

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

-----  
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

## MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

### *THEME*

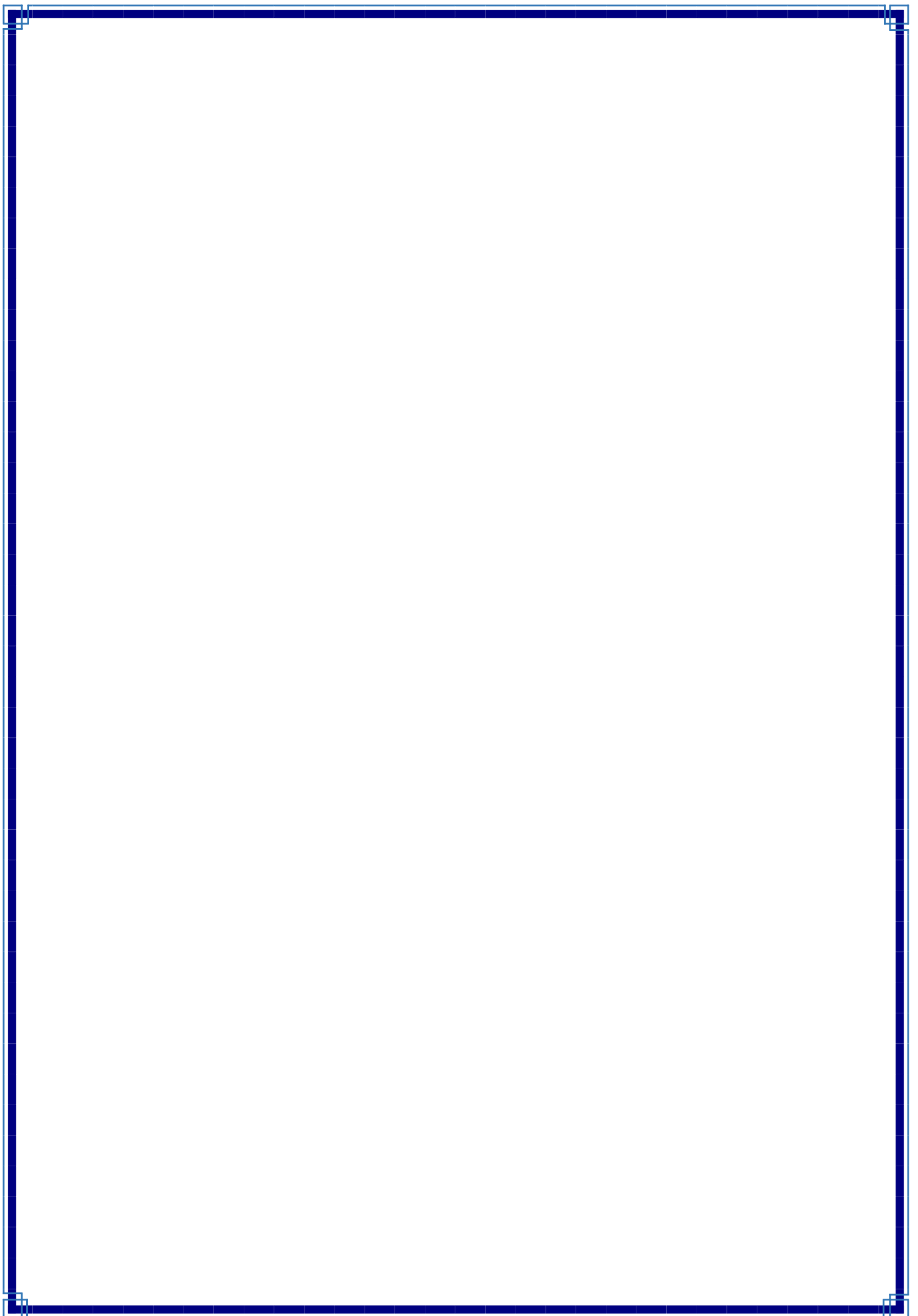
Caractérisation phytochimique et étude biologique de l'huile essentielle et des extraits lourds de *Carthamus caeruleus* et évaluation de leurs effets cicatrisants

Présenté par : **Hammi  
Khaldi**

**Soumer  
Fadhila**

Soutenu publiquement, le 1 / 12 / 2019, devant le Jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Affiliation</i>	<i>Qualité</i>
<i>Nadia Aneur</i>	<i>MCA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Présidente</i>
<i>Nacéra Dahmani</i>	<i>MCA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Encadreur</i>
<i>Fadila Ayati</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Co-Encadreur</i>
<i>Samia Dermeche</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Lila Belmahdi</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Examinatrice</i>



## Résumé

L'objectif de ce travail est la caractérisation et l'identification de composé responsable de l'effet cicatrisant de la plante « *Carthamus caeruleus L.* », cette dernière fait partie de la famille des Asteraceae. Elle est récoltée au niveau de la commune Boudjima de la région de Makouda (wilaya de Tizi-Ouzou, centre Est de l'Algérie).

L'huile essentielle a été extraite par hydro-distillation de type Clevenger révélant que les racines renferment bien plus de quantité d'huile que les feuilles. L'analyse par CPG/SM montre que le composé majoritaire (77.69%) de l'huile est le méthyle linoléate.

L'extraction des polyphénols totaux et flavonoïdes par macération à froid sont obtenus avec des teneurs de 102.5 mgEAG/g pour l'éthanol et 23.4 mgEQ/g pour le Méthanol-eau respectivement. L'activité biologique des extraits est vérifiée par le test de piégeage du radical DPPH pour l'activité antioxydante et la méthode de diffusion en milieu gélosé Muller Hinton agar pour l'activité antibactérienne. Les résultats obtenus par l'étude de l'évaluation de la cicatrisation par induction de la brûlure ont montré une moyenne de rétraction des plaies de l'ordre de  $80,49 \pm 6.28$  % pour le lot traité avec la pommade à base d'huile essentielle de *Carthamus caeruleus*, contre  $70.76 \pm 4.27$  % pour le lot traité avec la Biafine®. Ces résultats ont été confirmés par un diagnostic histopathologique révélant une reconstitution quasi complète des plaies traitées avec l'huile essentielle de la plante en question.

**Mot clés :** *Carthamus caeruleus L.* huile essentielle, extraction, bioactivité, histopathologique, plaies

## Abstract

The objective of this work is the characterization and identification of the compound responsible for the healing effect of the plant "*Carthamus caeruleus L.*", the latter is part of the Asteraceae family. It is harvested at the Boudjima commune of Makouda region (wilaya of Tizi-Ouzou, central eastern Algeria). The essential oil was extracted by Clevenger hydro-distillation revealing that the roots contain much more oil than the leaves. GC / MS analysis shows that the major compound (77.69%) of the oil is methyl linolenate. Extraction of total polyphenols and flavonoids by cold maceration are obtained with contents of 102.5 mgEAG / g for ethanol and 23.4 mgEQ / g for methanol-water respectively. The biological activity of the extracts is verified by the DPPH radical scavenging test for the antioxidant activity and the Muller Hinton Agar agar diffusion method for the antibacterial activity. The results obtained by the study of the evaluation of the healing by induction of the burn showed a mean of retraction of the wounds of the order of  $80,49 \pm 6,28\%$  for the batch treated with the ointment with oil base of *Carthamus caeruleus*, compared to  $70.76 \pm 4.27\%$  for the batch treated with Biafine®. These results were confirmed by a histopathological diagnosis revealing an almost complete reconstitution of wounds treated with the essential oil of the plant in question.

**Key words:** *Carthamus caeruleus L.* essential oil, extraction, bioactivity, histopathological, wounds

# Remerciement

Ce travail a été réalisé dans différents laboratoires à savoir : Laboratoire pharmaceutique de l'UMMTO, laboratoire analytique de l'USTHB, laboratoire anatomopathologie de l'école national supérieur vétérinaire d'Alger et de CHU de Tizi-Ouzou et le laboratoire pharmacotoxicologie du CDR SAIDAL à Alger.

Nous voudrions dans un premier temps remercier chaleureusement, les trois personnes, sans-elles, ce travail n'aurait jamais pris jours ;

Madame Dahmani Nacera, notre promotrice, qui a partagé ses connaissances et expériences dans ce milieu, tout en nous accordant sa confiance et une large indépendance dans l'exécution de missions valorisantes. De nous avoir soutenus dans chaque étape, mais surtout d'avoir cru en nous.

M AYATI Fadhila, notre co-promotrice, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué en grande partie à alimenter nos réflexions. Mais surtout pour son côté affectueux, qui nous a donné tant de plaisir à partager ces moments avec elle.

M BELKADHI Asma, à qui nous adressons encore une fois de plus, nos sincères remerciements, de nous avoir ouvert les portes à SAIDAL pour tout le long travail qu'elle a accomplie pour la réussite de ce mémoire, pour sa patience et son soutien qu'elle nous a accordé. Sans oublier toute l'équipe de CRD SAIDAL ; Dahmani Ghania, ami Taher et Rachid.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury, Nadia Ameer, qui nous fait l'honneur de présider ce jury, M<sup>me</sup> Belmahdi Lila et M<sup>me</sup> Dermeche Samia pour avoir accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous remercions également toute l'équipe de l'laboratoire de chimie pharmaceutique, surtout Tounsia et Djidji, d'être présente à nos côtés et nous permettre d'assuré la partie pratique de ce mémoire, ainsi que M Tizouirt et Mr Benchoulak de de nous avoir beaucoup aidés et orientés, sans oublier tous nos professeurs de la faculté de chimie.

J'adresse aussi tous nos remerciements à M Ainouze, Rachid de l'UNSV et Dr Saidani ainsi que le Pr Bensarai, du service d'Anapath au CHU, d'avoir assuré l'étude histopathologique. Dr BIA du service pédiatrie, et à toute l'équipe du laboratoire central au CHU, de m'avoir enrichi par leurs connaissances.

Nos sincères remerciements aussi à nos amis ; Ouiza, Tarik, Massi, Lamia, Dyhia, Yacine, Taoues, Katia, Ghnima, Sofiane, Nassim et tous les autres qui ont contribué du pré ou du loin pour ce travail.

Et, au final, bien que leurs places soient toutes en premier dans mon cœur ; je tiens à avouer mes sincères remerciements à ma chère famille et mon amour, qui ont donnés de tous leurs âmes pour la réussite de cette merveilleuse expérience, je vous aime.

# SOMMAIRE

**Glossaire**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction générale**

## **Chapitre 1: Synthèse Bibliographique**

1.1	Etude botanique de la plante.....	3
1.1.1	Carthamus caeruleus L.....	3
1.1.1.1	Classification phylogénique.....	3
1.1.2	Description botanique de la plante.....	3
1.1.3	Distribution géographique.....	4
1.1.4	Utilisation de Carthamus caeruleus.....	4
1.1.5	Composition chimique.....	4
1.2	Principales substances actives.....	5
1.2.1	Polyphénols.....	5
1.2.2	Flavonoïdes.....	5
1.2.3	Acides phénoliques.....	7
1.2.4	Tannins.....	8
1.2.5	Coumarines.....	8
1.2.6	Alcaloïdes :.....	8
1.2.7	Hétérosides :.....	8
1.2.8	Quinones.....	9
1.2.9	Intérêts thérapeutiques des polyphénols.....	9
1.2.10	Méthode d'obtention des polyphénols.....	10

1.3	Huiles essentielles.....	10
1.3.1	Composition chimique d'une huile essentielle.....	11
1.3.2	Obtention des huiles essentielles :.....	11
1.3.3	Propriétés et intérêt thérapeutique des huiles essentielles.....	11
1.3.4	Toxicité des huiles essentielles .....	12
1.4	Etudes biologiques.....	13
1.4.1	Activité antioxydante .....	13
1.4.1.1	Radicaux libres.....	13
1.4.1.2	Antioxydants .....	13
1.4.1.3	Détermination de l'activité antioxydante.....	14
1.4.2	Activité antimicrobienne .....	14
1.4.2.1	Propriétés antimicrobiennes.....	14
1.4.2.2	Mode d'action contre les bactéries.....	15
1.5	Méthodes d'analyses.....	15
1.5.1	Chromatographie gazeuse .....	15
1.5.2	Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse CG/SM.....	16
1.5.3	Grandeurs de rétention .....	16
1.6	Generalites sur la peau :.....	17
1.6.1	Cicatrisation .....	18
1.6.1.1	Cicatrice primaire.....	18
1.6.1.2	Maturation de la cicatrice primaire .....	19

## **Chapitre 2: Matériel et méthodes**

2.1	Matériel.....	20
2.2	Matière végétale .....	20
2.3	Détermination de la teneur en eau .....	21
2.4	Étude phytochimique .....	21

2.4.1	Huiles essentielles .....	22
2.4.1.1	Préparation de la matière végétale .....	22
2.4.1.2	Extraction de l'huiles essentielle.....	22
2.4.1.3	Détermination des rendements des extractions .....	22
2.4.1.4	Composition chimique de l'huile essentielle .....	23
2.4.1.5	Identification des composés .....	23
2.4.2	Polyphénols .....	24
2.4.2.1	Matière végétale .....	24
2.4.2.2	Screening phytochimique.....	24
2.4.2.3	Préparation des échantillons .....	24
2.4.2.4	Caractérisation et mise en évidence .....	24
2.4.3	Extraction des polyphénols .....	27
2.4.3.1	Rendement des extractions .....	28
2.4.4	Analyse quantitative des extraits.....	28
2.4.4.1	Dosage des polyphénols totaux.....	28
2.4.4.2	Dosage des flavonoïdes.....	29
2.5	Activité biologique .....	29
2.5.1	Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	29
2.5.1.1	Protocole expérimental .....	30
2.5.1.2	Détermination de L'inhibition du radical DPPH .....	30
2.5.2	Etude de l'activité antibactérienne .....	31
2.5.2.1	Matériel microbiologique.....	31
2.5.2.2	Procédure expérimentale.....	31
2.6	Formulation galénique .....	32
2.6.1	Formulation de la pommade traditionnelle .....	32
2.6.2	Formulation de la pommade pharmaceutique .....	32
2.6.3	Contrôle qualité .....	33

2.7	Etude pré-clinique : .....	34
2.7.1	Etude de l'activité cicatrisante : induction d'une brûlure.....	34
2.7.1.1	Expérimentation .....	34
2.7.1.2	Evaluation macroscopique clinique de la brûlure.....	36
2.7.1.3	Evaluation de la douleur selon la cotation .....	36
2.7.1.4	Evaluation pondérale .....	36
2.7.2	Evaluation du processus cicatriciel .....	36
2.7.3	Traitement statistique .....	37
2.8	Etude histopathologique .....	37
2.8.1	Expérimentation .....	37
2.8.2	Interprétation des résultats .....	38

### **Chapitre 3: Résultat et discussion**

3.1	Détermination de la teneur en eau .....	40
3.2	Etude phytochimique.....	41
3.2.1	Huiles essentielles .....	41
3.2.1.1	Caractères organoleptiques des huiles essentielles de <i>Carthamus caeruleus</i> .....	41
3.2.1.2	Rendement de l'HE extraite.....	41
3.2.1.3	Identification et analyse de l'huile essentielle par CPG/SM : .....	43
3.2.2	Screening phytochimiques : .....	44
3.2.3	Rendements des extraits .....	46
3.2.4	Dosage des biomolécules .....	48
3.2.4.1	Teneur en polyphénols totaux.....	48
3.2.4.2	Teneur en flavonoïdes :.....	49
3.3	Activité biologique .....	50
3.3.1	Evaluation de l'activité antioxydante :.....	50

3.3.2	Etude antibactérienne : .....	52
3.4	Formulation .....	53
3.4.1	Contrôle qualité des pommades .....	53
3.5	Etude préclinique .....	54
3.5.1	Aperçu général sur le déroulement et les résultats de l'expérimentation.....	54
3.5.2	Observations cliniques de l'aspect des brûlures.....	54
3.5.3	Evaluation macroscopique clinique des brûlures .....	55
3.5.4	Évolution du processus cicatriciel.....	57
3.5.5	Evaluation de l'intensité de la douleur liée à la brûlure .....	60
3.5.6	Évolution pondérale .....	61
3.6	Etude histopathologique .....	63
3.6.1	Discussion générale des résultats : .....	66

## **Conclusion générale**

## **Annexes**

## **Références bibliographiques**

## GLOSSAIRE

- **Photoprotection** : La photoprotection désigne tous les moyens, naturels ou artificiels, visant à limiter l'exposition de la peau au rayonnement solaire
- **Cytotoxique** : Se dit d'une substance toxique pour une espèce de cellule
- **Antitumoral** : Désigne ce qui a la capacité de lutter contre une tumeur, qui peut faire stagner l'évolution d'une tumeur ou détruire la tumeur elle-même
- **Antispasmodique (ou spasmolytique)** : Est un produit permettant de lutter contre les spasmes musculaires
- **Les œstrogènes** : Régulent le cycle menstruel de la femme
- **Thrombose** : Une thrombose, c'est un caillot appelé aussi thrombus se formant dans un vaisseau sanguin et l'obstruant. Le caillot peut se former dans une veine ou dans une artère
- **Anti-carcinogène** : Qui cause ou peut causer le cancer
- **Hépatoprotection** : (Protection du foie) et activité anti-toxines
- **Escarre** : Croûte noirâtre formée sur la peau par la nécrose des tissus, après une brûlure, un frottement prolongé, etc
- **Réépithélialisations** : Régénération d'un épiderme par les kératinocytes
- **Exsudat** : L'ensemble des fluides produits par les plaies aiguës ou chroniques une fois la phase hémostatique terminée
- **Fibrineux, (euse)** : Constitué de fibrine (substance protidique filamenteuse de couleur blanche, inodore, qui entoure les globules de la lymphe et du sang lorsque se produit la coagulation
- **La nécrose** : Est une forme de dégât cellulaire qui mène à la mort prématurée et non programmée des cellules dans le tissu vivant.
- **Berge de la plaie** : Pourtour de la plaie
- **Lit de la plaie** : C'est le lieu même où se situe la perte de substance dans une plaie (au milieu)
- **Peau péri-lésionnelle** : Peau adjacente à la plaie ;
- **Un œdème** : Est une accumulation anormale de liquide entre les tissus.  
L'œdème concerne essentiellement la peau ou les muqueuses, où il produit un gonflement

- **Squames** : Lamelle qui se détache de l'épiderme
- **Angiogenèse** : L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants
- **Epithélium** : Tissu formé de cellules juxtaposées qui recouvre la surface du corps ou qui tapisse l'intérieur de tous les organes creux
- **Histopathologie** : Diagnostic par l'étude microscopique des tissus
- **Collagène** : Protéine fibreuse du tissu conjonctif
- **Kératinocyte** : Sont des cellules constituant 90 % de la couche superficielle de la peau (épiderme) et des phanères (ongles, cheveux, poils, plumes, écailles)
- **Annexe cutanée** : C'est l'ensemble des glandes sudoripares, les follicules pilo-sébacés (ou poil) et les ongles.
- **Glande sébacé** : Est une glande intradermique (présente dans le derme moyen ), annexée au poil (sauf dans certains zones particulières telles que les lèvres ou l'aréole par exemple où ces glandes sont seules), sécrétant le sébum qui limite le dessèchement de la peau, joue un rôle bactéricide et lubrifie le poil
- **Tissu conjonctif** : Qui occupe les intervalles entre les organes.
- **Plaie hypertrophique** : Cicatrice anormale dépassant la surface de la peau.
- **Chéloïde** : Boursouffure fibreuse qui peut se former sur la peau à l'endroit d'une cicatrice.
- **Fibroblaste** : Cellule jeune, peu différenciée, du tissu conjonctif.
- **Corium** : Derme
- **Les myofibroblastes** : Sont des fibroblastes possédant la particularité d'exprimer l'actine  $\alpha$ -SMA. Ils jouent un rôle important dans la plasticité, la migration et la motilité de la cellule au sein du tissu conjonctif
- **Polynucléaire neutrophile (PNN)** : Les polynucléaires sont des globules blancs (ou leucocytes), et donc des cellules de défense de l'organisme.
- **Les granulocytes éosinophiles** : Sont les globules blancs les plus rares dans la circulation sanguine
- **Détersion** : Détachement de la croûte de la peau lors de la cicatrisation
- **Ulcère** : Perte de substance de la peau ou d'une muqueuse sous forme de plaie qui ne cicatrise pas
- **Infiltrat inflammatoire polymorphe** : Comportant des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles organisant un afflux cellulaire dans le foyer inflammatoire

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b>	: <i>Carthamus caeruleus</i> .....	4
<b>Figure 1.2</b>	: Structure de base de flavonoïde. ....	6
<b>Figure 1.3</b>	: Différentes classes de flavonoïdes.....	6
<b>Figure 1.4</b>	: Structure de base de l'acide hydroxy-benzoïque .....	7
<b>Figure 1.5</b>	: Structure de base de l'hydroxy-cinnamique .....	7
<b>Figure 1.6</b>	: Structure chimique de coumarine .....	8
<b>Figure 1.7</b>	: Structure de base d'aglycone.....	9
<b>Figure 1.8</b>	: Structure du radical stable DPPH° .....	14
<b>Figure 1.9</b>	: Appareillage de la chromatographie en phase gazeuse.....	16
<b>Figure 1.10</b>	: Structure biologique de la peau.....	17
<b>Figure 2.1</b>	: <i>Carthamus caeruleus</i> récolté à la station d'Agouni-Oufekous.....	20
<b>Figure 2.2</b>	: Zone géographique de la récolte de <i>Carthamus Caeruleus</i> . ....	21
<b>Figure 2.3</b>	: Hydrodistillation de l'EH par un appareil de type : Clevenger. ....	22
<b>Figure 2.4</b>	: Concentration de filtrat au rota-vapeur .....	27
<b>Figure 2.5</b>	: Décocté des racines de <i>Carthamus caeruleus</i> .....	32
<b>Figure 2.6</b>	: Préparation de la pommade pharmaceutique. ....	33
<b>Figure 2.7</b>	: Kétamine HCl .....	35
<b>Figure 2.8</b>	: Injection d'anesthésie par IM et épilation dorsal des rats.....	35
<b>Figure 2.9</b>	: Induction de la brûlure par la masselotte .....	36
<b>Figure 2.10</b>	: Réalisation de la biopsie cutanée 1 .....	37
<b>Figure 2.11</b>	: Tubes ECBU .....	37
<b>Figure 2.11</b>	: Déshydratation des échantillons dans des bains d'alcools .....	38
<b>Figure 3.1</b>	: Teneur en eau relative des racines de <i>Carthamus caeruleus L</i> .....	40
<b>Figure 3.2</b>	: Perte en masse d'eau dans les racines de la plante en fonction du temps .....	40
<b>Figure 3.3</b>	: L'HE de <i>Carthamus caeruleus L</i> .....	41

