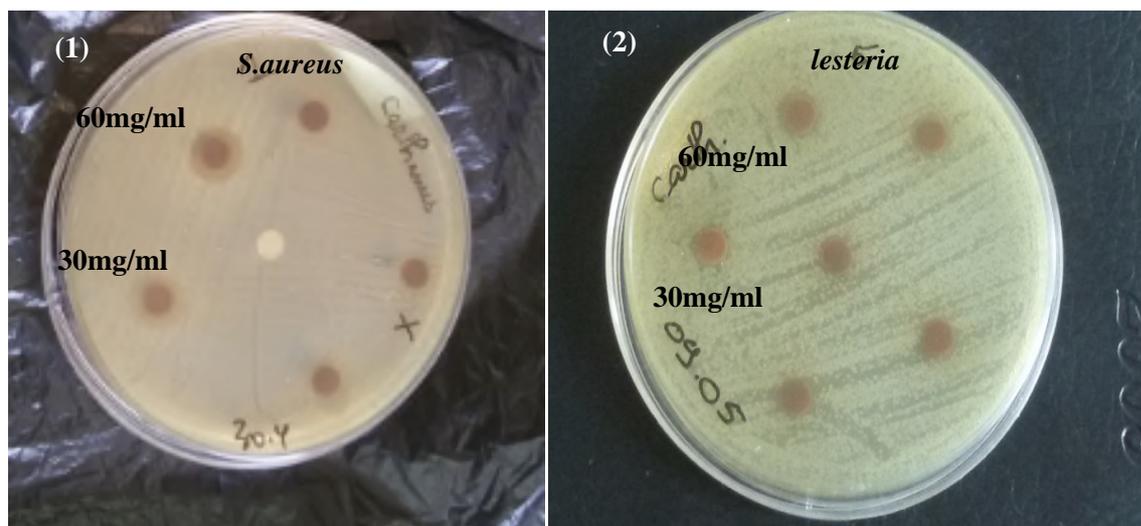


Figure 26: Zones d'inhibition données par l'extrait éthanolique contre : (1) *Staphylococcus aureus* et (2) *lesteria*.

Des résultats similaires ont été obtenus par **Belkhiri, (2009)** qui a testé la concentration de 100mg/ml de l'extrait méthanolique des rhizomes de *Carthamus caeruleus.L* sur les souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, et *Klebsiella pneumoniae*, qui a aussi trouvé que l'extrait est résistant aussi au *Staphylococcus aureus* et *lesteria innocua* à la même concentration, contrairement à nos résultats. Cela implique de tester des concentrations plus élevées que 60mg/mL afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

La faible activité antimicrobienne de cet extrait est en accord avec sa faible teneur en polyphénols (17.56 ± 0.96 mg EAG/g d'extrait).

VI. Evaluation de l'activité cicatrisante

L'application traditionnelle de la crème cutanée révèle les résultats représentés dans les photographies suivantes :



Figure 26 : Photographie montrant les résultats d'un cas d'un individu ayant appliqué la crème traditionnelle :A :zone de brulure+1^{ère} application ; B :3^{ème} jour ; C :après 10 jours ; C : le 15^{ème} jours.

Les photographies prises au niveau de la zone de brulure montrent une régénération progressive du tissu cutané. Notant qu'après une durée de 15 jours d'application de la crème, la régénération du tissu de la peau est complète. Les mêmes résultats ont été obtenu par **Hamadiet al .,(2014)**après application de la crème cicatrisante sur une étudiante qui s'est fait brulée accidentellement au niveau du dos de la main et du bras .

CONCLUSION

Conclusion :

A coté des substances médicamenteuses, les différentes plantes médicinales sont à l'origine de synthèse de molécules bioactives, capables d'exercer un effet équivalent à celui des médicaments et ce grâce à la nature chimique de ces constituants majoritaires.

Ce travail nous a permis d'effectuer une analyse phytochimique, d'évaluer l'activité antioxydante, antimicrobienne et d'évaluer l'activité cicatrisante.