<b>Figure 3.4</b> : Rendements de l'HE des feuilles et racines .....	42
<b>Figure 3.5</b> : Rendements d'extractions de <i>Carthamus caeruleus</i> L .....	47
<b>Figure 3.6</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	48
<b>Figure 3.7</b> : Teneur en polyphénols dans les extraits de <i>Carthamus. C</i> .....	48
<b>Figure 3.8</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	49
<b>Figure 3.9</b> : Teneur en flavonoïdes dans les extraits de <i>Carthamus. C</i> .....	49
<b>Figure 3.10</b> : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH.....	51
<b>Figure 3.11</b> : Examen microscopique : (a) pommade à base de l'HE, (b) pommade à base d'extrait EtOH : .....	54
<b>Figure 3.12</b> : Pommade à base d'extrait éthanolique (10%). (b) ; pommade à base d'HE. (c) ; crème traditionnelle .....	54
<b>Figure 3.13</b> : Pourcentage de réductions des plaies chez les différents lots .....	58
<b>Figure 3.14</b> : Evolution des plaies des différents lots dans le temps .....	59
<b>Figure 3.15</b> : Evolution de l'intensité de la douleur au fil des jours.....	60
<b>Figure 3.16</b> : Evolution pondérale chez les rats des différents lots .....	62
<b>Figure 3.17</b> : Coupe histologique vu au microscope des rats du lot E1.....	63
<b>Figure 3.14</b> : Coupe histologique vu au microscope de rat du lot E2.....	64
<b>Figure 3.14</b> : Coupe histologique vu au microscope de rat du lot E3.....	64
<b>Figure 3.14</b> : Coupe histologique vu au microscope de rat du lot R .....	65
<b>Figure 3.14</b> : Coupe histologique vu au microscope de rat du lot T.....	65

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1:</b> classification phylogénique de la plante <i>Carthamus caeruleus</i> .....	3
<b>Tableau 2.1:</b> Situation géographique et bioclimatique des de la station .....	21
<b>Tableau 2.2:</b> Conditions opératoires de GC/SM. ....	23
<b>Tableau 2.3:</b> protocole d'identification photochimique .....	25
<b>Tableau 2.4:</b> Souches bactériennes étudiées. ....	31
<b>Tableau 2.5:</b> Ingrédient de la pommade à base d'extrait éthanolique à 10% .....	33
<b>Tableau 2.6:</b> Constitution des lots d'animaux .....	34
<b>Tableau 3.1:</b> Caractères organoleptique de l'HE des racines de <i>Carthamus caeruleus</i> L... ..	41
<b>Tableau 3.2:</b> Différents travaux réalisés sur l'HE de <i>Carthamus caeruleus</i> L. ....	42
<b>Tableau 3.3:</b> Composés chimiques de l'HE de <i>Carthamus.C</i> obtenus par CPG/SM.....	44
<b>Tableau 3.4:</b> Résultats de test phytochimique sur la plante <i>Carthamus caeruleus</i> L.....	45
<b>Tableau 3.5:</b> Résultats de test phytochimique de <i>Carthamus Caeruleus</i> L des travaux antérieurs .. ..	46
<b>Tableau 3.6:</b> Rendements des extraits par différent solvants.. ..	46
<b>Tableau 3.7:</b> Activité antioxydante et pourcentage d'inhibition du radical DPPH.....	50
<b>Tableau 3.8:</b> Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits et de l'huile essentielle des racines de <i>Carthamus caeruleus</i> . ....	52
<b>Tableau 3.9:</b> Contrôle qualité des pommades formulées. ....	53
<b>Tableau 3.10:</b> Observation clinique de l'aspect des brulures chez les différents lots.....	55
<b>Tableau 3.11:</b> Signification des résultats entre les différents lots. ....	57

## Liste des abréviations

**µg** : Microgrammes

**µgEAG** : Microgramme d'équivalent d'acide gallique

**µgEQ** : Microgramme d'équivalent de quercétine

**µL** : Microlitres

**AA** : Acide arachidonique

**ADN** : Acide désoxy-ribo-nucléique

**AGE** : Acides gras essentielles

**ANOVA** : One way analysis of variance

**ATCC** : American type culture collection

**CG** : Chromatographie en phase gazeuse

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse

**CQA** : Dicaffeoylquinic acid

**CRD** : Centre de recherche et développement

**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice minimale

**CR%** : Pourcentage de capture du radical

**D** : Diamètre

**DGLA** : Acide diholo-gamma-linolénique

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

**DL<sub>50</sub>** : Dose létale

**ECBU** : Examen cytobactériologique des urines

**EMAG** : Ester méthylique d'acide gras

**EtOH** : Ethanol

**EC<sub>50</sub>** : concentration efficace

**FID** : Détecteur à ionisation de flamme

**HE** : Huile essentielle

**HIV** : Human immunodeficiency virus

**IE** : Impact électronique

**IM** : Injection musculaire

**IR<sub>50</sub>** : Inhibition radicalaire

**IC<sub>50</sub>** : concentration efficace  
**Kg** : Kilogramme  
**km** : Kilomètres  
**m** : Masse  
**MeOH** : Méthanol  
**mg** : Milligrammes  
**min** : Minutes  
**mL** : Millilitres  
**mm** : Millimètres  
**nm** : Nanomètres  
**P/V** : Poids sur volume  
**PA** : Principe actif  
**PG1** : Prostaglandines de type 1  
**pH** : Potentiel d'hydrogène  
**PNN** : Polynucléaire neutrophile  
**PRP(%)** : Pourcentage de la rétraction de la plaie  
**qsp** : Quantité suffisante pour  
**rpm** : Rotation par minute  
**SIDA** : Syndrome immunodéficientaire acquis  
**SM** : Spectrométrie de masse  
**S<sub>0</sub>** : Surface de la plaie au jour 0  
**S<sub>j</sub>** : Surface de la plaie au jour j  
**UV** : Ultra violet  
**v/v** : Volume sur volume  
**z** : Charge électronique

# **Introduction générale**

Bien qu'employée de différentes manières, la médecine traditionnelle est omniprésente. En effet, les médicaments à base de plantes furent le premier recours de l'humain pour traiter les pathologies cela bien évidemment en ignorant les composés responsables de l'effet voulu. Cette alternative occupe jusqu'à ce jour une place très importante dans le développement d'état de la santé mais plus encore, regagne de l'attention dans le monde.

L'investissement dans des travaux de recherches portant sur l'exploitation des plantes médicinales s'impose en raison de l'impact environnemental induit par l'industrie pharmaceutique, le but serait également de parvenir à produire des préparations démunies d'un maximum d'effets secondaires engendrés par la thérapie traditionnelle avec des coûts abordables. Le territoire Algérien possède une richesse inestimable en plantes médicinales. De long en large regorgeant de ces sources inépuisables en remèdes naturelles. Malgré cela, l'exploitation de ces plantes dans notre pays demeure restreinte. Afin de susciter plus d'intérêt vers ce sujet, nous nous sommes intéressées aux vertus thérapeutiques de La Cardoncelle bleu ou « *Carthamus caeruleus L.* » qui est considérablement employée par nos aïeux pour la cicatrisation des plaies induites par des brûlures et disent avoir été témoin de son effet qu'ils décrivent par le terme « surprenant » voir « surréal » ou même « miraculeux ».

La valorisation des plantes médicinales, quel que soit leur débouché, requiert en général une étape de caractérisation qui inclut l'analyse de leur composition chimique. Ainsi, notre étude consiste à l'extraction des huiles essentielles et des composés lourds de la *Carthamus caeruleus L* afin de mettre le doigt sur le composé responsable de l'effet cicatrisant. Pour cela le travail s'est porté sur trois parties distinctes.

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de la partie volatile et non volatile de la plante ; L'extraction des huiles essentielles et de la détermination de leurs compositions chimiques, le screening phytochimique de différents extraits et le dosage des polyphénols et des flavonoïdes. Cette partie est consacrée également à la détermination de l'aspect qualitatif et semi quantitatif des extraits afin de connaître l'impact des solvants d'extraction sur le rendement en essence et sur la composition chimique en polyphénols.

La seconde partie de ce travail traite de l'étude biologique in vitro des extraits.

La troisième partie est consacrée à la formulation d'une pommade à partir des différents extraits, ainsi que de la plante brute. En finale des essais précliniques sur les différentes pommades complétés par une étude histopathologique.

**Chapitre 1**

**Bibliographie**

# **Bibliographie**

## 1.1 ETUDE BOTANIQUE DE LA PLANTE

### 1.1.1 *Carthamus caeruleus* L

Le genre *Carthamus* fait partie de la famille des Asteraceae qui comprend 14 espèces vivaces herbacées dont le *Carthamus caeruleus* L.

Les Asteraceae est une famille appartenant aux Dicotylédones comprenant plus de 1500 genres et plus de 25000 espèces, c'est la plus importante des Angiospermes, ce sont presque toujours des plantes herbacées avec souvent des racines charnues : rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes, occupant tous les continents sauf l'Antarctique [1].

#### 1.1.1.1 Classification phylogénique

La classification phylogénique de la plante *Carthamus caeruleus* est détaillée dans le (Tableau 1.1) :

**Tableau 1.1:** La classification phylogénique de la plante *Carthamus caeruleus* [1].

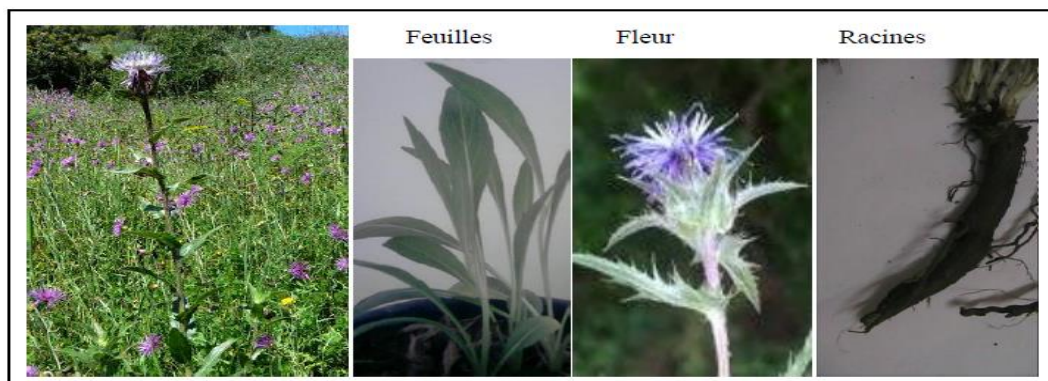
<b>Règne</b>	Plantae
<b>Embranchement</b>	Spermaphites
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Asterales
<b>Famille</b>	Asteraceae
<b>Sous famille</b>	Carduoideae
<b>Genre</b>	<i>Carthamus</i>
<b>Groupe</b>	Cardueae
<b>Sous-groupe</b>	Centaureinae
<b>Espèce</b>	<i>Carthamus caeruleus</i> L

#### 1.1.2 Description botanique de la plante

La *Carthamus caeruleus* est une plante vivace vigoureuse de 0,2 à 0.6 m de hauteur. La tige très peu rameuse de 30 à 60cm, dressée et velue. Les feuilles sont pubescentes, fortement nervées, à contour ovale, les supérieures sont fortement dentées et épineuses.

Son rhizome est composé de racine principale qui évolue horizontalement et des racines secondaires qui évoluent verticalement.

L'inflorescence se présente sous forme d'un capitule dont les fleurs sont bleues. Les fruits sont des akènes (**Figure 1.1**). Sa période de floraison s'étale de mai à juillet [2].



**Figure 1.1:** *Carthamus caeruleus*.

### 1.1.3 Distribution géographique

C'est une espèce peu commune que l'on peut rencontrer dans les terrains maigres. Elle préfère les lieux secs et ensoleillés du bassin méditerranéen. Elle est originaire du Sud-Ouest de l'Asie, elle est répandue dans le reste de l'Asie, en Afrique du nord (Algérie, Maroc, Tunisie, Libye), en Australie, dans les deux Amériques ainsi qu'en Europe (Grèce, Italie, France, Portugal, Espagne). En Algérie, elle se trouve dans les régions côtières méditerranéennes (Tipaza, Annaba, Bejaia, Boumerdes, Sidi bel-abbés...) ainsi que dans les hauts plateaux [2].

### 1.1.4 Utilisation de *Carthamus caeruleus*

Traditionnellement, les racines de *Carthamus Caeruleus* sont utilisées contre les maladies de la peau, surtout comme cicatrisant ainsi que les inflammations articulaires. Les études ethnobotaniques ont montré que la majorité de la population locale (74,98%) dans le Nord Algérien notamment en Kabylie utilisent les racines de cette plante pour la guérison des brûlures de divers degré sous forme de poudre ou de crème. Cette dernière est préparée à partir des racines préalablement lavées et épluchées, puis bouillies dans du lait ou de l'eau. Ces racines sont ensuite écrasées, réduites en pommade et appliquée sur les brûlures [1].

### 1.1.5 Composition chimique

*Carthamus caeruleus* est une plante riche en métabolites secondaires qui offrent leurs vertus médicinales, parmi ces métabolites on trouve des constituants volatiles, l'huile essentielle et des constituants non volatiles ; polyphénols et flavonoïdes.

Les études menées sur les effets pharmacologiques des rhizomes du *Carthamus caeruleus* par **Baghiani et al (2010)** et **Benhamou (2013)** ont montrées :

- L'effet antioxydant significatif de piégeage de radicaux libres dû à sa richesse en acides phénols et en flavonoïdes.
- L'effet cicatrisant confirmé par des tests réalisés sur la peau d'animaux brûlés. L'observation macroscopique a montré qu'il y a une guérison presque complète après 15 jours, la réduction en pourcentage de surface brûlée de l'animal est de 85,66%, ce qui est nettement supérieur à celui des animaux traités avec **Madécassol**<sup>®</sup> 75,12% [1].

## 1.2 PRINCIPALES SUBSTANCES ACTIVES

### 1.2.1 Polyphénols

Les polyphénols constituent un groupe important de substances naturelles largement répandues dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires des plantes. Plus de 8000 constituants, allant de molécules simples à des composés hautement complexes ont été identifiés à ce jour [2]. Ils possèdent dans leur squelette, un ou plusieurs cycles aromatiques portant un ou plusieurs groupes hydroxyles ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...). Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales et les attaques microbiennes [3,4,5].

Généralement, ils sont subdivisés en :

- Flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ;
- Acides phénoliques,
- Tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ;
- Coumarines ;
- Lignines et d'autres classes existent en nombres considérables ;

Ils sont responsables à la fois de l'arôme, de la couleur et des propriétés anti oxydantes des végétaux [6].

### 1.2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents, et distribués de manière générale, dans toutes les plantes vasculaires. Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C (**Figure 1.2**).

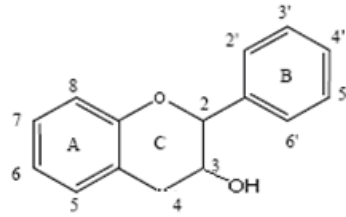


Figure 1.2 : Structure de base d'un flavonoïde.

Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C (Figure 1.2). Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont regroupés sur la (Figure 1.3).

<p>Flavones</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>4'</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Apigénine</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Lutéoline</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>OH</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>		5	6	7	4'	Apigénine	OH	-	OH	OH	Lutéoline	OH	-	OH	-	<p>Flavonols</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>5</th> <th>7</th> <th>3'</th> <th>4'</th> <th>5'</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Quercétine</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Kaempférol</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>-</td> <td>OH</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Myricétine</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table>		5	7	3'	4'	5'	Quercétine	OH	OH	OH	OH	-	Kaempférol	OH	OH	-	OH	-	Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH				
	5	6	7	4'																																								
Apigénine	OH	-	OH	OH																																								
Lutéoline	OH	-	OH	-																																								
	5	7	3'	4'	5'																																							
Quercétine	OH	OH	OH	OH	-																																							
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-																																							
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH																																							
<p>Chalcones</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>3</th> <th>4</th> <th>2'</th> <th>4'</th> <th>6'</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Buteïne</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Phlpretine</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table>		3	4	2'	4'	6'	Buteïne	OH	OH	OH	OH	H	Phlpretine	H	OH	OH	OH	OH	<p>Anthocyanines et anthocyanidines</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>5</th> <th>7</th> <th>3'</th> <th>4'</th> <th>5'</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pelargonidine</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Cyanidine</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Péonidine</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		5	7	3'	4'	5'	Pelargonidine	OH	OH	H	OH	H	Cyanidine	OH	OH	OH	OH	H	Péonidine	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	<p>Flavanones</p>
	3	4	2'	4'	6'																																							
Buteïne	OH	OH	OH	OH	H																																							
Phlpretine	H	OH	OH	OH	OH																																							
	5	7	3'	4'	5'																																							
Pelargonidine	OH	OH	H	OH	H																																							
Cyanidine	OH	OH	OH	OH	H																																							
Péonidine	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H																																							
<p>Flavanols</p>	<p>Isoflavanones</p>	<p>Isoflavones</p>																																										

Figure 1.3: Différentes classes de flavonoïdes.

Ces molécules se rencontrent à la fois sous forme libre, mais sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. Ils sont localisés dans divers organes : fleurs, fruits, feuilles, tiges et racines. [2].

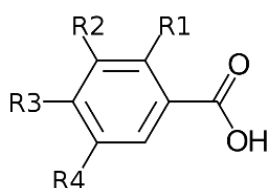
Ils sont responsables de la coloration des végétaux et assurant la protection vis-à-vis des rayonnements ultra-violet. Ils sont les composés biologiquement les plus actifs parmi les polyphénols [7].

### 1.2.3 Acides phénoliques

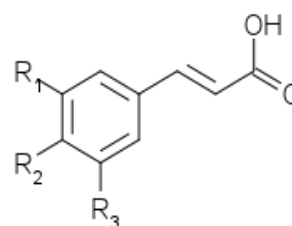
Les acides phénoliques, ont au moins une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature.

Ce sont les dérivés de l'acide benzoïque (acides hydroxy-benzoïques), (**Figure 1.5**) et de l'acide cinnamique (acides hydroxy-cinnamiques), (**Figure 1.4**). Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides.

- ❖ Les acides hydroxy-benzoïques dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ces hydroxyles phénoliques « OH » peuvent ensuite être méthylés (-O-CH<sub>3</sub>).
- ❖ les acides hydroxy-cinnamiques dérivent de l'acide cinnamique avec une structure de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Ils appartiennent à la grande famille des phénylpropanoïdes. Les hydroxyles phénoliques « OH » peuvent aussi être méthylés (-O-CH<sub>3</sub>).



**Figure 1.4:** Structure de base de l'acide hydroxy-benzoïque.



**Figure 1.5 :** Structure de base de l'hydroxy-cinnamique.

Dans les plantes, les acides-phénols sont souvent sous forme d'esters d'alcools aliphatiques ou d'esters de l'acide quinique, de l'acide rosmarinique ou de glycosides [8].

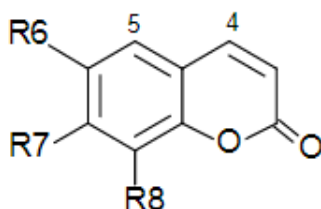
### 1.2.4 Tannins

Les tanins sont des substances amorphes contenues dans de nombreux végétaux. Dérivés poly-phénoliques de structure complexe, de poids moléculaire allant de 300 à 100 000.

Habituellement on distingue chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins par leurs structures et par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [9].

### 1.2.5 Coumarines

Les coumarines sont des composés chimiques hétérocycliques de la famille des polyphénols, produits par la combinaison d'un noyau benzène avec un pyrane, présentant une fonction cétone en position  $\alpha$  par rapport à l'oxygène (**Figure 1.6**). Très largement distribuées dans le règne végétal, plus d'un millier de coumarines naturelles ont été décrites [10].



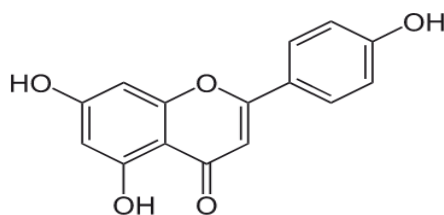
**Figure 1.6:** Structure chimique de coumarine.

### 1.2.6 Alcaloïdes :

Ce sont des composés organiques azotés tirés des végétaux, dotés d'une activité thérapeutique intense. Ils représentent un groupe de métabolites secondaires très diversifiés retrouvés chez les organismes vivants, aussi bien chez les végétaux, les animaux et dans certains micro-organismes. Il existe plus de 6000 alcaloïdes mais ce nombre est en augmentation constamment tel que la quinine, la morphine, la strychnine, l'atropine, la scopolamine et la nicotine [11].

### 1.2.7 Hétérosides :

Les hétérosides sont des substances qui résultent de la condensation d'un ou plusieurs oses avec une partie non glucidique (génine ou aglycone), (**figure 1.7**). Elles désignent des substances variées qu'on trouve surtout chez les plantes. Ils sont classés en *O*-, *C*-, *S*- et *N*-hétérosides selon la nature de l'atome de l'aglycone engagé dans la liaison osidique [12].



**Figure 1.7:** Structure de base d'aglycone.

### 1.2.8 Quinones

Les quinones se présentent sous forme de pigments biologiques (biochromes), notamment les benzoquinones, les naphtoquinones, les anthraquinones et les quinones polycycliques.

Les quinones se trouvent dans les bactéries, dans certains champignons et dans diverses formes de plantes supérieures [13].

### 1.2.9 Intérêts thérapeutiques des polyphénols

Ces dernières années, les recherches sur les composés phénoliques se sont accentuées en raison de leurs activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, anti oxydantes et même anticancéreuses [14].

Les flavonoïdes sont des composés importants pour la nutrition et la santé humaine. Ainsi, la consommation quotidienne moyenne recommandée des flavonoïdes est environ 1g pour chaque personne [15]. Toutes les études épidémiologiques et animales, ont suggérées qu'une alimentation riche en flavonoïdes, est plus particulièrement les flavones, peut réduire le risque de nombreux cancers (cancer de poumon et de colon), les maladies coronaires, et les inflammations chroniques.

De nos jours, les propriétés thérapeutiques et les effets attribuées aux flavonoïdes sont largement étudiées et approuvés, dont la liste s'allonge : Inhibiteurs d'enzymes, antimicrobiens, photo protecteurs, anti-HIV, Antiviraux, Anti-inflammatoires, cytotoxiques et antitumoraux, antibactériens, antiallergiques, traitement d'anomalies thrombotiques et artérioscléroses antigéniques dans la prévention du cancer et des maladies cardio-vasculaires, analgésiques, antispasmodiques, ostrogéniques et/ou anti-ostrogéniques, antioxydants et anti radicalaires et anti-carcinogéniques [16, 17, 18, 19].

Les composés phénoliques présentent une forte activité antioxydante, qui leur confère un grand intérêt d'un point de vue nutritionnel. Ils montrent également de multiples propriétés médicinales, entre autres en tant qu'analgésiques, antihypertenseurs, hépato- protecteurs anti inflammatoires et anticancéreux.

Ces composés sont présents, dans des extraits végétaux actuellement commercialisés (extraits à base d'artichaut ou d'échinacée). Ils possèdent également d'importantes propriétés anti-infectieuses, notamment antivirales [20].

Ils constituent une nouvelle classe d'anti rétrovirus, en particulier pour le traitement du SIDA, par leur action inhibitrice sur l'intégrase du HIV [21, 22, 23].

Cependant, le 3, 5-diCQA et ses isomères, à part le 1,3-diCQA (ou cynarine), isolée de l'artichaut, ne sont pas aisément disponibles commercialement. Aussi ces composés doivent-ils être extraits de différents végétaux. Outre l'artichaut, on peut citer le café (EP0299107), le tournesol chez qui on a décrit la surproduction de composés phénoliques et plus particulièrement d'acides dicaféoylquiniques et l'*Artemisia herba-alba* chez qui on a isolé les acides dicaféoylquiniques et tricaféoylquiniques [24, 25, 26].

### 1.2.10 Méthode d'obtention des polyphénols

Les flavonoïdes peuvent être extraits selon le protocole général de tous les métabolites secondaires, basé sur la macération dans un système hydro-alcoolique suivie de l'extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane ou chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol).

Les flavonoïdes aglycones polyméthoxylés sont plus fréquents dans les extraits apolaires alors que les flavonoïdes monoglycosylés et aglycones polaires se trouvent plus généralement dans l'extrait acétate d'éthyle. Les flavonoïdes polyglycosylés sont plus fréquents dans l'extrait n-butanol.

## 1.3 HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles sont des produits odorants, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie. Elles sont sécrétées par des cellules spécialisées se trouvant aussi bien dans les feuilles, les fleurs, le bois, les racines et les graines. La taille de ces gouttelettes est de quelque micron. Lorsque que l'on froisse la plante, les gouttelettes sont libérées dans l'atmosphère et parviennent jusqu'à notre nez [27, 28].

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums [29].

### 1.3.1 Composition chimique d'une huile essentielle

Les huiles essentielles peuvent contenir plus d'une centaine de composés aromatiques dans des proportions très variables.

Ce sont ces différentes combinaisons de molécules qui donnent des propriétés si particulières aux huiles essentielles et qui sont responsables de leur odeur caractéristique. Les composés qu'on trouve majoritairement dans la composition chimique de l'huile essentielle sont les terpènes, les alcools, les phénols, des phénols méthyl-éthers, les oxydes, les aldéhydes, les esters, les cétones, les lactones, les coumarines et composés soufrés [30].

### 1.3.2 Obtention des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont obtenues soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage, l'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. En général le choix de la méthode d'extraction dépend de la nature de matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés à extraire, du rendement en huile et de la fragilité de certains constituants des huiles. [27, 31].

#### ❖ Extraction par hydrodistillation :

La plante est mise en contact avec de l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité [32].

#### ❖ Extraction par solvant :

Elle consiste à épuiser la matière végétale de ses constituants odorants au moyen d'un solvant sélectif, le solvant chargé est récupéré par évaporation sous vide, pour éviter la dégradation thermique des molécules odorantes.

Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité, inertie chimique, température d'ébullitions pas trop élevée pour permettre son élimination totale [32].

### 1.3.3 Propriétés et intérêt thérapeutique des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés médicinales en commun, elles sont efficaces pour de nombreux germes et virus ainsi que les mycoses.

Chaque huile essentielle à sa spécificité thérapeutique. Les propriétés et les modes d'utilisation particuliers ont donné naissance à la phytothérapie (l'aromathérapie), où elles sont utilisées comme antiseptiques contre les maladies infectieuses.

Elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants entant qu'agents antimicrobiens à large spectre [28, 33].

- L'effet antibactérien dû généralement aux phénols (carvacrol, thymol), des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol) et des aldéhydes (néral, géranial).
- L'effet Antivirale des HE constitue une aubaine pour traiter les virus qui donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles. Ces fléaux infectieux, sont très sensibles aux molécules aromatiques.
- L'effet Antifongique des HE est dû à la présence des monotérpéniques et sesquiterpéniques oxygénés et les lactones sesquiterpéniques. Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension.
- L'effet antiparasitaire est dû au groupe des phénols qui possède une action puissante contre les parasites.
- L'effet Antiseptique est favorisé par les aldéhydes et les terpènes qui sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et qui s'opposent à la prolifération des germes pathogènes [34].

#### 1.3.4 Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise. Les huiles essentielles semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est prise en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles essentielles sont des substances très puissantes et très actives, il ne faut donc jamais exagérer dans les doses, quel que soit la voie d'absorption, car toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée [35, 36].

##### ❖ Toxicité aigüe :

Les HE en générale ont une toxicité aigüe par voie orale. La majorité ont une **DL<sub>50</sub>** comprise entre 2 et 5g /kg (anis, eucalyptus, girofle,) ou ce qui est le plus fréquent, supérieur à 5g/kg (camomille, lavande). D'autres HE contenant les cétones comme l' $\alpha$ -Thujone (armoise blanche) sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux [32, 37].

##### ❖ Toxicité dermique :

Certaines HE sont irritantes (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines).

Il faudra toujours les diluer avec une huile végétale (80%) et les appliquer sur des surfaces corporelles bien localisées [38, 39, 37].

#### ❖ **Cancérogénicité :**

Il existe quelques composés des HE capables d'induire la formation de cancers. Cas de dérivés d'allyle benzènes ou de propényle benzènes comme le saffrole (*Sassafras*), l'estragole (*Artemisia dracunculus*), le  $\beta$ -asarone (*Acorus calamus*) [24, 37].

## **1.4 ETUDES BIOLOGIQUES**

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens. Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités ou pouvoirs biologiques.

### **1.4.1 Activité antioxydante**

L'un des facteurs importants du vieillissement est une diminution progressive de la capacité des cellules à lutter contre les phénomènes d'oxydation. Il existe des défenses physiologiques naturelles contre les agressions des radicaux libres et une part significative de ces défenses provient de la nourriture. Dans les plantes aromatiques les flavonoïdes forment l'une des plus importantes familles ayant un pouvoir antioxydant [40].

#### **1.4.1.1 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 ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) et le radical super oxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) sont les radicaux les plus réactifs [41, 40].

#### **1.4.1.2 Les antioxydants**

Les antioxydants sont des molécules qui peuvent réduire les radicaux libres par leur transformation en molécules stables et non réactives.

Elles sont bénéfiques à la santé en neutralisant les dommages cellulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres).

Les antioxydants sont des groupes divers de produits chimiques qui peuvent être endogènes naturels ou synthétiques. Parmi les sources antioxydantes on peut citer :

- Les antioxydants propres à l'organisme : enzymatiques ou non-enzymatiques.
- Les antioxydants de source végétale : polyphénols, flavonoïdes, tanins... [40, 42].

### 1.4.1.3 Détermination de l'activité antioxydante

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) (figure I.5) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier l'activité antioxydant des composés phénoliques.

La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm.

Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration représente la capacité à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir anti radicalaire [41] [42].

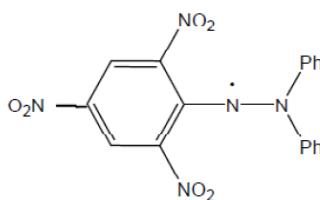


Figure 1.8 : Structure du radical stable DPPH°.

## 1.4.2 Activité antimicrobienne

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues principalement à la fraction d'HE contenue dans les plantes.

### 1.4.2.1 Propriétés antimicrobiennes

L'usage des HE, grâce à leur forte action antimicrobienne, constitue un sérieux substitut aux antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

Elles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs.

Néanmoins, la composition de l'HE d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée... Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également. [43].

#### 1.4.2.2 Mode d'action contre les bactéries

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la membrane plasmique par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de milieu intra-cellulaire , bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique conduisant à la mort de la bactérie.

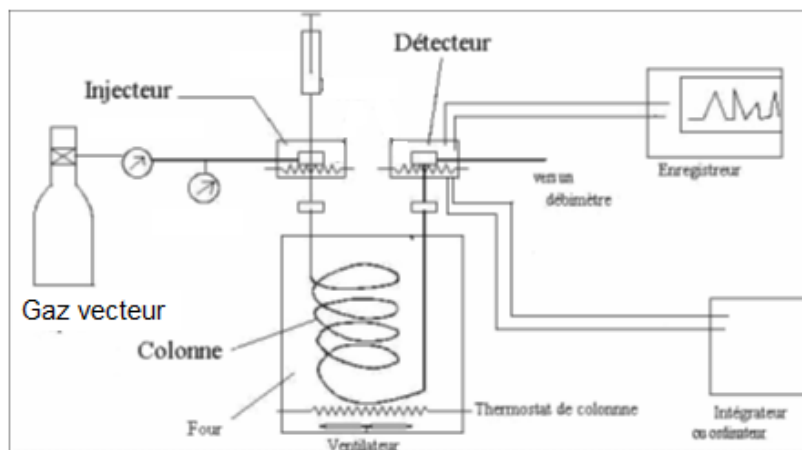
### 1.5 METHODES D'ANALYSES

#### 1.5.1 Chromatographie gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CG) est l'une des techniques la plus utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des constituants d'un mélange complexe [43].

##### ❖ Principe :

Le mélange à séparer (l'ordre de  $\mu\text{l}$ ) est injecté, à l'entrée d'une colonne grâce à l'injecteur qui est porté à une température supérieure à la température de la volatilisation des solutés à séparer. Les solutés sont transportés par le gaz vecteur le long de la colonne. Si la phase stationnaire est bien choisie, ces solutés vont être inégalement retenus, ce phénomène appelé rétention. Les constituants du mélange sortent l'un après l'autre du fait de leur différence de déplacement dans la colonne. A la sortie de la colonne, se trouve un détecteur qui émet un signal chaque fois qu'un soluté sort. Le signal produit est proportionnel à la quantité de chaque substance. Ce signal est amplifié et évalué à l'aide d'un ordinateur [44].



**Figure 1.9 :** Appareillage de la chromatographie en phase gazeuse.

### 1.5.2 Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse CG/SM

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer la structure moléculaire, la masse moléculaire et d'expliquer des mécanismes de rupture des liaisons. La spectrométrie de masse est souvent couplée à la chromatographie en phase gazeuse.

L'association de ces méthodes de séparation et d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces et d'obtenir des informations sur la structure des molécules [43].

#### ❖ Principe :

Cette technique consiste à ioniser par bombardement électronique, les molécules éluées de la colonne capillaire du chromatographe en phase gazeuse dans l'enceinte sous vide du spectromètre de masse. Les cations et ions radicaux formés sont ensuite séparés d'après leur rapport ( $m/z$ ) dans le champ électrique et / ou magnétique de l'analyseur, et connectés au multiplicateur d'électrons qui amplifie ce courant ionique.

L'identification est réalisée par comparaison  $m/z$  formés avec ceux des spectres de la banque de données, la fiabilité de la reconnaissance est principalement donnée par l'indice de qualité, en pourcentage d'adéquation du spectre du composé inconnue, par rapport au spectre de la banque de données [45].

### 1.5.3 Grandeurs de rétention

La chromatographie en phase gazeuse repose sur un certain nombre de grandeurs essentielles pour l'interprétation des chromatogrammes.

❖ **Temps de rétention (tr)**

C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du sommet du pic du soluté. Le temps de rétention est indépendant de la quantité injectée et de la nature du gaz vecteur. Il dépend de la température de la colonne et du couple soluté/phase stationnaire [45].

❖ **Indice de rétention**

Introduit par Kovats en chromatographie isotherme puis par Van den Dool et Kratz à température programmée par l'expression suivante :

$$I_p = 100z + \frac{\text{tr}(x) - \text{tr}(z)}{\text{tr}(z+1) - \text{tr}(z)} \times 100$$

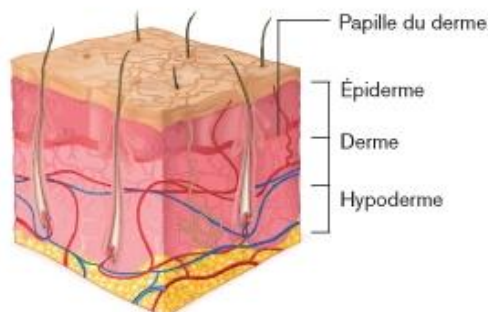
Avec :

- tr (x) : C'est le temps de rétention du soluté (x) étudié.
- tr (z) : C'est le temps de rétention de l'alcane à z atome de carbone qui précède (x).
- tr (z+1) : C'est le temps de rétention de l'alcane à z+1 atome de carbone qui suit (x).
- n : Différence du nombre d'atome de carbone entre les deux alcanes (généralement n =1).

## 1.6 GENERALITES SUR LA PEAU :

La peau est l'ensemble des cellules regroupées sous forme d'un tissu résistant et souple, constitué de plusieurs couches, et recouvrant l'ensemble du corps. [46]. Elle est formée de deux parties distinctes (**Figure 1.10**) :

- L'**épiderme**, dont le principal rôle, est la protection du corps.
- Le **derme**, possède des **vaisseaux** permettant aux **nutriments** de diffuser vers l'épiderme.



**Figure 1.10:** Structure biologique de la peau.

### 1.6.1 Cicatrisation

Lorsque la peau perd son intégrité, elle tente de se régénérer afin de continuer à protéger l'organisme. La recherche sur les plaies aiguës dans les modèles animaux démontre que les plaies guérissent en quatre phases, qu'on peut répartir en deux temps [47].

#### 1.6.1.1 Cicatrice primaire

La formation de la cicatrice primaire se fait en 3 phases :

❖ **Phase de détersion ou inflammatoire :**

Tout de suite après la constitution de la plaie, les vaisseaux sanguins locaux se dilatent provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire et une fuite de plasma. Cette vasodilatation est suivie peu après d'une vasoconstriction puis de la formation de caillots au fond de la plaie, ce qui limite la perte de sang. Plus tard, attirés par des substances chimiotactiques, des cellules pro-inflammatoires (leucocytes et macrophages) arrivent des tissus avoisinants pour nettoyer la plaie, éliminant tissus morts, germes et bactéries.

Cette phase débute entre la 12<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> heure et provoque une réaction inflammatoire caractérisée par une rougeur (érythème), un gonflement (œdème), une douleur et une augmentation de la température locale.

La phase de détersion, qui est nécessaire pour induire la phase suivante, dure entre 1 et 4 jours pour les plaies aiguës (blessure traumatique ou chirurgicale).

❖ **Phase de bourgeonnement ou de formation de tissu de granulation :**

Pendant cette phase, des cellules appelées fibroblastes (cellules du tissu conjonctif) apparaissent en grande quantité après stimulation par les macrophages.

Les fibroblastes produisent des grandes quantités de collagène, d'élastine et autres éléments de la matrice cellulaire du derme. En même temps, les cellules qui tapissent l'intérieur des vaisseaux (cellules endothéliales) forment des bourgeons aux extrémités des capillaires lésés.

Ces bourgeons dans le réseau de collagène en formation donnent à la plaie un aspect rouge et granuleux, d'où le nom de cette phase. Cette prolifération s'arrête lorsque le tissu de granulation a comblé la perte de substance et que les fibroblastes ont atteint les berges de la plaie. Ce processus commence autour du 4<sup>ème</sup> jour et se termine vers le 15<sup>ème</sup> jour.

❖ **Phase d'épithémisation :**

Une fois que le tissu conjonctif atteint son niveau maximum, les fibres de collagène se remodelent. Parallèlement, des cellules épithéliales apparaissent et migrent au bord de la plaie.

La plaie ainsi se contracte et se recouvre de cellules épithéliales, ce qui correspond à la fermeture de la plaie par une cicatrice primaire dont le teint est proche de celui de la peau qui l'entoure. La formation de cette cicatrice primaire s'achève autour du 21<sup>ème</sup> jour, sauf dans les cas des plaies superficielles suturées de petite taille, où l'épithélialisation est visible après 24 heures.

### **1.6.1.2 Maturation de la cicatrice primaire**

Une fois la cicatrice primaire formée, autour du 25<sup>ème</sup> ou 30<sup>ème</sup> jour, le collagène commence à se dégrader de façon importante et marque le début du remodelage de la cicatrice primaire. Au cours de cette phase, les berges de la plaie continuent à se contracter lentement grâce à l'action de cellules appelées myofibroblastes et au renforcement de l'union entre l'épiderme et le derme. Le résultat est que peu à peu, la cicatrice devient plus souple, plus lisse et plus douce au toucher. Ce remodelage aboutit à la formation de la cicatrice définitive au bout de 6 mois à un an ou plus.

La qualité de la cicatrice définitive dépend de sa taille, de sa situation et tout particulièrement de l'évolution initiale de la cicatrisation, d'où l'importance des soins et du suivi lors de la formation de la cicatrice primaire [48].

## **Matériel et méthode**

Les composés organiques sont généralement présents à de faible concentration dans la biomasse de l'aliment. Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice.

Plusieurs méthodes d'extraction des composés naturels ont été mises au point telles que l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur, le Soxhlet et la macération. Cependant, ces composés naturels sont connus comme étant thermosensibles et vulnérables aux réactions chimiques. La perte de certains constituants, la dégradation de certains composés insaturés par effet thermique ou par hydrolyse, ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus ou moins toxiques peuvent être engendrés par ces techniques d'extractions.

## 2.1 MATERIEL

L'ensemble des matériels, équipements ainsi que des produits utilisés sont mentionnés dans l'**annexe 1**.

## 2.2 MATIERE VEGETALE

Les prélèvements ont été effectués au mois d'Avril-Mai (**Figure 2.1**) dans la commune de Boudjima (Agouni-Oufekous) de la région de Makouda de la wilaya de Tizi-Ouzou (21 km au nord-est de Tizi Ouzou), (**Figure 2.2**). Le climat est chaud en été et froid en hiver avec une température annuelle moyenne de 16.6 °C. Sur l'année, la précipitation moyenne est de 1034 mm [49].



**Figure 2.1:** Carthamus caeruleus récolté à la station d'Agouni-Oufekous.

La zone géographique est détaillée dans le **Tableau 2.1**.

Tableau 2.1 : Situation géographique et bioclimatique des de la station.

Stations	Longitude	Latitude	Altitude	Etage bioclimatique
Agouni-Oufekous	4°08'10"E	36°48'26" N	288 m	Étage collinéen

Figure 2.2 : Zone géographique de la récolte de *Carthamus Caeruleus*.

Une identification botanique a été effectuée au laboratoire de Biologie végétale de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

### 2.3 DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU

Dans le but de déterminer le taux d'humidité ou la teneur en eau, nous avons procédé à l'étude cinétique de la masse humide ( $m_h$ ) en fonction du temps des racines de la *Carthamus Caeruleus* d'un même lot, en les pesant chaque 10 min jusqu'à atteindre une masse stable.

Le séchage a été réalisé sur 10,71g par la méthode de dessiccation. Les racines sont coupées transversalement en deux puis mis dans l'étuve sous une température de  $105 \pm 1^\circ\text{C}$ .

L'évolution de la perte de masse ou teneur en eau à un instant  $t$  est obtenue par l'équation 2.1 [50]:

$$W(\%) = \left( \frac{m_h - m_s}{m_h} \right) \times 100 \dots (2.1)$$

- $W \%$  : La teneur en eau du matériel végétal ou taux d'humidité (%)
- $m_h$  : Poids du matériel végétal humide en fonction de temps (g)
- $m_s$  : Poids du matériel végétal sec (g)

### 2.4 ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE

Cette étude a été réalisée par une analyse de la fraction volatile de l'HE, un screening phytochimique, le dosage et l'analyse de la fraction non volatile de la plante.

## 2.4.1 Huiles essentielles

### 2.4.1.1 Préparation de la matière végétale

Dans le souci de respecter au mieux les recommandations des normes et des utilisateurs la matière végétale fraîchement cueillis (trois jours au plus tard avant l'extraction) est lavée, pesée et coupée en mini morceau de 1cm de long avant d'être soumis à l'extraction. Les huiles essentielles sont alors extraites par hydrodistillation sur les deux parties de la plante (racine et feuille) [51].

### 2.4.1.2 Extraction de l'huile essentielle

Le matériel végétal (250g) est placé dans un ballon rempli d'eau (2/3 du volume du ballon), celui-ci relié à un appareil de Clevenger et soumis à l'ébullition, les vapeurs formées montent le long de la colonne en entraînant avec elles les huiles essentielles. Ces vapeurs sont condensées dans un réfrigérant, le condensât (eau + huile essentielle) est récupéré dans une ampoule à décanter. L'HE obtenue par une simple décantation est séparée minutieusement de la partie aqueuse (**Figure 2.3**), récupéré et séché avec du sulfate de sodium anhydre, puis conservé à basse température et à l'abri de la lumière.



**Figure 2.3 :** Hydrodistillation de l'EH par un appareil de type : Clevenger.

### 2.4.1.3 Détermination des rendements des extractions

L'évaluation de chaque extraction a été réalisée par le calcul du rendement qui est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse sèche de la matière végétale utilisée donné selon la relation (2.2), [52] :

$$R_{eh} = \left( \frac{M_{he}}{M_s} \right) \times 100 \dots (2.2)$$

- $R_{eh}$  : Rendement de l'huile essentielle (%)
- $M_{he}$  : Poids de l'huile essentielle extraite (g).
- $M_s$  : Poids de la matière végétale utilisée pour l'extraction (g).

#### 2.4.1.4 Composition chimique de l'huile essentielle

##### ❖ Chromatographie en phase gazeuse coupée à la spectrométrie de masse

L'analyse qualitative et semi-quantitative des HE par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse a été menée sur une colonne capillaire en silice fondue apolaire HP5 MS de 30m équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les conditions optimales d'analyse sont données dans le **Tableau 2.2** ci-dessous :

**Tableau 2.2** : Conditions opératoires de GC/SM.

Couplage GC/SM	
<b>Chromatographie gazeuse</b>	<b>Spectrométrie de masse</b>
Appareil : Hewlett- Packard 6890	Appareil : Agilent MSD 5973
Colonne : HP5 MS (30 m x 0.32 mm x 0.25 $\mu$ m)	Mode d'ionisation : impact électronique
Gaz vecteur : Hélium	Tension d'ionisation : 70 eV, basse résolution
Débit : 0.5 ml /mn	Balayage automatique : m/z 25 à 350
Température de l'injecteur : 250°C	Température de la source : 280°C
Température du détecteur : 250°C	Interface : Couplage direct
Quantité injectée : 0.2 $\mu$ L	Pression : 2.10-6 Torr
Température de colonne : 60°C/8 min jusqu'à 250°C/15 min à raison de 3°C/min.	

Le pourcentage de chaque constituant dans l'essence est calculé par intégration des aires du chromatogramme. Une série d'alcane linéaires (C<sub>5</sub>-C<sub>30</sub>) est injecté dans les mêmes conditions pour calculer les indices de rétention selon Van Den Dool des constituants des huiles essentielles.

#### 2.4.1.5 Identification des composés

L'identification des composés séparés sur la colonne apolaire ont été déterminés par comparaison des spectres de chaque constituant à ceux donnés par les bibliothèques Wiley 07, NIST02 et 11.