Les résultats obtenus au cours de nos travaux sur les rhizomes de *Carthamus caeruleus.L* sont :

- ❖ La teneur en polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin- ciocalteu révèle que, l'extrait éthanolique contient **17.56±0.96mg EAG/g d'extrait**, une teneur plus élevée que celle de l'extrait hydroalcoolique et aqueux. La fraction Aceth issue de l'extrait éthanolique contient une teneur de **101,46±1.13 mg EAG/g d'extrait**, qui est la plus importante par rapport aux autres fractions.
- ❖ La teneur en flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ nous mène à conclure que l'extrait éthanolique de cette plante contient **4.40±0.02 mg EQ/g d'extrait**, une teneur plus élevée que celle de l'extrait hydro-alcoolique et aqueux. La fraction Aceth contient une teneur de **5.58±0.068 mg EQ/g d'extrait** qui est la plus importante par rapport aux autres fractions. Toutefois, ses teneurs sont très faibles.
- ❖ Les tannins n'ont pas pu être détectés dans les extraits éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux avec les concentrations testées. La seule fraction qui a révélé une faible teneur en tannins, est l'Aceth avec **6.083±0.02µg EC/g d'extrait**.
- ❖ Les résultats de test DPPH ont montré que l'extrait éthanolique, hydro-alcoolique et aqueux possède un pouvoir inhibiteur similaire qui est nettement faible comparativement à celui des standards BHA (**7.6µg/ml**) et acide ascorbique (**6.72µg/ml**). La fraction Aceth révèle l'IC₅₀ le plus faible avec (**149.28±6.42µg/m**) donc le pouvoir antioxydant le plus important comparativement aux autres fractions et qui reste faible par rapport à celui de la BHA et de l'acide ascorbique.
- ❖ Les résultats de test de FRAP ont révélé que l'extrait éthanolique, hydroalcoolique et aqueux possède une capacité de réduction de Fer .Parmi toutes les fractions testées

l'Aceth possède le pouvoir réducteur le plus important **520,25 $\mu\text{M EQ FeSO}_4/\text{g d'extract}$** . Mais qui reste inférieur à celui obtenue par l'acide ascorbique **12071,66 $\mu\text{M EQ FeSO}_4/\text{g d'extract}$** .

Les résultats trouvés concernant la composition phytochimique de l'extrait éthanolique est en corrélation avec son pouvoir antioxydant, ce qui est aussi montré par la fraction Aceth de cet extrait éthanolique

- ❖ L'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique des rhizomes de *Carthamus caeruleus.L* a été évaluée sur six souches bactériennes par la méthode de diffusion sur disque de cellulose. Les résultats ont montré que l'extrait n'a pas d'activité contre toutes les souches sauf *Staphylococcus aureus*.
- ❖ Les résultats obtenus après une application traditionnelle de la crème cutanée pendant une durée de 15 jours ont montré une efficacité remarquable de cette dernière sur la cicatrisation de la brûlure.

Les perspectives envisagées dans les prochaines recherches concernant la plante *Carthamus caeruleus.L* sont :

Il serait aussi intéressant de déterminer les composants actifs responsables de l'effet cicatrisant de la crème obtenue à partir de la plante, ainsi que de tester les différentes fractions sur des modèles animaux afin de déterminer la fraction responsable de cet effet et sa composition phytochimique par des techniques de séparation chromatographiques.

Toutefois, l'absence d'une activité antibactérienne des extraits des rhizomes de *Carthamus caeruleus.L* suggère une recherche de plantes bénéficiant de cette activité et susceptible d'être incorporée à la formulation ou mélanger avec le miel qui est connu pour son activité antimicrobienne et cicatrisante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Afonso, V., Champy, R., Mitrivic, D., Collin, P. et Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : Rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, 74 :636-643.
- Annie, S., Arun, S., Kuppusamy, R. et Issac, S. R. O. (2006). In Vitro Antioxidant Studies on the Benzyl Tetra Isoquinoline Alkaloïde Berberine. *Indian Biology and Pharmacology Bulltin*, 29(9) :1906-1910.
- Audigié, C., Figarella, J. et Zonszain, F. (1978). *Manipulation d'analyse biochimique*. Doin (Ed). Paris : 247.