Les résultats ont également été confirmés par la comparaison de leurs indices de rétention, par rapport à C<sub>7</sub>-C<sub>28</sub> n-alcanes injectés en GC/SM sur une colonne capillaire dans les mêmes conditions que les huiles. Certains constituants ont été confirmés par l'analyse des étalons dans les mêmes conditions décrites ci-dessus. Le pourcentage de la composition de chaque constituant dans les huiles a été estimé par la méthode de normalisation des aires des pics [53].

## 2.4.2 Polyphénols

### 2.4.2.1 Matière végétale

Le matériel végétal a été nettoyé et séché à l'air libre pendant trois jours puis à l'étuve à T = 40 °C. La plante est ensuite réduite en poudre fine avec un broyeur électrique, puis stockée dans des boîtes hermétiques à l'abri de la lumière.

### 2.4.2.2 Screening phytochimique

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence des groupes de familles chimiques présent dans une plante. Le principe est basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant un ensemble de méthodes colorimétriques, ce qui permet de détecter les métabolites secondaires. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitations, un changement de couleur ou un examen sous la lumière ultraviolette [54].

### 2.4.2.3 Préparation des échantillons

Les trois extraits de plante sont préparés à partir des deux parties (racines et feuilles) de *Carthamus Caeruleus* L.

- **Infusion des feuilles et des racines :** 2g de broyat de feuilles fraîches ou de racines, préalablement séchés sont introduit, dans un ballon contenant 20 mL d'eau distillé porté à ébullition sous un montage à reflux. Le mélange est infusé 20 minutes avant filtration. Le filtrat est ensuite récupéré et conservé à l'abri de la lumière.
- **Macération des racines :** 1g de poudre sèche des racines sont macérés dans 20 mL de méthanol durant 24h. Après filtration le filtrat est récupéré et conservé à l'abri de la lumière.

### 2.4.2.4 Caractérisation et mise en évidence

Les principales familles de métabolites secondaires identifiées sont résumées dans le **Tableau 2.3** [55]:

Tableau 2.3 : protocoles d'identification photochimique.

Identifications	Protocole
<b>Les polyphénols</b>	Mettre 2 ml d'extrait dans un tube à essai puis ajouter une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée.
<b>Flavonoïdes</b>	<p><u>Test 1</u>: À 1 ml d'extraits, on ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCl), puis quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes est indiquée par une coloration rouge, orange ou rose.</p> <p><u>Test 2</u> : la réaction à la cyanidine permet de révéler la présence de flavonoïdes libres. A 1ml de l'extrait ou infusé on ajoute 1 ml d'alcool chlorhydrique (HCl cc à 50% dans éthanol 95%). En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur. L'addition de 200 µL d'alcool iso-amylque intensifie la coloration rose orangé puis une coloration rose orangé (Flavones) ou rose violacée (Flavanones) qui confirme la présence de flavonoïdes.</p>
<b>Tannins</b>	La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de chaque extrait, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl <sub>3</sub> diluée à 1% L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence des tanins catéchiques. L'apparition d'une coloration bleu-verte indique la présence des tanins galliques.
<b>Glycosides cardiaques</b>	2ml de chloroforme est ajouté à 1 ml de l'extrait, l'apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> indique la présence des glycosides cardiaques.
<b>Anthocyanes</b>	A 1mL de l'échantillon on ajoute 1mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 10% et 1 ml de NH <sub>4</sub> OH. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si la coloration s'accroît en présence de l'acide et si elle vire au bleu violacé en milieu basique cela signifie la présence des anthocyanes.
<b>Terpénoïdes</b>	Leur détection consiste à traiter 0.5 ml de l'extrait avec 2 ml de chloroforme et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. En cas de réaction positive, il se forme un anneau rouge-brunâtre à la zone de contact des deux liquides.
<b>Saponines</b>	Mettre 3ml d'extrait dans un tube à essai, puis agiter fortement pendant 30 secondes et laisser reposer 15 secondes. Si la mousse persiste pendant cette période cela signifie qu'il y a des saponosides.
<b>Quinones libres</b>	1 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté à 1 ml d'extrait. Un test positif est révélé par la formation de la couleur rouge.

<b>Dérivés anthracéniques libres</b>	Les Anthracéniques libres ont été détectées par l'ajout dans un tube à essai d'un 1ml d'extrait chloroformique et 1 ml de NH <sub>4</sub> OH dilué. Après agitation, une coloration Plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres. Extrait chloroformique : 500mg de poudre + 5ml de CHCl <sub>3</sub> chauffé 3min au bain marie. Solution est à chaud.
<b>Alcaloïdes</b>	Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec le réactif de Mayer. Introduire 10 g de poudre végétale sèche dans un erlenmeyer, à laquelle 50ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> dilué au 1/10, macéré 24h ensuite, filtré et lavé pour compléter à 50ml, dans 1ml du filtrat, 5 gouttes de réactif sont ajoutées après 15 min. L'apparition d'un précipité blanc-jaune ou jaune claire, révèle la présence d'alcaloïdes
<b>Leuco-anthocyanes</b>	A 1mL de l'échantillon on ajoute 1mL d'alcool chlorhydrique et 200 µL d'alcool iso-amylque puis chauffé 15 min la coloration rouge cerise confirment la présence des leuco anthocyanes (flavonols, flavononols).
<b>Stérols et tri terpènes</b>	Les stérols et les terpènes ont été recherchés par la réaction de Liebermann. Cinq (5) ml d'extraits évaporés sur bain de sable. Le résidu est dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique ; ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.
<b>Coumarines</b>	Dans une capsule, 5 ml d'extrait entérique est évaporé, puis 2 ml d'eau chaude est ajouté au résidu. La solution est partagée entre 2 tubes à essais. Au contenu de l'un des tubes, 0,5 ml est ajouté de NH <sub>4</sub> OH à 25%. La fluorescence est observée sous U.V à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.
<b>Anthraquinones</b>	Prélever de l'hydrolysât (5ml) et agiter avec du chloroforme (5ml) dans une ampoule à décanter sans formation d'émulsion. Soutirer la phase organique, l'introduire dans un tube à essai puis conserver la phase aqueuse. Ajouter de l'ammoniaque diluée (1ml) et agiter. La présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge. Si la réaction est négative ou faiblement positive, rechercher : es O- et C-hétérosides.
<b>O-hétérosides à génine réduite</b>	Prélever 5 ml d'hydrolysât, ajouter 3 à 4 gouttes de FeCl <sub>3</sub> à 10%, puis chauffer pendant 5 minutes au bain-marie et refroidir sous le courant d'eau et agiter avec du chloroforme (5ml), il faut après soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai. Ensuite on ajoute de l'ammoniaque diluée (1ml) et on agite. En présence de produits d'oxydation des anthronols ou des anthrones, la coloration rouge est plus intense que précédemment.

<b>-C-Hétérosides</b>	Reprendre la phase aqueuse qui a été gardée dans l'ampoule à décanter dans un tube à essai puis ajouter sur cette phase de l'eau distillée (10ml), du chlorure ferrique à 10% (1ml) et porter au bain-marie pendant 30 minutes. Ensuite il faut refroidir sous courant d'eau et agiter avec du chloroforme (5ml). Soutirer la phase chloroformique puis ajouter de l'ammoniaque diluée (1ml) et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génine de C-hétérosides.
-----------------------	--

### 2.4.3 Extraction des polyphénols

L'extraction solide-liquide des polyphénols est la plus simple des méthodes de séparation. Elle est basée sur leur degré de solubilité dans les solvants organiques.

#### ❖ Mode opératoire d'extraction :

L'extraction a été réalisée par macération sur un matériel végétal séché et broyé. Cette opération consiste à épuiser le matériel végétal au contact d'un solvant.

Dans le présent travail, nous avons réalisés deux extractions distinctes ; dans la première nous avons ciblé le solvant qui donne le meilleur rendement d'extraction. Pour la deuxième nous avons procédé à une extraction avec une plus grande quantité de la plante qui sera utilisé pour la partie formulation.

#### ❖ 1<sup>er</sup> protocole d'extraction :

20g de matériel végétal ont été extraits à raison de 1/10 (P/V) par différents solvants : le méthanol à 96%, l'éthanol à 96% et l'hydro-éthanolique à 70% (v/v) de telle façon que le solvant couvre totalement le matériel végétal pendant 72 heures avec filtration et renouvellement de solvant chaque 24 heures à la température du laboratoire. Après filtration, le filtrat est évaporé à sec sous pression réduit à 40°C à l'aide d'un rota-vapeur (**Figure 2.4**).



**Figure 2.4:** Concentration de filtrat au rota-vapeur.

**❖ Deuxième extraction :**

737 g de matériel végétal ont été extraite par 3 x 1500 mL du solvant ; hydro-éthanolique à 70% (v/v) selon le 1<sup>er</sup> protocole.

Les extraits récupérés par les deux protocoles sont pesés et conservés dans des flacons ombrés hermétique à basse température et à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation.

**2.4.3.1 Rendement des extractions**

L'évaluation du rendement de chaque extrait a été déterminée selon l'équation suivante

2.3 :

$$R(\%) = \frac{M_e}{M_s} \times 100 \dots (2.3)$$

- R (%) : Rendement de l'extrait (%).
- Me : Masse de l'extrait brut (g).
- Ms : Masse du matériel végétal sec.

**2.4.4 Analyse quantitative des extraits****2.4.4.1 Dosage des polyphénols totaux****❖ Principe :**

La teneur en polyphénols est déterminée par spectrophotométrie UV-Visible en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Le mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et molybdène (MO<sub>8</sub>O<sub>23</sub>). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [56].

**❖ Protocole**

100 mg de l'échantillon sec pulvérisé ont été pesés et extraits avec 10 ml d'une solution d'un mélange méthanol-eau (80 : 20 V/V) de méthanol et d'éthanol avec macération pendant 24h. L'aliquote (2 ml) d'extrait est centrifugé à 3000 rpm pendant 25 min si possible.

A un volume de 0.2 ml d'extrait (dilué 10 fois) est ajouté à 1 ml de la solution de Follin-Ciocalteu (dilué dix fois dans l'eau distillée). Après agitation, 0.8 ml de la solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5%) est ajouté à l'ensemble. Après 2 h d'incubation à la température ambiante, l'absorbance a été lu à 765 nm contre un blanc (même solution sans la solution d'échantillon) [57].

❖ **Expression des résultats :**

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire, établie avec des concentrations précises de l'acide gallique comme standard de référence (0-200 µg/ml) dans les mêmes conditions que les extraits. Les résultats ont été exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µgEAG/mg).

#### 2.4.4.2 Dosage des flavonoïdes

❖ **Principe :**

La formation d'un complexe jaunâtre, lors de l'ajout du chlorure d'aluminium, est due à la fixation des ions  $Al^{3+}$  sur les atomes d'oxygène, présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. La quantité des flavonoïdes dans un extrait devrait être déterminée selon le flavonoïde prédominant, cependant la quercétine est largement utilisée comme standard pour la détermination de la teneur des flavonoïdes dans un échantillon.

❖ **Protocole :**

La teneur des flavonoïdes totaux dans les différents extraits est mesurée par la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium.

1 ml de l'échantillon (dilué 10 fois) est ajouté à 1 ml de la solution d' $AlCl_3$  (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm contre un blanc (même solution sans la solution d'échantillon) [58].

❖ **Expression des résultats :**

Une courbe d'étalonnage est établie avec la quercétine (0-40 µg/ml), comme standard de référence, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µgEQ/mg).

## 2.5 ACTIVITE BIOLOGIQUE

### 2.5.1 Evaluation de l'activité anti-oxydante

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés antiradicalaires, il est réduit en virant au jaune [59].

### 2.5.1.1 Protocole expérimental

#### ➤ Solution DPPH

La solution méthanoïque du radical DPPH a été préparée en dissolvant 2,9 mg de DPPH dans 100 ml de MeOH, puis dilué avec du MeOH jusqu'à ajuster la valeur de l'absorbance à  $0,800 \pm 0,030$  ( $\lambda=515$  nm). La concentration exacte de la solution est calculée par interpolation de la valeur de l'absorbance dans la courbe d'étalonnage du radical DPPH ( $y = 0.1121x + 0.0055$ ,  $R^2 = 0,999$ ) [25] [60].

#### ➤ Le blanc

Le blanc a été préparé à partir de 2,4 ml de la solution méthanoïque du radical DPPH et 1,2 ml de MeOH. Une solution méthanoïque (2,4 ml) du radical DPPH ( $7,09 \times 10^{-5}$  M) est mélangée directement dans une cuve UV en quartz avec une solution méthanoïque (1,2 ml). La mesure de l'absorbance à 517nm est prise après 15min d'incubation à l'obscurité.

#### ➤ L'échantillon

Une solution méthanoïque (2,4 ml) du radical DPPH ( $7,09 \times 10^{-5}$  M) est mélangée directement dans une cuve UV en quartz avec l'extrait alcoolique (1,2 ml) de l'échantillon à évaluer, préparée en trois essais, agitée et maintenue à température ambiante et dans l'obscurité avant de prendre la mesure de l'absorbance dans un spectrophotomètre à 515nm. Les mesures sont prises après 15 minutes. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune.

### 2.5.1.2 Détermination de L'inhibition du radical DPPH

La moyenne sur trois essais des pourcentages de l'inhibition du radical libre de DPPH a été calculé à partir de l'équation 2.4 [61]:

$$\text{IR}(\%) = \left( \frac{A_t - A_c}{A_t} \right) \times 100 \dots (2.4)$$

- IR: Pourcentage inhibition (%)
- $A_t$ : Absorbance de témoin (t=0 min)
- $A_c$ : Absorbance de l'échantillon (t=15 min).

#### ❖ Calcul des concentrations " IC<sub>50</sub> ":

IC<sub>50</sub> aussi appelée EC<sub>50</sub> (concentration efficace 50), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits utilisés.

### 2.5.2 Etude de l'activité antibactérienne

Il existe diverses méthodes pour l'évaluation de l'activité antimicrobiennes ; méthode de diffusion au milieu solide, méthode de diffusion au milieu liquide, néanmoins dans notre travail on va s'intéressés à la méthode de diffusion en milieu gélosé.

La méthode de diffusion sur discs, également appelé méthode de diffusion sur milieu d'agar, consiste à mesurer in vitro l'effet antibactérien des extraits et des huiles essentielles. Cette méthode est équivalente à un antibiogramme, dans ce cas l'antibiotique est remplacé par les huiles essentielles ou les extraits.

#### 2.5.2.1 Matériel microbiologique

Les informations concernant les souches bactériennes testés dans notre présent travail sont détaillées dans le **Tableau 2.4**.

**Tableau 2.4** : Souches bactériennes étudiées.

<i>Souches</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Souche de référence</i>	<i>Fournisseur</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci à <b>Gram+</b> ubiquitaire, commensal de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste. Responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients	ATCC 29213	CHU de Tizi Ouzou (laboratoire de microbiologie)
<i>Escherichia coli</i>	Bacille aérobie et <b>Gram-</b> que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud.	ATCC 25922	

#### 2.5.2.2 Procédure expérimentale

Le test de sensibilité des bactéries aux différentes fractions des extraits est réalisé in vitro par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les différentes souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. A partir de ces cultures jeunes, des colonies pures sont isolées pour préparer l'inoculum bactérien. Chaque colonie est mise en suspension dans 2.5 ml d'eau distillée stérile.

L'ensemencement de l'inoculum est réalisé par écouvillonnage en effectuant des stries serrées sur la gélose. Cette opération est répétée 3 fois en tournant la boîte de 60°.

Des disques stériles de papier Watman de 6 mm de diamètre, sont imprégnés de 10 µL. Tous les disques sont déposés délicatement sur le milieu gélosé ensemencé préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées. Après incubation à 37° C pendant 18 à 20 heures, les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques sont mesurés en mm [62]. Un extrait est considéré comme actif s'il produit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm. Une zone d'inhibition supérieure à 14 mm correspond à une activité antibactérienne très significative [2].

## 2.6 FORMULATION GALENIQUE

Dans notre étude deux formulations distincts sont préparées à base des racines de *Carthamus caeruleus* L ; une formulation traditionnelle et une formulation pharmaceutique.

### 2.6.1 Formulation de la crème traditionnelle

Les racines de *Carthamus caeruleus* sont lavées, nettoyées et épluchés. Les racines sont ensuite introduites dans un récipient rempli d'eau de tel sorte qu'elles soient émergées. L'ensemble est porté en décoction pendant 2 à 3 heures. Après décoction, les racines sont séparées du surnageant (**Figure 2.5**) sur du tissu mousseline écrasées et mélangées avec le surnageant.

La préparation est ensuite décantée dans une boîte hermétique à une température de 5° C pendant une journée.



**Figure 2.5** : Décocté des racines de *Carthamus caeruleus*.

### 2.6.2 Formulation de la pommade pharmaceutique

Deux formulations sont préparées ; une pommade à base d'extrait hydro-éthanolique à 10 % et une pommade à base d'huile essentielle à 0.2 % des racines de la plante.

Fondre une petite quantité de vaseline blanche dans un mortier en verre, sous bain-marie, puis ajouter la quantité de l'huile essentielle ou d'extrait hydro-éthanolique et mélanger le tout jusqu'à homogénéisation.

Retiré le mélange de bain-marie et ajouter le reste de la vaseline à petite quantité et trituré manuellement jusqu'à parfaite homogénéisation de la pommade et refroidissement de la texture (**Figure 2.6**). La proportion de chaque ingrédient est citée dans le **Tableau 2.5**.

**Tableau 2.5** : Ingrédients des pommades formulées

Composants	Quantité (g)		Fonction
	A base d'hydro-EtOH	A base d'huile essentielle	
Vaseline blanche	90 (qsp)	99.8 (qsp)	base
Extrait	10	0.2	Principe actif



**Figure 2.6** : Préparation de la pommade pharmaceutique.

### 2.6.3 Contrôle qualité

Afin de s'assurer de la bonne qualité des pommades formulées, les tests suivants sont effectués :

❖ **Examen macroscopique :**

Cet examen consiste à définir les caractères organoleptiques de la formulation (odeur, couleur, aspect) ainsi que la réalisation d'un test d'étalement (absence d'agrégats visibles à l'œil nu, et une bonne diffusion à travers la peau).

❖ **Mesure du pH**

Le pH de la pommade est déterminé par un pH mètre. La pommade est dissoute dans de l'eau distillé chaude a une proportion de 1/10 pommade/eau.

❖ **Examen microscopique**

La vérification de l'homogénéité de la pommade a été vérifiée en utilisant un microscope photonique avec un zoom de 40-10. Le critère de qualité étant de vérifier la bonne dispersion du principe actif dans la phase (excipient).

**2.7 ETUDE PRE-CLINIQUE :**

Cette étude a été réalisée au laboratoire de pharmacotoxicologie du Centre de Recherche et Développement du groupe Sidal (CRD) d'Alger sous la direction du Dr BELMADHI Asma. Le protocole suivi est interne au CRD Sidal.

**2.7.1 Etude de l'activité cicatrisante : induction d'une brûlure**❖ **Constitution des lots d'animaux :**

L'étude a été faite sur des rats Wistar albinos mâle provenant de l'Animalerie de l'institut Pasteur à Alger. Le poids moyen des rats utilisés est de  $263 \pm 33$ g. Les rats ont été constitués en lot de 5 comme suit (**Tableau 2.6**) :

**Tableau 2.6 :** Constitution des lots d'animaux.

<b>Lots</b>	<b>Lot témoins</b>	<b>Lot référence</b>	<b>Lot essai 1</b>	<b>Lot essai 2</b>	<b>Lot essai 3</b>
<b>Quantité</b>	5 rats	5 rats	5 rats	5 rats	5 rats
<b>Produit utilisé</b>	Aucun traitement	(Biafine®)	Pommade à base de l'HE	Pommade à base d'extrait hydro-éthanolique	Crème traditionnelle

Chaque rat des différents lots, a été identifié, étiqueté et pesé. Ils ont été, ensuite, mis à jeun pendant 16 h avant l'injection d'anesthésie chirurgicale (anesthésie générale).

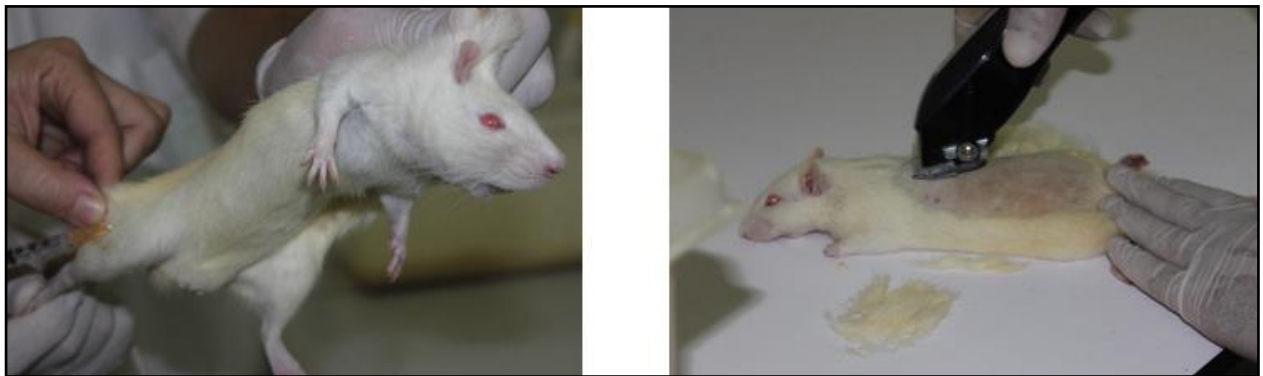
**2.7.1.1 Expérimentation**• **1<sup>ère</sup> étapes :**

Les rats des différents lots constitués la veille, sont anesthésiés par une injection intramusculaire (IM). Le produit utilisé est : la **kétamine® HCL** à raison de 100mg/kilogramme (**Figure 2.7**).



**Figure 2.7 :** Kétamine HCl.

Après l'anesthésie générale, on procède à l'épilation de la zone dorsal à l'aide d'une tondeuse (**Figure 2.8**), en plaçant l'animal dans une position en décubitus suivit d'une désinfection de la zone épilée par un produit antiseptique (la **Bétadine®**).



**Figure 2.8 :** Injection d'anesthésie par IM et épilation dorsal des rats.

- **2<sup>ème</sup> étapes : Induction de la brûlure**

Faire chauffer une masselotte de diamètre de 19.65 mm à l'aide d'une résistance électrique à une température de  $100 \pm 5^\circ \text{C}$ , ensuite, sur la zone épilée, placer la masselotte au centre de la région dorsal de l'animal, pendant une durée de 20 secondes.

- **3<sup>ème</sup> étapes : Application des différentes pommades**

L'application des pommades sur la zone de la brûlure induite, est effectué chaque jour, pendant 21 jours (**Tableau 2.9**).



**Figure 2.9** : Induction de la brûlure par la masselotte.

### **2.7.1.2 Evaluation macroscopique clinique de la brûlure.**

L'évaluation macroscopique clinique de la brûlure sur chaque rat des différents lots, est évalué sur une fréquence de deux jours, afin de déterminer l'évolution clinique de la plaie. La classification sémiologique de la brûlure des plaies est détaillée dans l'**annexe 2**.