B

- Ba, K., Tine, E., Destain, J., Cissé, N. et Thonart, P. (2010). Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie agronomie société et environnement*, 9 (1) :131-139.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M. et Gazin, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim. Forsch.* 46: 1086-1089.
- Belkhir, F. (2009). Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *tamus communiL* et *Carthamus caeruleus L*. Mémoire de magister. Université de Ferhat Abbas, Setif.
- Benbrook, M. (2005). Accroître la teneur antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Ed. Theorganic center : 6-8.
- Beniston, N.W. (1984). Fleurs d'Algérie. Entreprise national du livre : Algérie.
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Pharmacognosie* :1-8.
- Biyiti, I.F., Meko'o, D.I., Tamzc, V. et Amvam Zollo, P.H. (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharmacologie et médecine traditionnelle africaine*. 10:11-20.
- Blount, Z.D. (2015). The unexhausted potential of E.coli. *eLife*, 4.

- **Boizot,N. et Charpentier,J.P. (2006)**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. 79-82.

- **Bolou,G.E.K., Attioua,B., N'Guessan,A.C., Coulibaly,Y.A., N'Guessan,J.D. et Djaman,A.J. (2011)**. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bultin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80 :772-790.

- **Bougandoura.N. et Bendimerad.N. (2012)**. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*, 09 : 14-19.

- **Boullard, B., (2001)**. Plantes médicinales du monde (réalité et croyances). ESTEM, ISBN. PP. 515-516.

- **Boumerfeg,S.,(2010)**. Antioxidative Properties Of *Tamus Communis* L., *Carthamus Caeruleus* L. And *Ajuga Iva* L. extracts. Thèse doctorat.Setif.

- **Bottone,E.J., (2010)**. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2):382-398.

- **Bowles,V.G., Mayerhofer,R., Davis,C., Good,A.G. et Hall,J.C. (2010)**. A phylogenetic investigation of *Carthamus* combining sequence and microsatellite data. *Plant Systematics and Evolution*, 287: 85–97.

C

- **Celiktas, O.Y., Hames-Kocabas, E.E., Bedir, E., Verdar, S. et Ozekt, B.K.H.C. (2007)**. Antimicrobial activities of methanolic extract and essential oils of *Rosmarinus officinalis* depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100:553-559.

- **Chevalier, P. (2012)**. L'usage des substances antimicrobiennes en production animale : position des experts et des gouvernements. *Revue des connaissances scientifiques*, 60 : 1-60.

- **Congo,M. (2012)**. Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso: 42.

- **Cowan, M. M. (1999)**. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4): 564-570.

D

- **Dangles,O., Stoeckel,C., Wigand,MC. et Brouillard,R. (1992).** Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett*, 33: 522-730.

- **Del Bubba,M., Giordanie,E., Pippucci,L., Cincinelli,A., Checchini,L. et Galvan,L. (2009).** Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth 104 and ripening and in response to different postharvest treatments. *J. Food Comp. Anal*, 22 (7-8): 668-777.

- **Descamps,E., Gelé,P., Bordet,R. et Vamecq,J. (2006).** Modulation pharmacologique du stress oxydatif. *La lettre du pharmacologue*, 20 (4) :107-118.

- **Dasl,K., Tiwari,R.K.S. et Shrivastava,D.K. (2009).** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal Of Medecinal Plants Research*, 4(2): 104-111.

F

- **Fritch.H., Griesbach,H. (1975).** Biosynthesis of cyaniding in cell cultures of *Haplopappus gracilis* *Phytochem.* 14: 243-742.

G

- **Ganière,J.P., Mangion,C. Et Péridy,M. (2004).** Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Revue Mé.*8(9) :411-416.

- **Georgieva,S., Boyadzhiev,L. et Angelov,G. (2010).** Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydant. *Revue de génie industriel*, (5):124-132.

- **Ghazghazi.H., Chedia,A., Abdererazak,M. et Brahim,H. (2013).** Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydantedes extraits méthanoliques des quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbial.Hyg.Alim.*73(25) : 37-41.

- **Goudable,J. et Favier,A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. 11:115-200.