### **2.7.1.3 Evaluation de la douleur selon la cotation**

L'évaluation de la douleur par illustration de mesure d'échelle de la douleur, est détaillé dans l'**annexe 2**.

La technique consiste à mettre une légère pression par l'index sur la zone brûlée de l'animal puis interpréter les différents signes : cris, agitations... etc.

### **2.7.1.4 Evaluation pondérale**

Peser chaque rat des différents lots chaque J puis faire un tableau d'observation clinique, et noter l'agitation ainsi que les selles notamment la diarrhée afin de suivre l'évolution de la santé de l'animal.

### **2.7.2 Evaluation du processus cicatriciel**

L'évaluation de l'évolution de processus cicatriciel se fait par étude planimétrique digital qui consiste en une prise de photographies des plaies en chaque 2 jours.

Pour quantifier le résultat de la cicatrisation, on fait l'évolution des surfaces des plaies à l'aide d'un logiciel de traitement d'image (Mesurim®).

Le calcul du pourcentage de rétraction des surfaces des plaies se fait selon la formule 2.5 :

$$\text{PRP}(\%) = \left( \frac{s_0 - s_j}{s_0} \right) \times 100 \dots (2.5)$$

- PRP (%) : pourcentage de la rétraction de la plaie (%)
- $S_0$  : surface de la plaie au jours 0 (mm<sup>2</sup>)
- $S_j$  : surface de la plaie au jour (j) (mm<sup>2</sup>)

### 2.7.3 Traitement statistique

Le test d'analyse statistique utilisé était le *one-way analysis of variance* (ANOVA). Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes  $\pm$  écart-type et la différence entre deux groupes est statistiquement significative si  $P < 0,05$ .

## 2.8 ETUDE HISTOPATHOLOGIQUE

### 2.8.1 Expérimentation

L'examen histopathologique est effectué au laboratoire anatomo-pathologie à l'école national supérieur vétérinaire d'Alger.

- **La biopsie cutanée :**

L'euthanasie des rats a lieu le 22<sup>ème</sup> jour de l'expérimentation. Des lambeaux cutanés sont prélevés par excision à l'aide d'un Ciseaux chirurgical (**Figure 2.10**), en prenant soin d'entourer la totalité des plaies. Après le prélèvement, les échantillons sont fixés dans du formaldéhyde à 10% puis conservés dans des tubes ECBU. Tous les tubes sont identifiés et étiquetés (animal, lot, jour de prélèvement) (**Figure 2.11**).



**Figure 2.10** : Réalisation de la biopsie cutanée.



**Figure 2.11** : Tubes ECBU.



**Figure 3.12** : Déshydratation des échantillons dans des bains d'alcools.

- **Déshydratation :**

Les échantillons sont déshydratés par émergence successive dans différents bains d'éthanol à degrés croissant (70°- 90°-95°-100°), d'une durée de 60 min, puis éclaircies dans deux bains de toluène (**Figure 2.12**).

- **Imprégnation et inclusion :**

Après la déshydratation des échantillons, ils sont imprégnés dans deux bains de paraffine à 58° C, puis une inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules en acier inoxydable.

- **La microtomie :**

Après refroidissement et démoulage des blocs de paraffine, on leur effectue des coupes de 4 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (grâce à un microtome). Ces coupes s'attachent les unes aux autres pour former un ruban. Quelques coupes du ruban sont étalées sur des lames à l'aide d'eau albuminée, puis séchées sur une plaque chauffante en platine pour augmenter l'adhérence des coupes sur les lames.

- **La coloration :**

Deux colorations sont faites ; une coloration à l'hématoxyline-éosine (topographique) et une coloration au trichrome de Masson (coloration spéciale). Après la coloration, des lamelles sont fixées sur les lames avec une résine adhésive puis l'ensemble est laissé sécher à la température de laboratoire pour une durée de 24h.

### 2.8.2 Interprétation des résultats

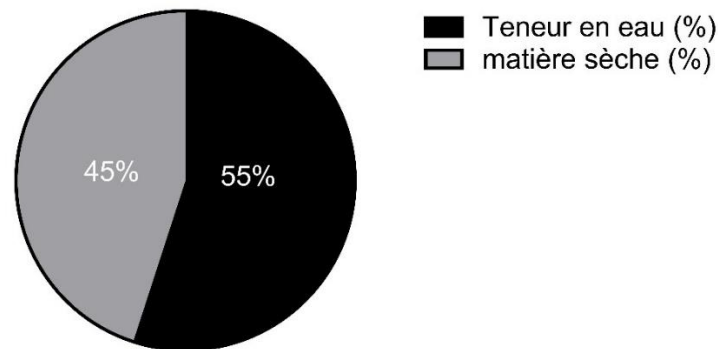
Le diagnostic histopathologique est fait au laboratoire d'Anatomo-pathologie de CHU de Tizi-Ouzou par le Dr.SAIDANI.

## **Chapitre 3**

# Résultat et discussion

### 3.1 DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU

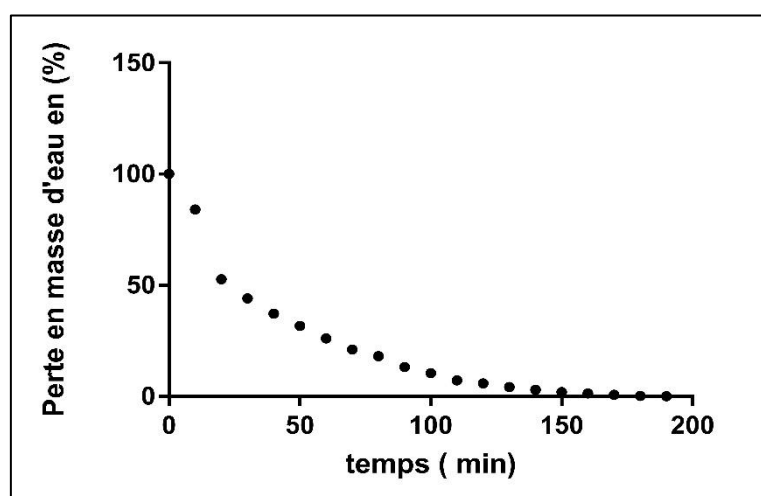
La méthode pondérale est utilisée pour déterminer la teneur en eau dans les rhizomes de *Carthamus caeruleus* fraîchement cueilli. Les racines renferment une teneur en eau relative de 55%.



**Figure 3. 1 :** Teneur en eau relative des racines de *Carthamus caeruleus* L.

Ce résultat permet de comparer la teneur en eau résiduelle lors de la dessiccation. Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % [63].

L'analyse de notre échantillon a révélé un taux d'humidité important de 55%. Cela signifie approximativement que la moitié du poids de la plante fraîche est constitué par de l'eau (**Figure 3.2**). Après que le séchage est achevé, le taux d'humidité passe de 100 à 0 %. La teneur en eau, inférieure à 10% confère à notre plante séché une meilleure conservation à long terme.



**Figure 3.2 :** Perte en masse d'eau dans les racines de la plante en fonction du temps.

## 3.2 ETUDE PHYTOCHIMIQUE

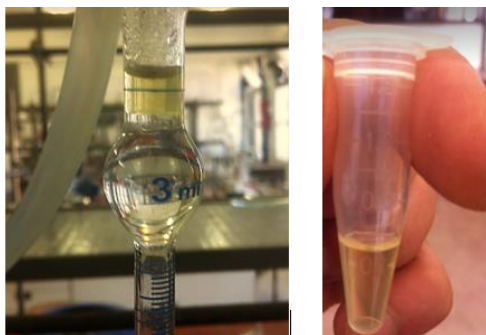
### 3.2.1 Huiles essentielles

#### 3.2.1.1 Caractères organoleptiques des huiles essentielles de *Carthamus caeruleus*

Les caractères organoleptiques de l'HE des racines de *Carthamus caeruleus L* obtenus par hydrodistillation sont regroupés dans le **Tableau 3.1**. La **Figure 3.3** représente un échantillon de l'extrait d'huile essentielle.

**Tableau 3.1** : Caractères organoleptique de l'HE des racines de *Carthamus caeruleus L*.

Caractéristique	<i>Carthamus caeruleus L</i> .
Aspect	Liquide limpide visqueux
Couleur	Jaune foncé
Odeur	Une odeur fraîche de cardon
Saveur	Fortement piquante

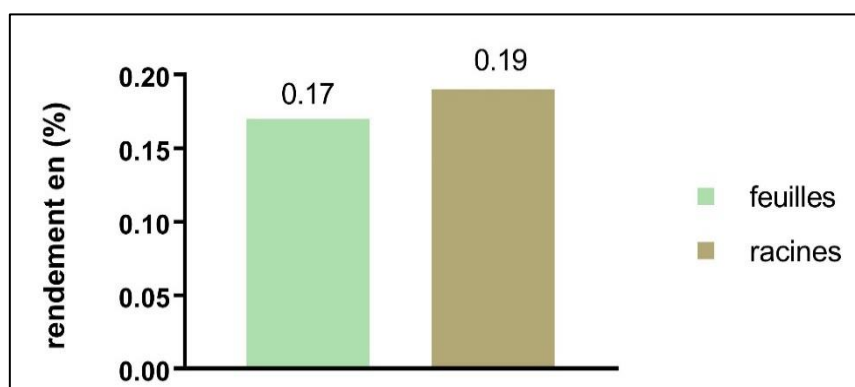


**Figure 3.3:** L'HE de *Carthamus caeruleus L*.

#### 3.2.1.2 Rendement de l'HE extraite

Les rendements des extraits de l'HE par hydrodistillation des deux parties de la plante (feuilles et racines) sont représentés dans le **Figure 3.4**.

Au vu de ces résultats, il apparaît que le rendement moyen en HE obtenu par hydrodistillation est important et presque identique pour les deux parties de la plante.



**Figure 3.4:** Rendements de l'HE des feuilles et racines.

Dans le **Tableau 3.2** nous avons regroupé certains résultats des travaux antérieurs réalisés sur la même plante ainsi que les facteurs endogènes et exogènes pouvant fluctuer le rendement d'extraction de l'HE.

**Tableau 3.2 :** Différents travaux réalisés sur l'HE de *Carthamus caeruleus* L.

Auteur	Récolte		Rendement (%)	
	Période	Lieu	Feuilles	Racines
Allouache (2017) [64]	Mai	El-Ekseur (Bejaia)	0,13	0,19
Bereksi (2016) [65]	Mars	Beni-Snous (Tlemcen)	-	0,21
Belkhiri (2009) [66]	-	BouAndas (Sétif)	-	0,0290

D'après les résultats cités dans la littérature, il est bien évident que la *Carthamus caeruleus* L. renferme peu d'HE [0.02-0,21%]. Les résultats obtenus dans ce travail sont compris dans l'intervalle cité. Cette différence pourrait être expliquée par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité de l'HE. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en HE.

Le rendement d'extraction en HE de la menthe poivrée est plus important en période de floraison. De même pour la sauge (*Salvia officinalis* L.), l'évolution de l'huile essentielle suivie sur 15 mois du cycle de la plante montre que le rendement maximal est obtenu en novembre [67].

S'il est difficile d'expliquer l'origine de ces variations au fil des saisons, elles montrent néanmoins, qu'il est possible de connaître les variations dans la composition chimique d'une huile essentielle à travers les saisons et donc de définir le meilleur moment pour la récolte.

### 3.2.1.3 Identification et analyse de l'huile essentielle par CPG/SM :

L'analyse qualitative et semi-quantitative des essences extraites par hydrodistillation a été effectuée par CPG/SM en impact électronique (IE) sur une phase stationnaire apolaire HP<sub>5</sub>MS (Poly méthyle siloxane, 30m x 0,25mm x 0,25µm). L'identification a été réalisée par comparaison avec les spectres de masse déjà référencés et à ceux de la banque de spectres (Nist et Wiley 07). L'injection des n-alcanes, sous les mêmes conditions opératoires nous a permis de calculer les indices de rétention de tous les pics.

Les composés identifiés, leurs indices de rétention ainsi que leurs teneurs relatives sont reportés dans le **Tableau 3.3** Pour la détermination semi quantitative des constituants, nous avons admis que le détecteur à ionisation de flamme réagissait de manière identique à tous les composés et que leurs coefficients de réponse étaient tous égaux à l'unité. Le chromatogramme obtenu est représenté en (**annexe 3**).

L'analyse par CPG-MS nous a permis d'identifier 32 constituants, représentant 95,23% de la composition totale de l'HE. D'une manière générale, l'huile essentielle contient des hydrocarbures mono et sesquiterpéniques en quantité moindre, alors que les dérivés oxygénés comptent parmi leurs constituants majoritaires. L'étude montre une prédominance du méthyl linoléate (77,69 %), suivi de pentadecene (3.06 %), trans-β-farnesene (2.92%), trans caryophyllène (2.01 %), caryophyllène oxyde (1.40 %), δ-cadinène (1.25 %) et le cadina-1,4-diène (1.00 %), les autres composés sont à l'état de traces.

Le linoléate de méthyle est un ester méthylique d'acide gras, désigné par le sigle (EMAG), dérivé de l'acide alpha-linolénique, Il joue un rôle de métabolite de plante et d'attractif pour les insectes [68]. On le trouve aussi en quantité dans l'huile de lin qui contient du méthyl linoléique et de l'acide linoléique [69].

Une étude à montrer son efficacité comme produit anti-mélanogénèse (produit dépigmentant pour la peau) et il pourrait être utilisé comme agent de blanchiment dans les cosmétiques et est un potentiel traitement des troubles d'hyperpigmentation en clinique [70]. Il inhibe également la prolifération des champignons (*saccaromyces cerevisiae*) quand il est irradié par l'UV [71].

En revanche, le linoléate de méthyle s'auto-oxyde rapidement avec l'air, qui donne des hydroperoxyde de méthyl linoléate, une molécule photosensible et thermosensible qui donne à son tour de l'octanoate de méthyl, utilisé généralement comme produit odorant.

En contrepartie, la molécule d'octanoate de méthyl est très irritante pour la peau, ceci doit nous mettre en garde contre l'utilisation directe de l'HE de la plante sur la peau, une fois qu'elle a été exposée à l'air et à la chaleur [72]. Ajoutant à cela la présence du pentadécène qui est un hydrocarbure de la famille d'acyle gras, un composé très irritant pour la peau et les yeux même à de faible quantité [73].

Il est à signaler que des individus de la même espèce botanique, ayant le même génome et le même phénotype (chemotype), peuvent présenter des différences significatives au niveau de leur composition chimique. Celle-ci est due à l'influence de nombreux facteurs autres que la détermination génétique, comme la qualité du sol, le climat, l'altitude, l'hygrométrie, etc [67] [74].

**Tableau 3.3** : Composés chimiques de l'HE de *Carthamus.C* obtenus par CPG/SM.

N°	Composés	IR	%	N°	Composés		%
1	$\alpha$ -pinène	933	0.05	17	alloaromadendrene	1466	0.11
2	camphène	947	0.01	18	$\gamma$ -gurjunène	1472	0.09
3	sabinène	971	0.02	19	$\gamma$ -murolène	1480	0.48
4	$\beta$ -pinène	973	0.02	20	D germacrène	1484	0.36
5	$\alpha$ -phellandrène	1001	0.31	21	pentadecene	1491	3.06
6	$\alpha$ - terpinene	1015	0.11	22	$\alpha$ -murolène	1503	0.38
7	p-cymene	1024	0.05	23	$\gamma$ -cadinène	1515	0.76
8	$\beta$ -phellandrene	1029	0.09	24	$\delta$ -cadinène	1527	1.25
9	$\gamma$ -terpinene	1058	0.04	25	cadina-1,4-diène	1533	1.00
10	Cyclosativene	1371	0.47	26	$\alpha$ -cadinène	1515	0.16
11	$\alpha$ -copaène	1375	0.69	27	$\beta$ -calacorène	1566	0.05
12	sativène	1394	0.04	28	Oxyde de caryophyllène	1583	1.40
13	Cyperène	1401	0.42	29	hexadecene	1591	0.14
14	$\alpha$ -Gurjunène	1410	0.39	30	8-epi- $\gamma$ -eudesmol	1626	0.21
15	trans caryophyllène	1417	2.01	31	méthyl linoléate	1658	77.69
16	trans- $\beta$ -farnesene	1458	2.92	32	heptadecene	1692	0.45

### 3.2.2 Screening phytochimiques :

Les tests de caractérisation phytochimique, des infusés des feuilles et des racines ainsi que l'extrait des racines, sont regroupés dans le **Tableau (3.4)**. 17 groupes chimiques ont été testés dans ce travail.

Les résultats montrent que les racines de *Carthamus caeruleus* L sont riches en polyphénols, glycoside cardiaque, terpenoïdes, flavonoïdes, flavonoïdes libres, quinones libres, coumarines, dérivés anthracéniques libres, stérols et triterpènes ainsi qu'en O-Hétérosides à génine réduite et en C-hétérosides pour l'infuser et l'extrait. Alors que les saponosides sont mis en évidence que dans l'infusé de racine et les coumarines dans l'extrait.

**Tableau 3.4** : Résultats de test phytochimique sur la plante *Carthamus caeruleus* L.

Tests phytochimiques	Infusé		Extrait méthanoïque
	Feuilles	Racines	
Glycosides cardiaques	+	+	+
Tanins	+	-	-
Anthocyanes	-	-	-
Polyphénols	+	+	+
Terpènoïdes	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+
Flavonoïdes libre	+	+	+
Leucoanthocyanes	+	-	-
Saponosides	-	+	-
Quinones libres	+	+	+
Coumarines	+	-	+
Dérivés anthracéniques libres	+	+	+
Alcaloïdes	-	-	-
Stérols et tri terpènes	+	+	+
Hydrodistillation			
Anthraquinone	-	-	-
O-Hétérosides à génine réduite	+	+	+
C-Hétérosides	+	+	+

Comparer aux résultats obtenus par (Benhamou ; 2013), nous remarquons la mise en évidence des alcaloïdes et des leucoanthocyanes qui sont absents dans notre étude. Les tanins, les anthocyanes et les anthraquinones sont négatifs. Cette différence peut être liée aux protocoles expérimentaux utilisés et aux chimiotypes des deux plantes.

Les feuilles de *Carthamus* non étudié à notre connaissance révèlent la présence des tanins et des leucoanthocyanes qui sont absents dans les racines.

**Tableau 3.5 :** Résultats de test phytochimique de *Carthamus Caeruleus* L des travaux antérieurs.

Substance	Résultats	Substance	Résultats
Saponoside	+	Leucoanthocyanes	+
Coumarine	+	Anthocyanes	-
Alcaloïdes	+	Tanins	-
Iridoids	-	Flavonoïdes	+

### 3.2.3 Rendements des extraits

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction nous avons procédé à une extraction par macération en utilisant différents solvants. Les résultats des rendements sont illustrés dans le (Tableau 3.6), (Figure 3.5).

**Tableau 3.6 :** Rendements des extraits par différent solvants.

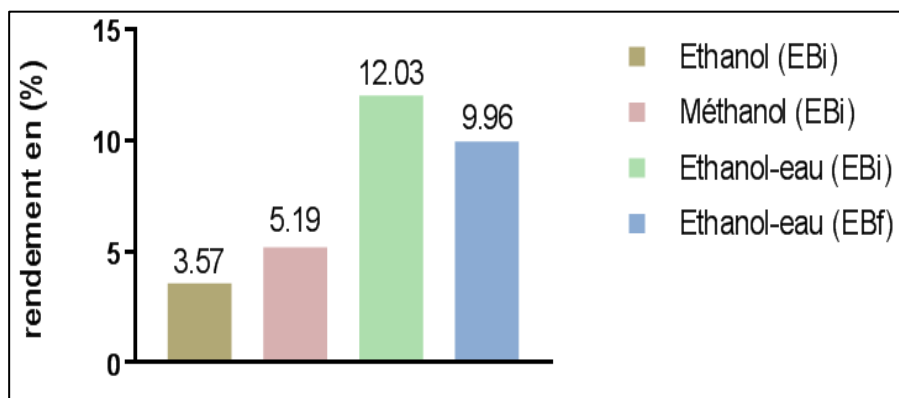
<b>Première macération</b> ( <i>masse utilisée =20 g</i> )		
Solvant d'extraction	Masse (g)	Rendement (%)
Méthanol à 96°	1.038	5,19
Éthanol à 96 °	0.714	3,57
Éthanol-eau (70 :30)	2.406	12,03
<b>Deuxième extraction</b> ( <i>masse utilisée =737g</i> )		
Ethanol-eau	73.405	9,96

Les résultats décrits dans ce tableau révèlent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur le rendement.

Au vu de ces résultats de la première extraction le mélange hydro-éthanolique à 70 : 30 (v/v) avec un ratio de 1/10 donne un meilleur rendement (12.03%) comparés aux rendements obtenus pour les autres solvants. Ainsi notre choix c'est porté sur le mélange hydroalcoolique pour la deuxième extraction afin d'avoir un bon rendement pour la suite de notre travail.

Néanmoins, le changement de ratio en solvant 1/3 au lieu de 1/10 a donné un rendement beaucoup plus faible (9,96 %), (**Figure 3.5**). Cette différence peut être expliquée par la différence des proportions des ratios dans les deux extractions. En effet un ratio de 1/10 a permis de solubiliser plus de molécule et de ne pas saturer le solvant approprié [75].

Un rendement de 15,2% a été signalé pour celle de Sétif (**Saffidine ; 2015**) pour l'extrait hydro-éthanoliques (70 :30) avec un ratio 1/10).



**Figure 3.5:** Rendements d'extractions de *Carthamus caeruleus* L.

A priori, nous pouvons dire que le meilleur solvant pourrait être celui qui donne le plus grand rendement, or suivant la nature de celui-ci, nous n'obtenons pas le même type d'extrait. Certains solvants extraient de la matière végétale à la fois le principe odorant, les pigments (colorants) et les matières cireuses. C'est le cas de l'éthanol qui, en plus de l'huile essentielle extraient des pigments et des cires. Ceci est dû au facteur de polarité, en effet, les composants d'une essence sont mieux extraits par des solvants de même polarité. Nous ne pouvons donc pas se baser sur le rendement global en extrait pour pouvoir affirmer que tel ou tel solvant est meilleur pour l'extraction.

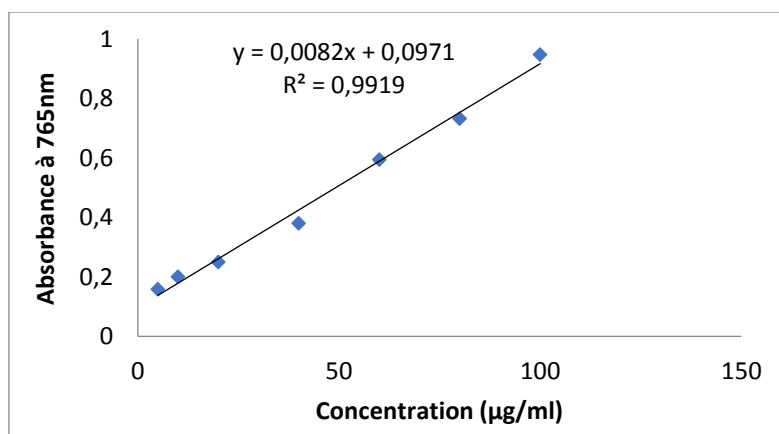
En outre, l'addition de 30 % d'eau distillée à l'éthanol a augmenté de façon remarquable le pouvoir extractant. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont révélé que les solvants mixtes sont très efficaces à extraire les polyphénols. L'utilisation de solvants mixtes aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols.

La supériorité des solvants mixtes seraient dues à l'augmentation de la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique. L'éthanol en combinaison avec l'eau permet une meilleure extraction des polyphénols totaux.

### 3.2.4 Dosage des biomolécules

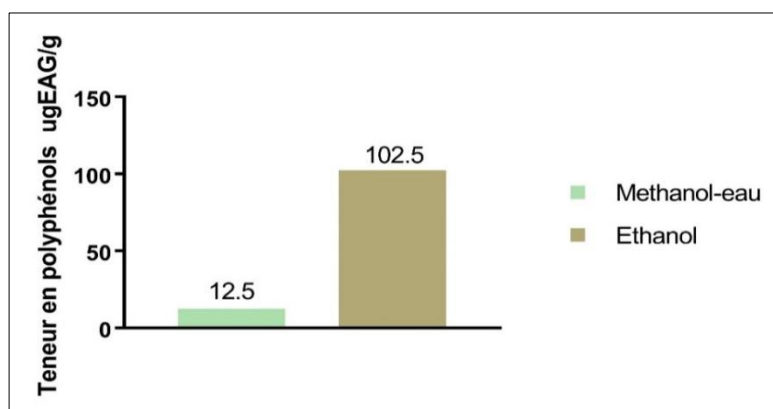
#### 3.2.4.1 Teneur en polyphénols totaux

La variabilité des teneurs des polyphénols des racines de la *Carthamus* pour chaque extrait est calculée à partir de l'équation de régression d'une gamme d'étalonnage en milieu aqueux (0 à 100 µg/ml), établie avec l'acide gallique dans les mêmes conditions opératoires que les extraits (**Figure 3.6**). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).



**Figure 3.6:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

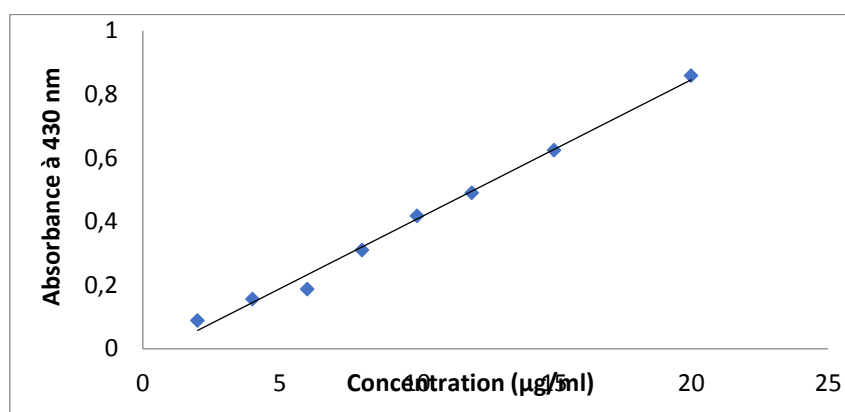
Les résultats du dosage des polyphénols des différents extraits (éthanol et méthanol-eau) sont regroupés dans la **Figure 3.7**. La teneur moyenne en polyphénols obtenue avec l'extrait éthanolique (102,5 mg EAG/g) est largement supérieure à celles obtenue par **Arroudj (2017)**, (17,56 mg EAG/g). Néanmoins, cette teneur est relativement faible par rapport à celle donnée par **Toubane (2017)**, (190,98 mg EAG/g d'extrait). Par contre l'extrait hydroalcoolique présente une très faible teneur en polyphénols totaux (12,5 mg EAG/g).



**Figure 3.7 :** Teneur en polyphénols dans les extraits de *Carthamus*. C.

### 3.2.4.2 Teneur en flavonoïdes :

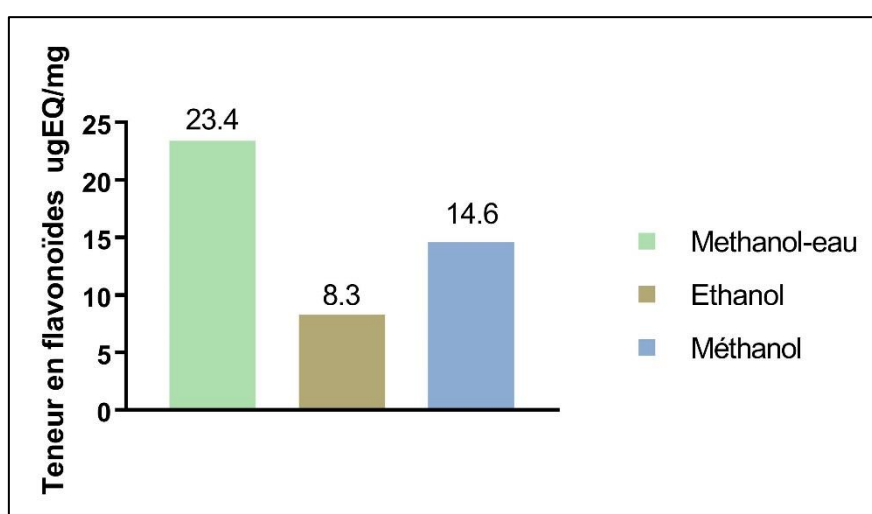
La concentration des flavonoïdes totaux pour chaque extrait est calculée à partir de l'équation de régression d'une gamme d'étalonnage en milieu aqueux (0 à 20  $\mu\text{g/ml}$ ), établie avec la quercétine dans les mêmes conditions opératoires que les extraits (**Figure 3.8**). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).



**Figure 3.8** : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La **Figure 3.9** illustre les résultats du dosage des flavonoïdes des différents extraits (méthanol, éthanol et méthanol-eau).

Contrairement aux polyphénols la teneur des flavonoïdes est plus importante pour l'extrait hydro-méthanoïque que l'extrait méthanol et éthanol. Néanmoins, la teneur pour les trois extraits reste largement supérieure à la teneur citée dans la littérature (4.40  $\mu\text{g EQ/mg}$ ).



**Figure 3.9** : Teneur en flavonoïdes dans les extraits de *Carthamus. C.*

Cette différence peut être attribuée à divers facteurs endogènes et exogènes de la plante ; facteurs environnementaux, facteurs liés au séchage et la période de récolte, méthode d'extraction...etc.).

### 3.3 ACTIVITE BIOLOGIQUE

#### 3.3.1 Evaluation de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante a été évaluée en spectrométrie UV par le test du piégeage du radical DPPH stable par les différents extraits de la *Carthamus caeruleus L*) ainsi que celle de l'acide ascorbique (référence) après quinze minutes de réaction à  $\lambda=515\text{nm}$  des solutions méthanoliques des extraits. Les solutions a testé sont préparé sur des gammes de concentrations allons de (125-500 $\mu\text{g/ml}$ ) pour le méthanol et l'éthanol et (10-50 $\mu\text{g/ml}$ ) pour le éthanol-eau.

La solution de DPPH fraîchement préparée est d'une couleur pourpre ( $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$ ) cette solution vire progressivement vers une couleur jaune en présence d'un bon donneur d'hydrogène, c'est à dire, un puissant antioxydant.

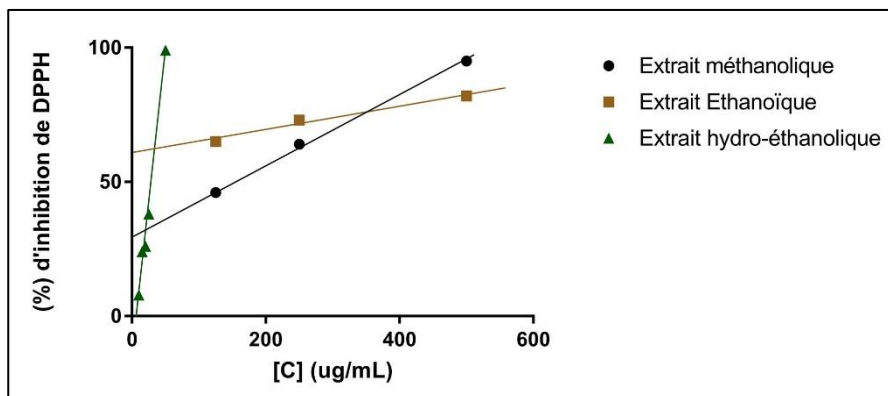
Ce test est largement utilisé par la communauté scientifique dans les cas d'étude comparatifs. Les valeurs des activités pour différentes concentrations et les résultats qui représentent la moyenne sur trois essais sont regroupés dans le **Tableau 3.7**.

Les pourcentages de capture du radical (% CR) ont été calculés à partir de la relation (2.4).

**Tableau 3.7 :** Activité antioxydante et pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

Solvant	Concentration	IR%	Equation	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> ± DS( $\mu\text{g/ml}$ )
Méthanol	125	46	$y = 24,500x + 19,333$	0,9771	125,171
	250	64			
	500	95			
Ethanol	125	65	$y = 0,044x + 60,500$	0,9758	-
	250	73			
	500	82			
Ethanol-eau	10	7,9	$y = 2,222x - 14,549$	0,9889	29,049
	20	26			
	25	38			
	50	99			
Acjde ascorbique	25	77			14
	50	83			
	100	97			

Le pouvoir antioxydant (**Tableau 3.7**) est exprimé par la concentration inhibitrice de 50% des radicaux appelée  $IC_{50}$ . Ces grandeurs ont été déterminées graphiquement à partir des droites présentées sur la **Figure 3.10** par régression linéaire des pourcentages d'inhibition  $IR_{50}$ .



**Figure 3.10** : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

La concentration inhibitrice minimale ( $CI_{50}$ ) est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de  $CE_{50}$  est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

Les résultats montrent que le radical libre DPPH est efficacement inhibé par les concrètes testés. Cette activité augmente évidemment avec la concentration en extraits. En effet, la capacité anti-radicalaire la plus élevée est trouvée pour l'extrait éthanol-eau avec plus de 99 % d'inhibition pour une concentration de 50  $\mu\text{g/mL}$  comparé à l'acide ascorbique dont le pourcentage d'inhibition est de 83% pour la même concentration. Alors que, les extraits à l'éthanol et méthanol le pourcentage n'excèdent pas 50% pour une concentration de 125  $\mu\text{g/mL}$ .

L'extrait éthanol-eau possède une capacité de neutralisation du radical libre DPPH puissante, puisqu'il agit à une très faible dose 29  $\mu\text{g/mL}$ . En comparaison avec les travaux antérieur, il est à signaler que nos résultats sont en accord avec ceux publié par **Toubane (2017)**. Par contre, **Arroudj (2017)**, signale une activité anti oxydante de l'ordre de (238,413  $\pm$  14.17 $\mu\text{g/ml}$ ) pour l'extrait hydro-éthanoléique.

Les valeurs de l' $IC_{50}$  obtenues pour nos extraits (151  $\mu\text{g/mL}$  pour l'extrait méthanoïque et 29 $\mu\text{g/mL}$  pour l'extrait hydro-éthanoléique indiquent une activité antioxydante très importante. Il est clair que la faible teneur en flavonoïdes dans l'extrait méthanoïque et éthanoléique est liée à la faible activité antioxydante enregistrée par ces extraits.

### 3.3.2 Etude antibactérienne :

L'activité antibactérienne des extraits et de l'huile essentielle de la plante est basée sur la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton agar. Elle est évaluée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits et l'huile à testés vis-à-vis de deux germes pathogènes est donnée dans le **Tableau 3.8**. L'échelle d'estimation de l'activité est classée par les diamètres d'inhibition de la croissance microbienne en cinq classes [76, 20].

- Très forte inhibition :  $D \geq 30$  mm
- Forte inhibition :  $21 \text{ mm} \leq D \leq 29$  mm
- Moyenne inhibition :  $16 \text{ mm} \leq D \leq 20$  mm
- Légère inhibition :  $11 \text{ mm} \leq D \leq 16$  mm
- Pas d'inhibition :  $D \leq 10$  mm

Les résultats consignés dans le **Tableau 3.8** montrent que l'huile essentielle des racines de C.C présente une puissante activité inhibitrice sur la souche *staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition très grand (108 mm).

**Tableau 3.8 :** Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits et de l'huile essentielle des racines de *Carthamus caeruleus*.

Souches bactérienne	Zone d'inhibition (mm)			
	HE	Méthanol	Ethanol	Ethanol-Eau
<i>Staphylococcus aureus</i>	108	16	14	8
<i>Escherichia coli</i>	12	-	6	-

*Escherichia coli* compte un diamètre d'inhibition moins faible (12mm). Il avère que les extraits par solvant n'ont pas une activité antimicrobienne significative vis-à-vis de la souche *Escherichia coli*. Le *staphylococcus aureus*, par contre est moyennement inhibé pour les extraits par solvant, alors qu'il ne présente aucune inhibition pour l'extrait hydroalcoolique.

Les travaux sur la *Carthamus* montrent que les huiles essentielles de cette espèce n'exercent qu'une faible activité (10 mm) sur le *staphylocoque aureus* et *Escherichia coli* [66, 75]. Ce n'est pas le cas pour notre huile essentielle qui est riche en ester, dont le composé majoritaire est le méthyle linoléate (77,69%).

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des principaux composés et aux effets synergiques possibles de ces constituants. Concernant l'activité antibactérienne des extraits méthanoïques et éthanoliques nos résultats sont similaires à ceux signalés par ces derniers. Les polyphénols, tels que les flavonoïdes ont un large spectre antimicrobien, probablement les extraits de la racine de la *Carthamus* ne renferme pas ces composés ce qui explique sa faible inefficacité pour *Escherichia coli* et son inhibition moyenne pour *Staphylococcus aureus*.

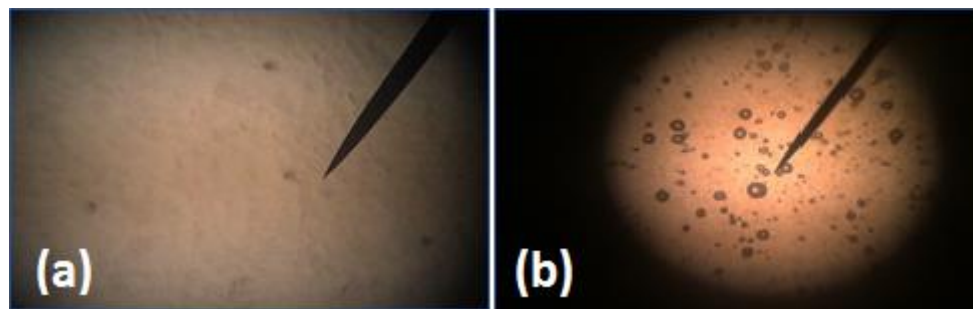
### 3.4 FORMULATION

#### 3.4.1 Contrôle qualité des pommades

Les résultats obtenus du control qualité des pommades à base d'extrait hydro-éthanolique et de l'huile essentielle sont consignés dans le **Tableau 3.9** :

**Tableau 3.9** : Contrôle qualité des pommade formulées.

	Examen macroscopique	Examen microscopique	Mesure de PH
<b>Pommade à base d'extrait hydro-éthanolique à 10%</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Couleur : marron (la couleur de l'extrait (<b>Fig 3.12</b>))</li> <li>- Odeur : l'odeur de l'extrait EtOH).</li> <li>- Homogénéité : bonne, Consistance d'une pommade</li> <li>- Test d'étalement : absence d'agrégats visible à l'œil nu</li> <li>- Bonne diffusion à travers la peau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne dispersion</li> <li>-Taille des gouttelettes : homogènes (<b>Figure 3.11</b>).</li> </ul>	PH=6,46
<b>Pommade à base de l'HE à 0,2%</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Couleur : blanche (la couleur de la vaseline,</li> <li>- Odeur : l'odeur de l'EH de <i>Carthamus</i>).</li> <li>- Homogénéité : bonne, consistance d'une pommade</li> <li>- Test d'étalement : absence d'agrégats visible à l'œil nu</li> <li>- Bonne diffusion à travers la peau (<b>Fig 3.12</b>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne dispersion</li> <li>-Taille des gouttelettes : homogènes (<b>Fig 3.11</b>)</li> </ul>	PH=6,64
<b>Crème traditionnelle de C.C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Couleur : jaune pâle</li> <li>- Odeur : odeur de l'huile essentielle</li> <li>- Homogénéité : bonne</li> <li>- Test d'étalement : absence d'agrégats visible à l'œil nu</li> <li>- Bonne diffusion à travers la peau (<b>Fig 3.12</b>)</li> </ul>		



**Figure 3.11** : Examen microscopique : (a) pommade à base de l'HE,  
(b) pommade à base d'extrait EtOH .



**Figure 3.12** : (a) ; Pommade à base d'extrait éthanolique (10%). (b) ; pommade à base d'HE.  
(c) ; crème traditionnelle.

### 3.5 ETUDE PRECLINIQUE

#### 3.5.1 Aperçu général sur le déroulement et les résultats de l'expérimentation

Au cours de la période expérimentale, un seul cas de mortalité a été enregistré : au jour (J0) lors de l'injection de l'anesthésie générale dans le lot Témoin. Les causes exactes de cette mortalité n'ont pas pu être déterminées ; néanmoins nous avons exclu tout rapport avec le bon déroulement du protocole en question.

#### 3.5.2 Observations cliniques de l'aspect des brûlures

L'induction d'une brûlure de troisième degré s'accompagne de la formation d'une escarre couvrant la plaie ; la cicatrisation s'effectue au-dessous de l'escarre, la ré-épithélialisation commence au niveau des berges de la plaie et entraîne le décollement progressif des bords de l'escarre, alors que son centre reste solidement adhérent à la plaie jusqu'à progression de l'épidermisation vers le centre de la plaie.

Selon le besoin, nous avons procédé au parage de ces bords décollés, ou à l'élimination délicate de l'escarre lorsque son adhérence centrale devient faible.

Ses opérations permettent d'estimer la progression de la ré-épithélialisation au-dessous de l'escarre. L'élimination des escarres à était fait pour tous les lots, sauf le lot Témoin, dont les escarres avaient un aspect sec et rugueux et sont restées solidement attacher à la peau jusqu'à des échéances relativement avancées.

### 3.5.3 Evaluation macroscopique clinique des brûlures

Les résultats d'évaluation macroscopique des plaies des différents lots sont fournis dans le **Tableau 3.10**.

**Tableau 3.10** : Observation clinique de l'aspect des brulures chez les différents lots.

Jours	N° rat	Plaie Exsudative					Plaie granuleuse					Plaie épidermée				
		E1	E2	E3	R	T	E1	E2	E3	R	T	E1	E2	E3	R	T
J <sub>4</sub>	1					+	+	+	+	+						
	2	+	+*			+	+		+	+						
	3	+	+*			+	+	+	+	+						
	4	++	+*			+	+		+	+						
	5	+	+**			+	+		+	+						
J <sub>8</sub>	1	+*	+***			+*	++		+	+						
	2	+*	++			+*	++		+	++						
	3	+*				+*	++	+	+	+						
	4	+**					++	+	+	+	+					
	5	+*	+++*			+*	++		+	+						
J <sub>15</sub>	1					+***			++			++				+
	2		++***						+	+	+	+				
	3		+++*	++*		+***			+	+		+				
	4		+**						+		++	+				+
	5					+***		++	+	+++		++				
J <sub>22</sub>	1		+***	+***	+**							++				++
	2			++*								++	+			+
	3											++	+	+		+
	4			++**					+			++	+			+
	5		+***									++				+

E1 : huile essentielle ; E2 : extrait EtOH-eau ; E3 : crème traditionnelle ; R : référence Biafine ; T : témoin  
Plaie exsudative : \* clair : normal, pouvant être associé à une infection bactérienne productrices de fibrinolysine ;  
 \*\* rose ou rouge : lésion capillaire, exsudat hémorragique ; \*\*\*vert : présence de pus indique une infection bactérienne  
Plaie granuleuse : + tissu rouge ; ++ Bien vascularisée avec bourgeons ; +++ Tissue rouge, bourgeons charnus  
Plaie épidermée : + montée progressive du bourgeon charnu et ébauche d'épidermisation marginale ; ++ : début du processus cicatriciel

- **Lot R traité avec la Biafine® :**

Le 1<sup>er</sup> jour les plaies sont fibrineuses et absence d'exsudat, avec un tissu nécrosé au centre.

Le 4<sup>ème</sup> jour : plaies granuleuses surplombées d'une croûte fibrineuse sèche et adhérente avec un tissu sous-jacent rouge et exsudatif et pourtour inflammatoire.

Le 8<sup>ème</sup> jour : plaies très granuleuses avec apparition de bourgeon. Les pourtours sont très suintants avec desquamation aux berges des plaies.

Le 15<sup>ème</sup> jour : apparition de bourgeon charnu avec un exsudat modéré d'un aspect clair et fin, et ré-épithélialisation au pourtour de la plaie. A partir du 15<sup>ème</sup> jour le processus d'épidermisation s'observe plus nettement.

- **Le lot E1 traité avec la pommade de l'HE :**

Le 1<sup>er</sup> jour, les plaies sont exsudatives et suintantes avec un écoulement séreux modéré et un œdème inflammatoire très avancé (gonflement, chaleur, rougeur et douleur)

Le 4<sup>ème</sup> jour, toutes les plaies sont d'un aspect granuleux +/++ avec apparitions des squames dans la peau péri-lésionnelle et un érythème au lit de la plaie, avec un exsudat fibrineux dans la berge de la plaie.

Le 8<sup>ème</sup> jour, un important bourgeon charnu apparait, avec présence d'un tissu fibrineux au pourtour de la lésion. L'aspect des lits des plaies est d'un rouge très vif avec un faible exsudat, signe d'une angiogenèse très avancée. Un début de ré-épithélialisation au pourtour de plaie a été remarqué dès le 8<sup>ème</sup> jour.

A partir du 15<sup>ème</sup> jour, toutes les plaies étaient dans un stade de ré-épithélialisation très avancé et début de la cicatrisation proprement dite.

- **Le lot E2 traité avec la pommade d'extrait EtOH-eau :**

Le 1<sup>er</sup> jour, les plaies sont nécrosées avec un faible exsudat et apparition de pus aux berges de la plaie.

Le 4<sup>ème</sup> jour : observation d'un important œdème inflammatoire et induration pré-lésionnel, avec un tissu nécrosé noirâtre au centre des plaies. Les plaies sont exsudatives avec un faible écoulement séreux d'un aspect clair.