- Grema,H.A., Geidam,Y.A., Gadzama,G.B., Ahmed,J.A. et Suleiman,A. (2015). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2):79-88.

H

- Hamadi,F., Boudif,K., Djouab,A., Allane,T., Benmounah,A.et Benamara,S. (2014). Phytothérapie clinique : Caractérisation d'une préparation semi- solide traditionnelle antibrulure. *Phytothérapie*, France :1-7.

- Harborne,J.B. (1989). Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep*, 25 (7): 85-109.

- Henri, L. (2002). BACTERIOLOGIE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA. *Press therm climat*, 139: 9-13.

- Horn,J., Hayes,J. et Lawless,H.T. (2002). Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chem. Senses*, 27 (7): 653-659.

K

- Kamagate,A., Kone,D., Coulibaly, N.T., Brou,E. et Sixou,M. (2001). Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies strictes de la flore sous-gingivale. *Odonto-stomatologie tropicale*, 4 (95) : 9-12.

- Koechlin-Ramonatxo,C. (2006).Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20:167-177.

L

- Ladoh,Y.C.F., Dibong,S.D., Nyegue,M.A., Djembissi talla,R.P., Ndjakou,B.L., Mpondo,E., Ynyang,J. et Wansi,J.D. (2014). Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmantheracapitata* (Iorantheaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of applied biosciences*, 8:7636– 7643.

- Lamarck, J.B. et Marie, J.L. (1785). Encyclopédie méthodique botanique. Clément Plomteux : France.2.

- Li,B., Zhao,Y., Liu,C., Chen,Z. et Zhou,D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumonia*. *Future microbial*, 9(9):1071-1081.

M

- Marc,F., Davin,A., Deglene-Benbrahim,L ., Ferrand,C., Baccaunaud,M. et Fritsch,P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medecine/sciences*, 20 (4): 458-463.

- Massaux,C. (2012). Polyphénols : des alliés pour la santé. *Abeilles & Cie*, 4(149) :1-4.

- Miolane,P. (2004).Encyclopedie universelle de 15000 plantes et fleurs de jardin. Larousse ISBN.

- Murthy,I.Y.L.N. et Anjani,K. (2008). Fattyacid composition in *Carthamus species*.*7th international safflower conference*, Australie.

N

- Nicolas,P., Mor,A. et Delfour,A. (1992). Les peptides de la défense antimicrobienne des vertébrés. *Médecine /sciences*, 11 (5): 423-431.

O

- OMS. (2003). *Medecine traditionnelle*.

P

- Popovici,C., Saykova,I. et Tylkowski,B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4) :8.

- Prior,R.L., Wu,X. et Schaich,K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,53: 4290-4302.

Q

- **Quezel,P. et Santa,S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. Centre national de la recherche scientifique: France. 2.

R

- **Rached,W. (2009).**Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Mémoire de Magister, Université d'Oran Es'sénia. Algerie.

S

- **Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Mansredini, S., Radice, M. et Irimi, R. (2005).** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial in food. *Food Chemistry*, 91: 621-632.

- **Sarni-Manchado,P. et Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. *Lavoisier (Tec & Doc)*, Paris : 300-398.

- **Talbi,H., Boumaza,A., El-mostafa,K., Talbi,J. et Hilali,A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa L.* (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa L.*). *Journal of Materials and Environmental Science*, 6 (4) : 1111-1117.

- **Thaipong,K., Boonprakob ,U., Crosby,K., Cisneros-Zevallos,L. et Byrne,DH. (2006).** Journal of Food Composition and Analysis: Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675.

- **Thomas,A. (2010).** Prise d'antioxydants et d'autres thérapies complémentaires par les patients sous chimiothérapie antitumorale : étude prospective.

- **Toubane.A., Rezzoug.SA., Besombes.C. et Daoud,K. (2017).** Optimization of Accelerated Solvent Extraction of *Carthamus CaeruleusL.* Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Industrial Crops and Products*, 97 :620-631.

W

- **Wilson,A. (1987).** Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *J. Chem. Ecol*, 13 (3): 473-493

- **Wong,C.C., Li,H.B., Cheng,K.W. et Chen,F. (2006).** A systematic survey of antioxidantactivity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food chemistry*, 97: 705-711.