Le 8<sup>ème</sup> jour : plaies très suintantes avec un écoulement rose-rouge, (signe d'une lésion cutané) et apparition d'un bourgeon hypertrophique.

Deux cas d'infections ont été observés au cours de l'évolution des plaies.

Le 15<sup>ème</sup> jour : apparition d'un tissu fibrineux aux berges de la plaie avec un important écoulement séreux d'une couleur opaque. Le début de processus de ré-épithélialisation à était observé très tardivement pour le lot E2.

- **Lot E3 traité avec la crème traditionnelle :**

Le 1<sup>er</sup> jour : observation d'un œdème inflammatoire, et un tissu très fibrineux aux berges de la plaie,

Le 4<sup>ème</sup> jour : plaies sèches et indurées, sans exsudat apparent, avec début d'apparition des squames au pourtour.

Le 8<sup>ème</sup> jour : plaies granuleuses mais toujours avec une croûte sèche et indurées, une desquamation a été observée sur les berges des plaies avec début de ré-épithélialisation.

Le 15<sup>ème</sup> jour : plaies granuleuse recouvertes d'une croûte sèche et dure très adhérente, avec bourgeon charnus au centre, et absence d'exsudat apparent. Le processus d'épidermisation est retardé en comparaison au lot de référence (lot R).

- **Le lot T non traité :**

Le 1<sup>er</sup> jour les plaies sont fibrineuses et œdémateuses avec un tissu sous-jacent granuleux avec un faible exsudat apparent.

Le 4<sup>ème</sup> jour : plaies pratiquement toutes nécrosées et suintantes et apparition d'un tissu fibrino-plaquettaire au pourtour.

Le 8<sup>ème</sup> jour : tissu toujours nécrosé avec apparition d'un bourgeon sec et adhérent.

Le 15<sup>ème</sup> jour : plaies granuleuses et très suintantes au pourtour et nécrosés au centre, avec un exsudat d'aspect vert et présence d'infection. L'épithélialisation à commencer très tardivement en comparaison au lot référence (lot R).

### 3.5.4 Évolution du processus cicatriciel

Le **Tableau 3.11** représente la signification des différences du pourcentage de rétraction des surfaces des plaies entre les différents lots :

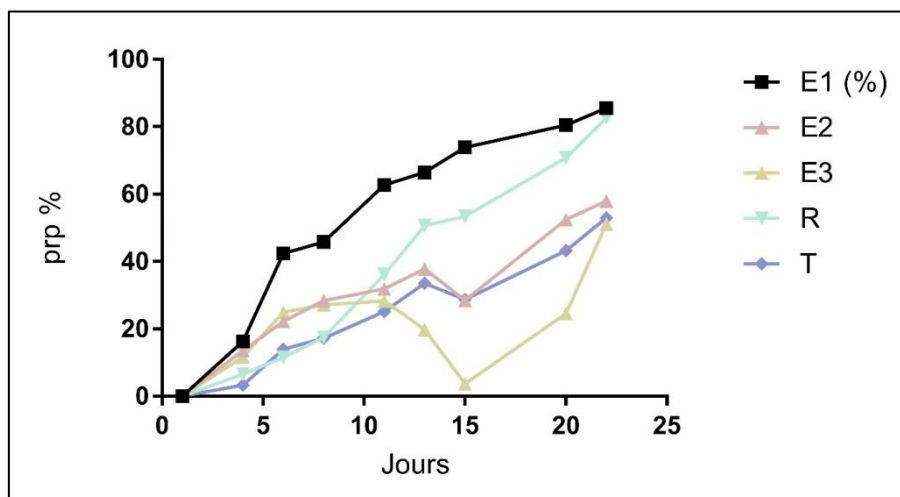
**Tableau 3.11** : Signification des résultats entre les différents lots.

Lots	E1 vs R	E2 vs R	E3 vs R	R vs T	E2 vs T	E3 vs T
Signification des différences	S	S	S	S	NS	NS

S : significatif  $p < 0,05$

NS : non significatif  $p > 0,05$

L'évolution des pourcentages des réductions des surfaces des plaies, leurs moyennes et écart-type sont mesurés et représentés dans la **Figure 3.13** durant toute la période d'expérimentation.



**Figure 3.13** : Pourcentage de réductions des plaies chez les différents lots.

Toutes les plaies ont enregistré une réduction progressive de leurs tailles avec l'avancée du temps (**Figure 3.13**). Néanmoins, Le lot traité avec la pommade à base d'HE a cicatrisé plus rapidement que tous les autres lots (E2, E3, R et T), (**figure 3.14**).

- **R vs T :**

Afin d'admettre l'efficacité de la Biafine<sup>®</sup> utilisée comme produit de référence on a comparé les deux lots. Les résultats sont nettement significatifs, en faveur de du lot R traité avec la (Biafine<sup>®</sup>).

- **E1 vs R :**

La comparaison entre les deux lots, lot E1 traité avec la pommade à base d'HE et le lot R traité avec la référence (Biafine<sup>®</sup>) montre que :

Au cours des 15 premiers jours post brûlure, l'écart entre les deux lots a évolué en faveur du lot E1. (PRP (%)) est de  $73,85 \pm 6,85$  % pour le lot E1 contre  $53,39 \pm 7,34$  % pour le lot R).

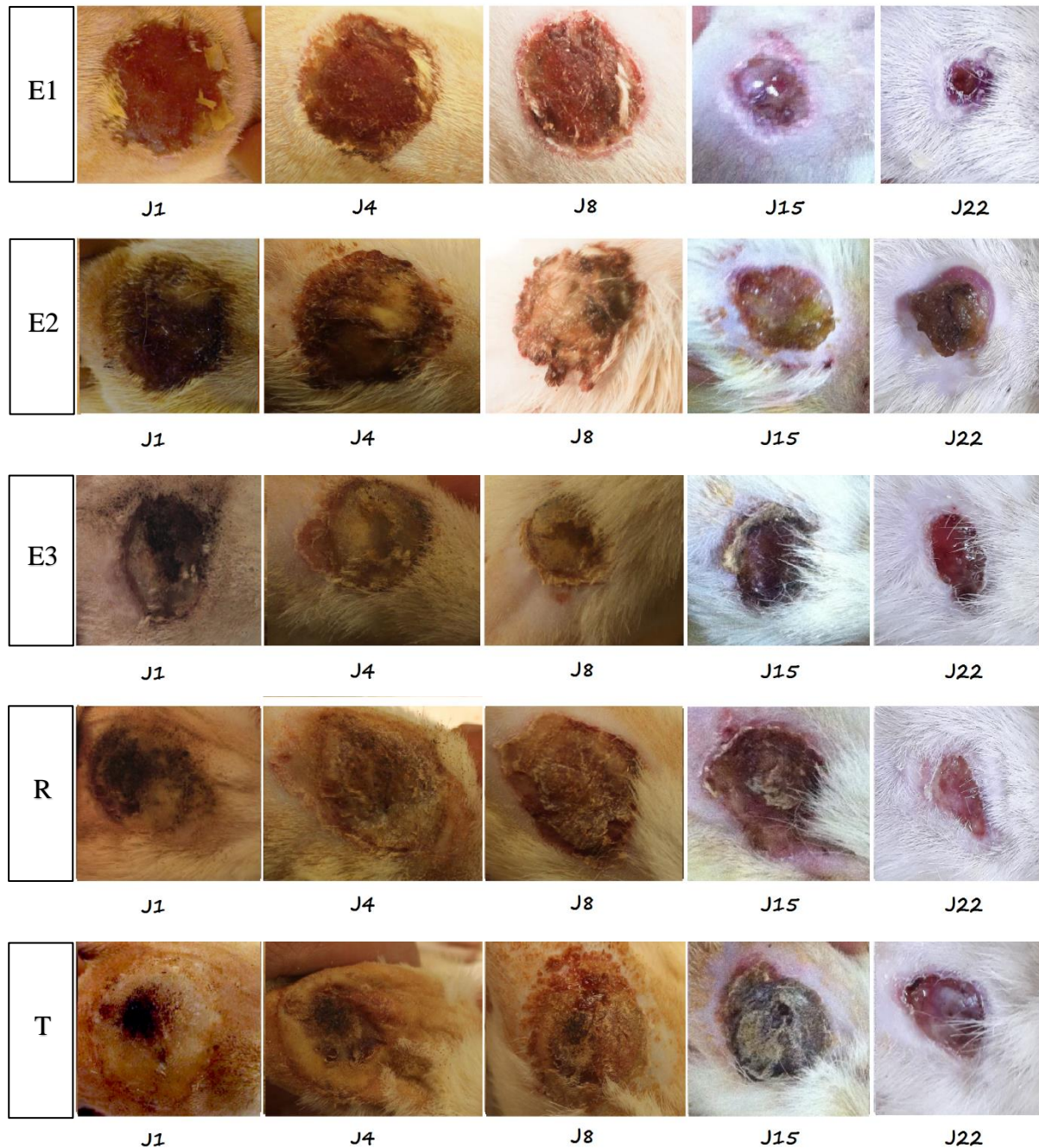
Au 20<sup>ème</sup> jour, le lot E1 a enregistré une moyenne de PRP (%) de  $80,49 \pm 6,28$  % contre  $70,76 \pm 4,27$  % pour le lot R traité avec la Biafine.

- **E2 vs R :**

Au cours des 11 premiers jours l'écart entre E2 et R n'était pas significatif. A partir du 13<sup>ème</sup> jour la différence de la moyenne des rétractions des plaies entre les deux lots est en faveur du lot R qui présente à cette échéance un pourcentage de  $70,76 \pm 4,27$  % contre  $52,44 \pm 20,283$  pour le lot E2.

**E3 vs R :**

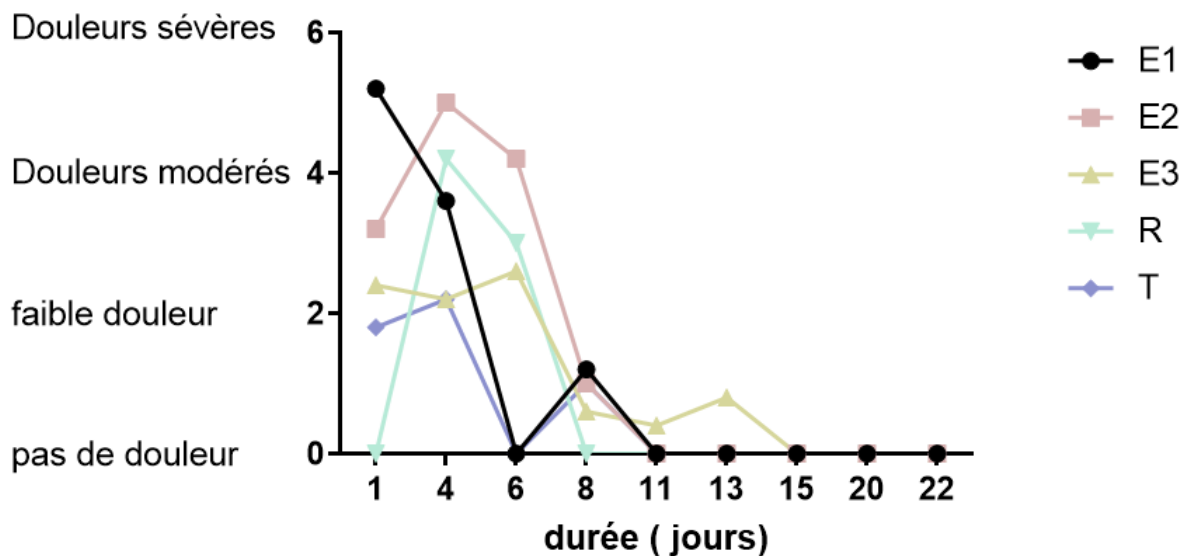
La différence entre les deux lots n'était pas significative au cours des 11 premiers jours. A partir du 15<sup>ème</sup> jour, la différence est largement en faveur du lot R. Pour le lot E3, il a présenté à cet échéance une moyenne de PRP (%) de seulement de  $24,53 \pm 24,87$  contre  $70,76 \pm 4,27$  pour le lot R.



**Figure 3.14 :** Evolution des plaies des différents lots dans le temps.

### 3.5.5 Evaluation de l'intensité de la douleur liée à la brûlure

Les résultats de l'évolution de la douleur selon la cotation sont fournis dans la **Figure 3.15**.



**Figure 3.15** : Evolution de l'intensité de la douleur au fil des jours.

Sur ce graphique (**Figure 3.15**) les scores de douleur sont enregistrés avant l'application topique des différentes pommades, sur une fréquence de 2 jours durant toute la phase de l'expérimentation. On constate que l'évolution de l'intensité de la douleur chez les rats du lot E1 est distinct des autres lots E2, E3, R et T.

Pour les rats du lot E1, traités avec la pommade à base d'HE, on observe une courbe décroissante ; douleur pratiquement sévère au 1<sup>er</sup> jour puis atténuation, jusqu'à disparition au 6<sup>ème</sup> jour avec apparition d'une faible douleur le 8<sup>ème</sup> jour.

Pour les autres lots, E2, R, E3 et T, l'évolution des courbes est pratiquement la même, la douleur semble s'accroître jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour pour E2 et R et au 6<sup>ème</sup> jour pour E3 puis décroît progressivement jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour pour R, 11<sup>ème</sup> jour pour E2 et un prolongement de la sensation de douleur jusqu'au 15<sup>ème</sup> pour E3 la pommade traditionnelle.

Une douleur nociceptive aiguë survient en réponse à une lésion tissulaire et sa durée est généralement limitée. Quand les plaies sont longues à cicatriser, la réponse inflammatoire prolongée peut provoquer une sensibilité accrue de la plaie (hyperalgie primaire) et de la peau environnante (hyperalgie secondaire).

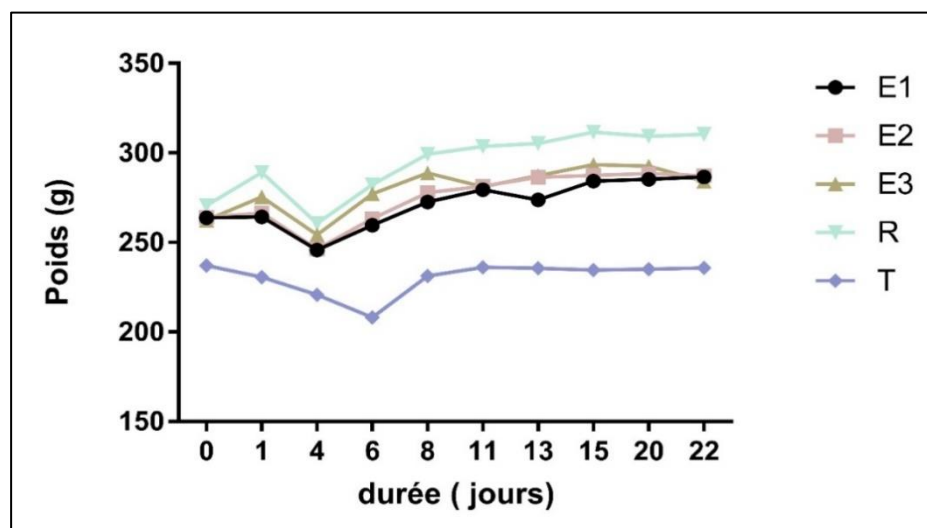
Une douleur qui empire peut indiquer des problèmes de guérison tels qu'une infection ou l'utilisation d'un traitement inapproprié [douleur et pansement], ce qui est constaté chez les rats du lot E3 traités avec la crème artisanale. Cette évolution anormale et persistante est due à de nombreux cas d'infections. Ceci a donné une phase inflammatoire très prolongée et donc un retard dans la cicatrisation et éventuellement une persistance de douleur. Cette anomalie observée dans le lot E3, est expliquée, ci-dessous, dans la partie discussion générale des résultats [77].

Pour les rats du lot E1 traités avec la pommade de l'HE, l'accentuation de la douleur au premier jour est due en grande partie à la phase inflammatoire-granulomateuse de tissu conjonctif. En effet, Le gonflement ou (œdème) qui est dû à la fuite plasmatique suite à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux, comprime les fibres nerveuses locales et adjacentes, responsables de la douleur [78]. Ceci traduit donc une phase inflammatoire accélérée et bien importante en comparaison aux autres lots, et par voie de conséquence une très bonne cicatrisation. L'apparition d'un pic au 8<sup>ème</sup> jour, est dû au processus de détersion de tissu fibrineux-plaquettaire, le détachement de la croûte à mit à nu la surface des plaies, ce qui a conduit à une provocation d'une légère douleur. En outre, la présence de Pentadécène, dans l'HE utilisée, provoque des irritations sur la peau, en plus du traumatisme (brûlure) subit par la peau, l'irritation peut induire une douleur sévère lors de l'application sur la plaie en question.

Pour les lots E2, T et R, l'évolution de la douleur semble assez normale mais plus persistante que le lot E1.

### 3.5.6 Évolution pondérale

Les données de l'évolution pondérale des rats des différents lots, sont mentionnées dans la **Figure 3.16**.



**Figure 3.16** : Evolution pondérale chez les rats des différents lots.

D'après la **Figure 3.16** on constate que l'évolution pondérale chez les rats brûlés des différents lots, suit globalement la même cinétique. Le graphe est segmenté en deux parties :

De 0 au 4<sup>ème</sup> jour on observe un déficit pondéral en pourcentage (par rapport au poids initiale du rat) de près de  $(7 \pm 0,5)$  % pour les lots E1, E2 et E3. Pour le lot R, le déficit est plus important, où il atteint un pourcentage de  $(10 \pm 0,3)$  %. A partir du 4<sup>ème</sup> jour, l'évolution pondérale chez les rats des lots E1, E2, E3 et R reprend son cours normal. Pour le lot T, le résultat indique que la chute du poids s'est prolongée jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour, avec un déficit pondéral de  $(9 \pm 0,5)$  %. Puis l'évolution reprend normalement.

Une chute de poids de plus de 10% avec une durée prolongée dans le temps après un traumatisme tissulaire engendre une carence protéino-énergétiques et altère toutes les phases de la cicatrisation : prolifération des fibroblastes, angiogenèse, synthèse et remodelage du collagène. Elle altère également la phagocytose augmentant le risque d'infection [79].

Pour notre expérimentation, tous les lots semblent reprendre une alimentation normale et un poids stable après le 4<sup>ème</sup> jour post-brûlure, avec de légères fluctuations très peu significatives ( $P > 0,5$ ) par conséquent aucun cas de dénutrition potentiel évident. Pour conclure, ces résultats montrent que les traitements effectués sur les différents lots E1, E2, E3 et R n'affecte pas le poids des animaux.

### 3.6 ETUDE HISTOPATHOLOGIQUE

L'interprétation histopathologique est faite par le Dr Saidani, au sein de laboratoire Anatomie-pathologie au CHU de Tizi-Ouzou.

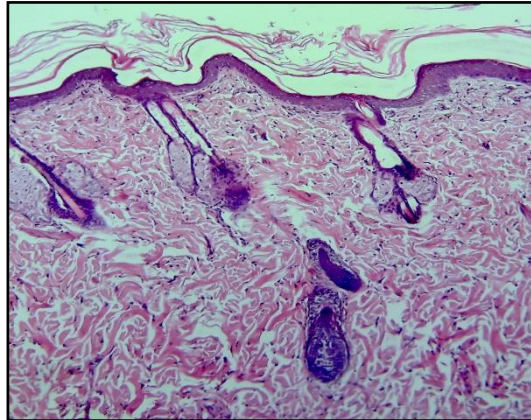
Les coupes histologiques des peaux brûlées chez les rats des différents lots E1, E2, E3, R et T, colorées à l'hématoxyline éosine, ont été observées dans le but de mettre en évidence l'état d'avancement de processus de cicatrisation des différentes plaies.

- **Le lot E1 :**

L'observation microscopique de la plaie du rat du lot E1 (**Figure 3.17**) a révélé ; Un épithélium stratifié bien formé très riche en kératinocytes (+++).

Un derme riche en faisceaux de collagènes (++), relativement détendu et disposé en réseaux aléatoires, présence d'élastine avec quelques fibroblastes. Formation des annexes cutanées (bourgeon pileux-sébacé) : follicules pileux et de glandes sébacées. Quelques vaisseaux sanguins sont également observés au niveau du tissu conjonctif.

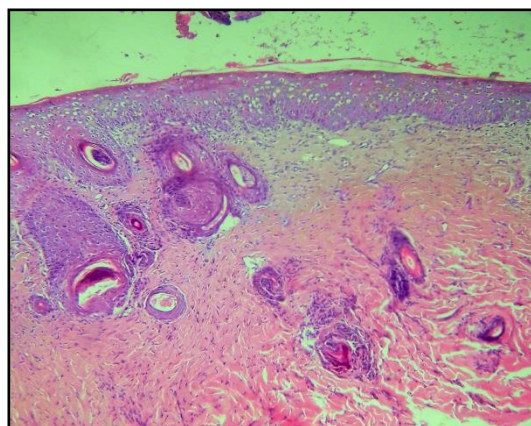
Cette observation indique un stade de reconstitution tissulaire très avancé. L'organisation des faisceaux de collagènes déminue le risque de formation d'une plaie hypertrophique ou une chéloïde. Les annexes cutanées ont une contribution majeure à la ré-épithélialisation, puisqu'elles permettent aussi une régénération épidermique par foyer multiple plus tôt qu'uniquement à partir des périphéries de la plaie (berge de la plaie), ce qui accélère nettement la cicatrisation. Par conséquent, les plaies traitées avec la pommade de l'huile essentielle ont une très bonne ré-épithélialisation (++++).



**Figure 3.17 :** Coupe histologique vu au microscope des rats du lot E1.

- **Le lot E2**

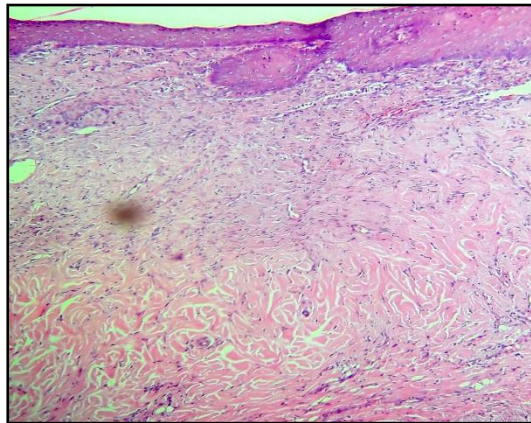
L'observation microscopique de la plaie des rats du lot E2 (**Figure 3.18**) a révélé une hyper-activité mitotique de kératinocytes (+++), une forte présence de fibroblastes au niveau de corium (+++) et une inflammation au niveau de tissu conjonctif. Ces résultats ont montré une plaie encore au stade de bourgeon charnue et ré-épithélialisation plus au moins incomplète (++) de tissu lésionnel, avec un risque potentiel de développement d'une plaie hypertrophique.