Υ

- **Yakhlef,G., Laroui.S., Hambaba,L., Aberkane,M.C. Et Ayachi,A. (2011).** Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *laurus nobilis*, plantes utilisées en medecine traditionnelle. *Ethnopharmacologie*, 9 : 209-218.

ANNEXES

ANNEXE 01 :**Tableau :** Liste des produits chimiques utilisés

Milieus utilisés et Réactifs	solvants
<ul style="list-style-type: none">•Gélose nutritive ;•Gélose Chapman ;•Gélose sang cuit ;•Gélose Muller- Hinton ;•Gélose extrait de malt ;•Bouillon glucosé tamponné (BGT).	<ul style="list-style-type: none">•L'acide gallique ;•Réactif de Folin-Ciocalteu ;•Carbonate de sodium (Na₂CO₃) ;•Chlorure d'aluminium (AlCl₃) ;•Catéchine ;•L'eau distillée et l'eau physiologique ;•DPPH ;•Quercétine ;•HCL ;•Vanilline ;•Méthanol ;•Ethanol ;•Persulfate de potassium ;•DMSO.

ANNEXE 02 :**Tableau :** appareillages et leur references.

<i>Appareils</i>			
	<i>Marque</i>	<i>Modèle</i>	<i>Pays de fabrication</i>
<i>Agitateur magnétique</i>	VELP	F205004420	Italie
<i>Autoclave</i>	–	–	–
<i>Balance de précision</i>	RADWAG	PS 210.R2	Pologne
<i>Bain marine</i>	RAYPA	–	Italie
<i>Broyeur électrique</i>	SAYONA	CG-333	Italie
<i>Etuve</i>	BINDER	–	Allemagne
<i>Evaporateur rotatif</i>	Heidolph	–	
<i>PH mètre</i>	BOECO	BT-675	Allemagne
<i>Pied à coulisse</i>	–	–	–
<i>Soxhlet</i>	Reihenheizgerät 4	–	Allemagne
<i>Spectrophotomètre</i>	BIOTECH ENGINEERING	UV-9200	Allemagne
<i>Tamis électrique</i>	Retsch	AS200	Allemagne
<i>Vortex</i>	VELP SCIENTIFICA	F20500420	Italie

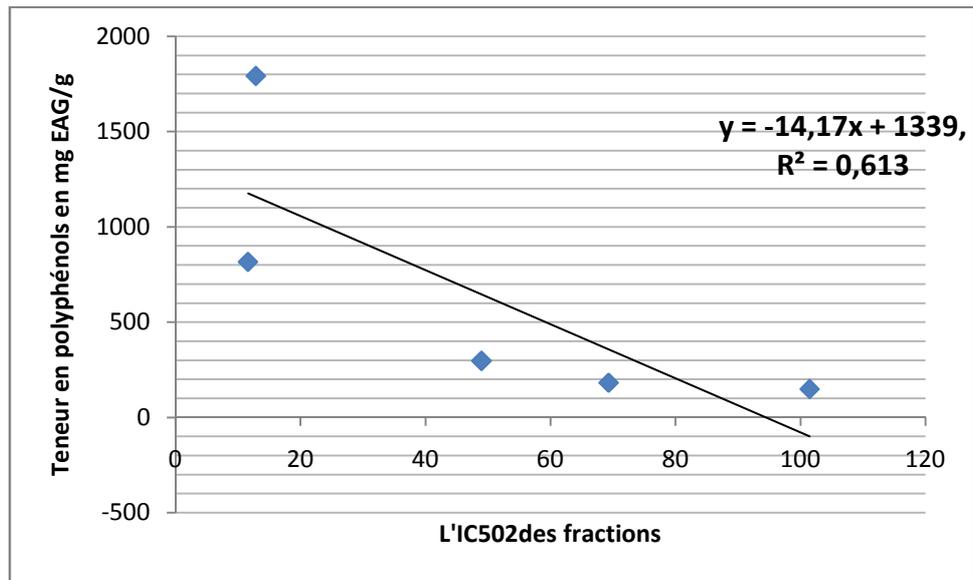
ANNEXE 03 :

Figure : Courbe de corrélation entre l'IC50 et la teneur en polyphénols des différentes fractions de l'extrait éthanolique de *Carthamus caeruleus.L*

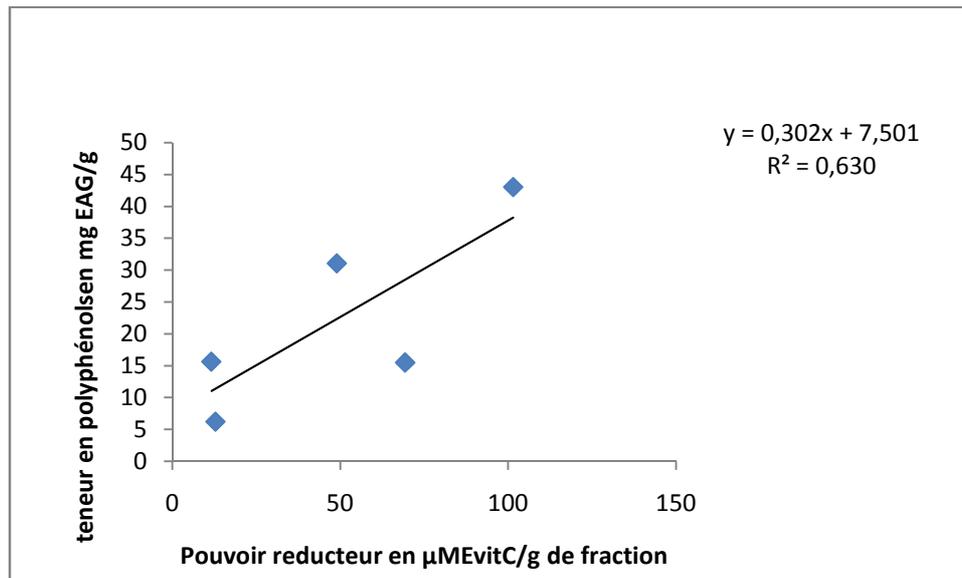
ANNEXE 04 :

Figure : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur de fer en $\mu\text{MEvitC/g}$ et la teneur en polyphénols totaux des différentes fractions de l'extrait éthanolique de *Carthamus caeruleus.L*

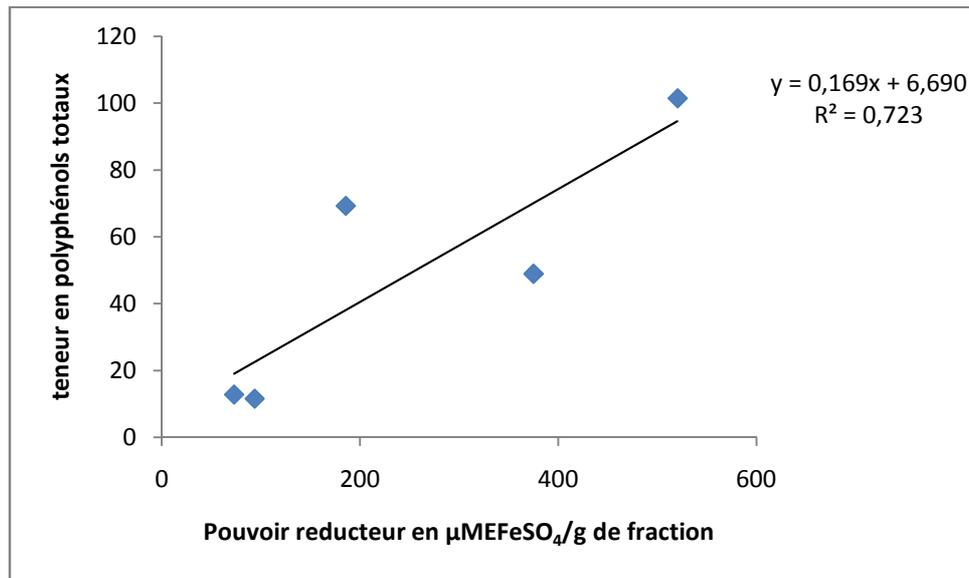
ANNEXE 05 :

Figure : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur de fer en $\mu\text{MEFeSO}_4/\text{g}$ et la teneur en polyphénols totaux des différentes fractions de l'extrait éthanolique de *Carthamus caeruleus.L*

Résumé

La plante *Carthamuscaeruleus.L* étudiée est connue dans le nord algérien notamment en Kabylie sous son nom 'Amarsgus, et son rhizome est largement utilisé en médecine traditionnelle sous forme de crème cicatrisante. La présente étude est consacrée pour évaluer les propriétés antioxydantes des extraits hydro-alcoolique, aqueux ainsi que l'extrait éthanolique et ses fractions, les propriétés antimicrobiennes de l'extrait ethnolique, et l'évaluation de l'activité cicatrisante de la crème cutanée en dernier. La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode AIC13. La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode vanilline-HCL. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes : la méthode de réduction de radical libre DPPH et la méthode de réduction du Fer (FRAP). L'activité antimicrobienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes en employant la méthode de diffusion sur disque solide. L'activité cicatrisante a été évaluée en appliquant la crème cutanée sur une brûlure au moins trois fois par jour pendant 15 jours. Les extraits testés ont révélés une activité antioxydante plus au moins importante. L'évaluation de l'effet cicatrisant de la crème préparée traditionnellement révèle une efficacité importante sur les brûlures.

Mots clés : *Carthamuscaeruleus.L*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobienne, crème cicatrisante.

Abstract

The plant *Carthamuscaeruleus.L* studied is known in north Algeria especially in Kabylia under its name 'Amarsgus, and its rhizome is widely used in traditional medicine in the form of cicatrizing cream. The present study aimed to evaluate the antioxidant properties of aqueous-alcoholic extracts, as well as the ethanolic extract and its fractions, the antimicrobial properties of the ethanolic extract, and the evaluation of the healing activity of the skin cream. The total content of phenolic compound was determined using the Folin-Ciocalteu reagent. Flavonoids were evaluated using the AIC13 method. The content of condensed tannins was determined by the vanillin-HCL method. The antioxidant activity was evaluated using two different methods: the free radical reduction method DPPH and the iron reduction method (FRAP). Antimicrobial activity was determined on five bacterial strains using the solid disk diffusion method. The healing activity was evaluated by applying the skin cream on a burn for 15 days. The extracts revealed an average antioxidant activity. The application of the healing cream on the burned zone confirms its effectiveness in the treatment of burns.

Keywords: Phenolic compounds, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Healing cream.

ملخص

النبته المدروسة معروفة في شمال الجزائر و خاصة في منطقة القبائل. جذورها يستعمل على نطاق واسع في الطب التقليدي باعتباره كريمه معالجه للحروق. خصصت هذه الدراسة لتقييم الخصائص المضادة للأكسدة للمستخلصات المائية الكحولية المائية، الإثنولية و جزيئاته و الخصائص المضادة للميكروبات للمستخلص الإثنولي و أخيرا تقييم النشاط لكريمة الجذومر. تم تحديد المحتوى الكلي للمركبات الفينولية باستخدام كاشف فولين صيوكالتو، و قد تم قياس مركبات الفلافونويد باستخدام طريقة AIC13 تقييم النشاط المضاد الأكسدة تم باستخدام طريقتين مختلفتين: تثبيط الجذر الحر DPPH و تقنية FRAP. تم تحديد النشاط البكتيري لخمسة سلالات بكتيرية باستخدام طريقة النشر على أقراص السلولوز. تم تقييم تأثير الكريمة المعالجه للحروق بتطبيقها على مستوى الجلد ثلاث مرات في اليوم على الأقل لمدة خمسة عشرة أيام. مستخلصات الجذومرات المدروسة أظهرت وجود نشاط مضاد للأكسدة، كما تم اثبات فعالية الكريمة المعدة تقليديا لعلاج الحروق.

الكلمات المفتاحية : القرطم، s المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، نشاط مضادات الميكروبات، للكريمة المعالجه.