**Figure 3.18 :** Coupe histologique vu au microscope de rat du lot E2.

- **Le lot E3 :**

L'observation microscopique de la plaie du rat de lot E3 (**Figure 3.19**) a révélé une présence d'un bourgeon inflammatoire en phase aigüe, une vascularisation (++), un curium riche en fibroblaste, une myofibroblaste et présence d'un infiltrat inflammatoire polymorphe ((PNN) : polynucléaire neutrophile et éosinophile) en faveur d'une infection. Ce diagnostic a révélé une plaie en phase inflammatoire et un retard de cicatrisation.

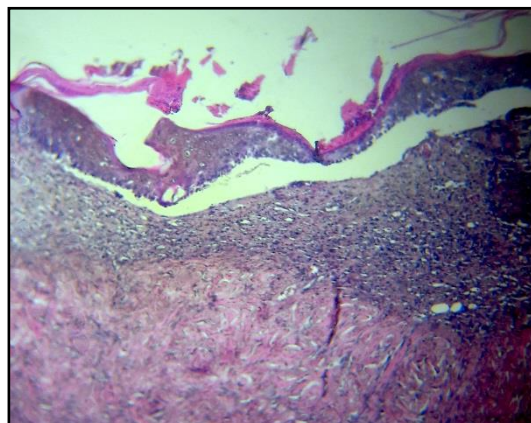


**Figure 3.19 :** Coupe histologique vu au microscope de rat du lot E3.

- **Le lot R**

L'observation microscopique de la plaie de rat du lot R (**Figure 3.20**) a révélé un bourgeon charnu inflammatoire avec une présence de PNN (++) altérées en faveur d'une infection.

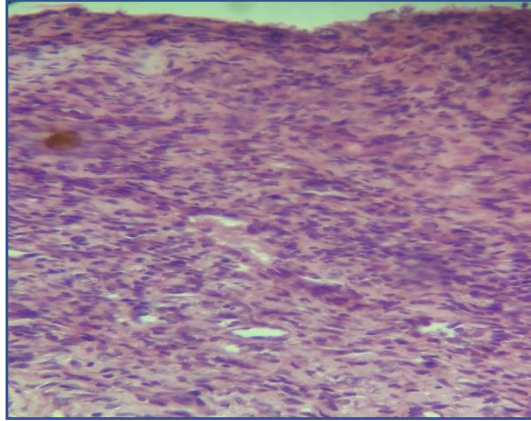
Présence de tissu épithélial (++) et un épanchement au niveau de la lame basal épidermique (tissu dermo-épidermique) qui peut traduire une détersion de tissu épithéliale. Ces résultats ont révélé une plaie réépithélialisée (+++) avec un fort potentiel risque infectieux.



**Figure 3.20 :** Coupe histologique vu au microscope de rat du lot R.

- **Le lot T**

L'observation microscopique de la plaie de rat du lot T (**Figure 3.21**) a révélé une lésion ulcérée, avec absence totale de tissu épithéliale, une importante prolifération fibroblastique au niveau de corium (+++) avec un infiltrat inflammatoire polymorphe. Ces résultats indiquent une ré-épithélialisation négative et un retard de cicatrisation.



**Figure 3.21** : Coupe histologique vue au microscope de rat du lot T.

Pour conclure, l'étude histopathologique nous a révélé un classement qualitatif d'épithélialisation des plaies donné dans l'ordre croissant suivant : Lot E1 < Lot R < Lot E2 < Lot E3 < Lot T, ce qui confirme totalement le diagnostic clinique fait précédemment.

### 3.6.1 Discussion générale des résultats :

Dans la présente étude, une garantie en équivalence thérapeutique entre l'étalon de référence (la pommade traditionnelle de *Carthamus caeruleus*) et les pommades formulées (pommade à base d'HE et pommade à base d'extrait EtOH-eau) étaient indispensables, en vue d'éviter une éventuelle toxicité chronique et garantir à la fois, un effet pharmacologique approprié. Pour cela on s'est basé sur la posologie traditionnelle de la plante pour calculer les doses des PA dans les deux pommades formulées. En conséquence, aucun signe de toxicité n'a été identifié cliniquement sur les rats traités avec les 03 topiques formulés.

Le lot E1, traité avec la pommade à base de l'HE de la plante étudiée a donné des résultats très satisfaisant, bien supérieur au lot R traité avec la référence (la Biafine). L'un des premiers facteurs qui a nettement accéléré la cicatrisation des plaies de lots E1, est étroitement lié à l'effet antibactérien de l'HE.

En effet, une brûlure est obligatoirement infectée à partir de la 6<sup>ème</sup> heure par la flore commensale de tissu cutanéomuqueux, ce qui affecte et prolonge la phase inflammatoire et retarde le processus de cicatrisation [80]. Le staphylocoque aureus est très redoutable dans ce genre d'infections [81].

Par ailleurs, on a démontré que l'HE de *Carthamus caeruleus* a un grand pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la souche staphylocoque aureus, avec un diamètre d'inhibition de  $106 \pm 2$  mm. L'effet antibactérien de l'HE peut être dû au lénolinate de méthyle (composé majoritaire de l'HE à 78%), il est à noter qu'aucune information recensée n'a été rapportée dans la bibliographie pour un quelconque effet antibactérien.

Néanmoins pour l'Acide Gamma Linoléinique, qui est son dérivé métabolique, contribue amplement dans le processus de la lutte infectieuse et réparation des tissus lésés.

En effet l'acide linoléinique donne, grâce à une élongase, le DGLA (Acide Dihomo-Gamma-Linolénique). Ce DGLA est à la croisée des chemins entre la voie de synthèse de l'Acide Arachidonique (AA) et celle des Prostaglandines de type 1 (PG1), ces derniers vont avoir pour but une stimulation d'une cascade de facteur de croissance qui sont les véritables médiateurs cellulaires de la cicatrisation [82].

En outre, les familles d'acides gras essentielles (AGE), favorise la prolifération des cellules responsables du développement des annexes pileux-sébacées, ce qui va contribuer à son tour, à une cicatrisation par foyer multiple [83].

Pour le lot E3 traité avec la crème traditionnelle, les mauvais résultats obtenus ont été dû à une détérioration de la crème dès le 6<sup>ème</sup> jour d'utilisation (changement de couleur de la crème vers une teinte plus foncée avec une odeur très piquante et nauséabonde). En effet la crème devait être conservée à une basse température, ce qui n'a pas été le cas dans notre expérimentation, par cause de contrainte technique.

Le taux d'humidité élevée dans la crème (>50%) a certainement favorisé aussi une oxydation enzymatique, aboutissant à la dégradation de la préparation.

En revanche, une autre préparation a été préparée le 13<sup>ème</sup> jour, ceci a permis d'inhiber l'infection et de relancer le processus cicatriciel à nouveau comme on peut le constater dans la **(Figure 3.13)** et améliorer l'état de la douleur **(Figure 3.15)**.

S'agissant de l'extrait éthanolique des racines de la plante, (lot E2) aucun résultat significatif sur le processus cicatriciel n'a été démontré, et cela, malgré la présence de grandes familles de molécules bioactives dans l'extrait, toute fois, son pouvoir antioxydant, à certainement contribuer à une meilleure conservation de l'extrait natif.

# **Conclusion**

Notre étude a pour principale objectif de cibler les phytoconstituants de La Cardoncelle bleu ou « *Carthamus caeruleus L* » responsables de la régénération de la peau de manière efficace.

L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation nous a permis d'avoir des rendements de l'ordre de 0,17 à 0.19% pour les feuilles et les racines respectivement. L'analyse par CPG-SM a permis d'identifier 32 composés représentant 95.23% de la composition totale de l'huile essentielle obtenue à partir des racines. Les résultats indiquent que le composé majoritairement présent dans cette dernière est le « méthyle linoléate » avec un pourcentage de 77.69%.

Pour la partie non volatile un screening phytochimique a montré la présence des glycosides cardiaques, des polyphénols, des saponines, des terpénoïdes, des flavonoïdes, des quinones libres, des stérols et des triterpènes ainsi que les O-Hétérosides et C-Hétérosides. Le dosage des biomolécules a révélé une teneur en polyphénols totaux de 102.5 mgEAG/g pour l'extrait éthanoïque et une teneur en flavonoïdes de 23.4 mgEQ/g pour l'extrait hydro-méthanolique.

Le test de piégeage du radical libre DPPH révèle une très forte activité antioxydante pour l'extrait hydro-éthanolique qui atteint une valeur maximal de 99%, on a également pu relier cet effet à la forte présence des polyphénols comparé aux résultats trouvés dans l'extrait méthanolique ainsi qu'éthanolique.

L'activité antibactérienne réalisée sur deux souches microbiennes, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* a montré pour les HE une très forte inhibition de l'ordre de 106 mm pour le *Staphylococcus aureus* et une inhibition de 12 mm pour *Escherichia coli* qui s'avère peu significative. En revanche les extraits ont montré une moyenne inhibition pour le *Staphylococcus aureus* seulement.

Les résultats préclinique ont montrés que l'huile essentielle a donné une meilleur évolution de cicatrisation avec un PRP de  $80,49 \pm 6,28\%$  contre  $70,76 \pm 4,27$  pour la Biafine utilisé comme référence. La préparation traditionnelle largement utilisée par la population locale a montré une évolution similaire durant les huit premiers jours. Néanmoins, la détérioration de cette crème dès le 6<sup>ème</sup> jour nous a conduits à des résultats plus au moins non concluant.

# **Annexe**

## Annexe 1 : Matériel et méthodes

L'ensemble des matériels, équipements ainsi que des produits utilisés durant la première étape de notre travail sont mentionnés dans le **Tableau A.1**

**Tableau A : 1 : Matériel et équipement utilisé**

Etapes	Equipements & Matériels	Verrerie	Produits	Outils logistiques
<b>Dessiccation et séchage</b>	-Etuve de séchage à convection			-Excell®
<b>Broyage</b>	-Broyeur mécanique			
<b>Test Phytochimique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plaque chauffante</li> <li>- Balance analytique</li> <li>- Spatule</li> <li>- Pompe à vide</li> <li>- Büchner</li> <li>- Lampe UV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cristallisoir</li> <li>- Fiole jaugée</li> <li>- Pipette graduée</li> <li>- Tubes à essaie</li> <li>- Becher</li> <li>- Erlenmeyer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- FeCl<sub>3</sub></li> <li>- HCl</li> <li>- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>- Copeaux Mg</li> <li>- NH<sub>4</sub>OH</li> <li>- 3-Methylbutan-1-ol.</li> <li>-Anhydre acétique</li> <li>- CHCl<sub>3</sub></li> </ul>	
<b>Extraction</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chauffe-ballon</li> <li>- Rota-vapeur (HEIDOLF LABOROTA 4001).</li> <li>- Pincés</li> <li>- Carthamus caeruleus L.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ballons 1L, 4L</li> <li>- Clevenger gradué</li> <li>- Pipette pasteur</li> <li>- Condensateur à boules.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pierre ponce</li> <li>- Ethanol analytique.</li> <li>- Méthanol analytique</li> <li>- Hexane</li> </ul>	
<b>Caractérisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CPG-SM</li> <li>- Tube Eppendorf gradué</li> <li>- Spectrophotomètre UV-Visible</li> </ul>			-Excell®
<b>Formulation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plaque chauffante</li> <li>- Balance analytique</li> <li>- PH mètre</li> <li>- Microscope photonique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cristallisoir</li> <li>- Mortier</li> <li>- Béchers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vaseline blanche</li> <li>- HE de Carthamus caeruleus</li> <li>- Extrait hydro-éthanolique de Carthamus Caeruleus</li> </ul>	

**Tableau A : 2 : Matériel et équipement utilisé**

	<b>Matériel</b>	<b>Produits</b>	<b>Equipement / outil logistique</b>
<b>Dosage des biomolécules</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropipette</li> <li>• Pipette gradué 5ml</li> <li>• Eprouvette 5ml</li> <li>• Ballon 250ml</li> <li>• Portoir</li> <li>• Pince</li> <li>• Tubes à essais</li> <li>• Becher</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ethanol</li> <li>• Méthanol</li> <li>• Réactif de Folin-ciocalteu</li> <li>• Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5%)</li> <li>• Acide gallique</li> <li>• AlCl<sub>3</sub></li> <li>• Quercétine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spectrophotomètre UV-Visible</li> <li>• Balance analytique</li> <li>• Broyeur électrique</li> <li>• Centrifugeuse</li> <li>• Excel®</li> </ul>
<b>Etude Antioxydante</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropipette</li> <li>• Tubes à essaies</li> <li>• Fioles jaugées</li> <li>• Burettes graduées</li> <li>• Becher</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthanol</li> <li>• DPPH en poudre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balance analytique</li> <li>• Spectromètre UV, ZUZI</li> <li>• Excel®</li> </ul>
<b>Etude Anti Bactérienne</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boite de pétrie</li> <li>• Ecouvillon</li> <li>• Bec bunsen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eau physiologique</li> <li>• Gélose MH</li> <li>• Gaz butane</li> <li>• Papier Watman</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etuve</li> </ul>
<b>Etude préclinique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Masselotte</li> <li>• Seringues médicales</li> <li>• Résistance par induction</li> <li>• Balance technique</li> <li>• Appareil photo Canon 600D</li> <li>• Marqueurs</li> <li>• Rats waster</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kétamine®</li> <li>• Biafine®</li> <li>• Pommade HE 0.2%</li> <li>• Pommade ext EtOH à 10%</li> <li>• Pommade traditionnelle de Carthamus caeruleus L.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesurim®</li> <li>• GraphPad Prism 8</li> </ul>
<b>Etude d'anatomo-pathologie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microtome (Sigma 57RD)</li> <li>• Cassette</li> <li>• Bistouri</li> <li>• Plaquette</li> <li>• Barres de Leuckhart</li> <li>• Étuve à lit fluidisé</li> <li>• Microscope photonique</li> <li>• Lame en verre</li> <li>• Lamelle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ethanol à différent degré.</li> <li>• Paraffine solide</li> <li>• Hématoxyline</li> <li>• Eosine</li> <li>• Coloration pour trichrome de Masson</li> </ul>	

## Annexe 2 : Etude de la cicatrisation

**Tableau A.3 :** Evaluation macroscopique clinique de la brûlure.

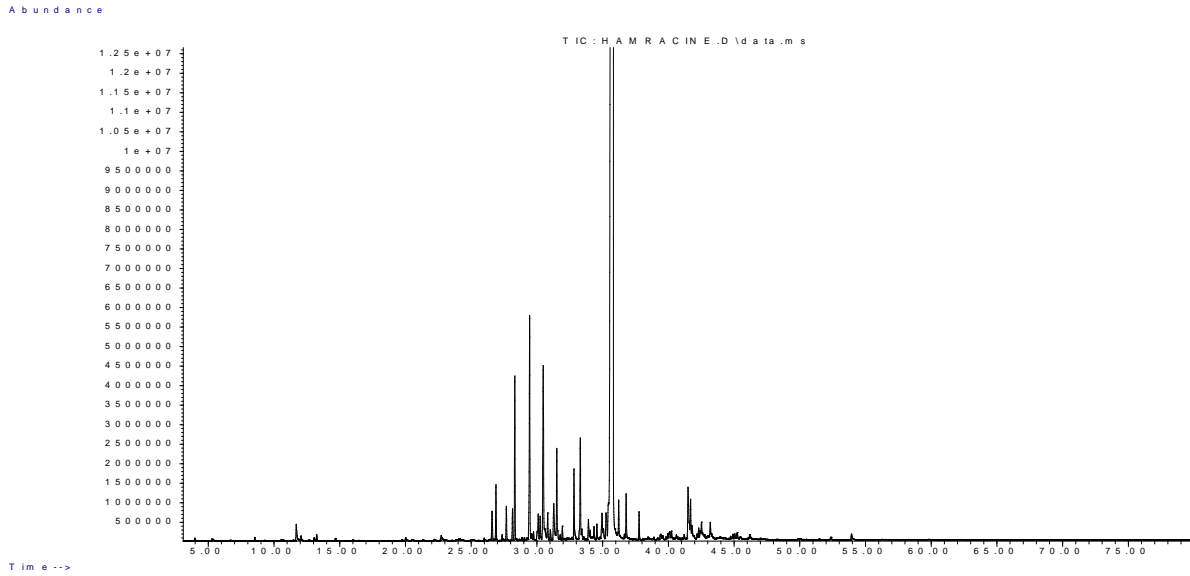
<b>N°</b>	<b>Plaie</b>	<b>Indicateurs</b>
<b>1</b>	Nécrotique humide	Tissu Brun, verdâtre, luisant avec pourtour inflammatoire
<b>2</b>	Nécrotique sèche	Tissu noirâtre sec et carboné
<b>3</b>	Fibrineuse	Tissu jaunâtre, peu adhérent
<b>4</b>	Fibreuse	Tissu blanchâtre, adhérent
<b>5</b>	Exsudative	Ecoulement séreux : faible modéré, fort
<b>6</b>	Granuleuse	Tissu rouge, bien vascularisé avec bourgeons charnus
<b>7</b>	Epidermée	Tissu rose, voir brillant
<b>8</b>	Infecté	Signes : rougeur, chaleur œdème, douleur exudant parfois nauséabonds présence de pus

**Tableau A.4 :** évaluation de la douleur selon la cotation

<b>Echelle de l'évaluation de la douleur</b>	
0	Pas de douleurs
1-2	Faible douleurs
3-5	Douleurs modérées
6-7	Douleurs sévères
8-9	Douleurs très sévères
9-10	Douleurs intense

### Annexe 3 : CPG-SM

Chromatogramme de l'analyse de l'huile essentielle des racines de *Carthamus caeruleus* CPG-SM est représenté ci-dessous :



**Figure A.1** : Chromatogramme de l'analyse de l'HE des racines de *Carthamus caeruleus*

# **Références Bibliographiques**

- [1] B. AMINA, «ethnobotanical study, phytochemical characreization and healing effetcs of Cathamus Caeruleus L», researchgate, pp. 61-68, 2013.
- [2] S. KARIMA, «Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de Carthamus caeruleus L et de Plantago major L», thèse doctorat, Sétif, 2015.
- [3] J. boutonnat, «la peau - cours,» 2007.
- [4] A.Bennik, «Interaction des poly phénols d'usine avec les protéines salivaires,», thèse de doctorat, Canada-Andre, 2002.
- [5] J. I. Gee J.M, «Polyphnolic compounds: interactions with the gut and implications for human health,» , thèse de doctorat, Current Medicinal Chemistry ,2001.
- [6] <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-polyphenol-6212/>.
- [7] M. Cano, «Superoxide scavenging by polyphenols: effect of conjugation and dimerization.,», thèse doctorat, NCBI, 2013.
- [8] A. Souâd, «Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels,», 2011.
- [9] K. Amina, «Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires.», thèse doctorat, Constantine, 2013.
- [10] R. Fethi et F. M. Selem, «Coumarines à intérêt thérapeutique,», 2017.
- [11] <http://www.wikiphyto.org/wiki/Alcalo%C3%AFdes>.
- [12] D. Sahraoui, «LES HETEROSIDES,» UN1901 . Laboratoire de Pharmacognosie, 2014/2015.
- [13] <https://www.britannica.com/science/quinone>.
- [14] Montoro P et al, «Structure antioxydante activety relationships of flavonoids isolated from different plant spaices food chemistry» *In AGRIS since*, p 349-355, 2005.
- [15] A. Pengelly, «The constituents of Medicinal plants: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine,» *CABI publishing*, p 233, 2004.
- [16] Arockia Babu .M et al, «Development of 3D-QSAR models for 5-Lipoxygenase Antagonist : chalcones. Bioorg,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, p344, 2002.

- [17] H .Maibach et al, «Skin antioxidants,» *Cosmetics & Toiletrie*, p 28-32, 2002.
- [18] G. Mantas et al, «Structural analysis of flavonoids with anti-HIV activity.,» *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, p. 171, 2000.
- [19] Di Carlo et al, «Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs,» *Life Sci*, p. 65, 1999.
- [20] Dos Santos M.D et al, «Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra)» *Journal of Ethnopharmacology*, p. 96, 2005.
- [21] Mishima S et al, «Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells» *Bioorganic & Médicinal Chemistr*, p. 13, 2005.
- [22] Basnet P et al, «Four di - O - caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models,» *Biol Pharm*, p. 19, 1996.
- [23] W. Mcdougall. Et al, «Dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids are selective Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 Integras», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p.344, 1998.
- [24] Stange R.R et al, «Constituents from the periderm and outer cortex of *Ipomoea batatas* with antifungal activity against *Rhizopus stolonifer*,» *Postharvest Biology & Technolog*, p. 23, 2001.
- [25] Dahmani N, «On-Line Radical Scavenging Detection and Characterization of Antioxidants from *Artemisia herba-alba*,» *Helvetica Chimica Acta*, p89, 2012.
- [26] Paolini V et al, « Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvr » thèse de doctorat, Toulouse ,2003.
- [27] AFNOR, Corps gras, graines, oléagineuses, produits dérivé, 4eme édition éd., 1988.
- [28] «article sur les huiles essentiels,» (En ligne)  
: [http://fr.labo-hevea.com/downloads/HE\\_fr.pdf](http://fr.labo-hevea.com/downloads/HE_fr.pdf).
- [29] N.Bouzidi, «Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche « *Artemisia herba alba* Asso», thèse doctorat, Mascar, 2016.

- [30] S. JOUAULT, «la qualite des huiles essentielles et son influence sur leur efficacite et sur leur toxicite,» Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Lorraine, 1986.
- [31] Z.Hellal, «Contribution à l'étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus : Application sur la sardine (*sardina pilchardus*)», mémoire, UMMTO, 2011.
- [32] J.Bruneton, « Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales », ed ; Tec et Doc, 1999.
- [33] Ferhat M, «Recherche de substance bioactives de l'espèce *Centaurea microcarpa* Cosse et Dur,» thèse doctorat, Msil, 2009.
- [34] N. Benayad, «Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales Marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées » thèse doctorat, Ouargla, 2008.
- [35] Degryse A et al, «Risque et bénéfice possibles des HE Ingénieur du Génie Sanitaire,» thèse doctorat, Rennes, 2008.
- [36] M. Englebin, «Essence et HE précaution d'emplois et conseils d'utilisation,» Rapport ; Centre de formation en aromathérapie, 2011.
- [37] M, Piochon, «Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèses,», thèse doctorat, Québec, 2008.
- [38] C. PIERRON, «Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs,» thèse doctorat, Lorraine, 2014.
- [39] «toxicité des huiles essentiels,» (En ligne):  
[https://fr.slideshare.net/ananthvinothan/ananth-vinothan?next\\_slideshow=1](https://fr.slideshare.net/ananthvinothan/ananth-vinothan?next_slideshow=1).
- [40] A. Lydia et Z. Chahrazed, «Evaluation des activités biologique d'une plante médicinale local *Carthamus Caeruleus* L,» thèse doctorat, Bejaia, 2017.
- [41] B. asma et al «Etude phytochimique et activité biologique des parties aériennes (feuilles, fleurs et brindilles) de *Thymelaea hirsuta*,» Master, Moustaganam, 2017.

- [42] A. Ikram, «Evaluation des activités antioxydant et antiradicalaire d'un mélange d'épices « Ras el hanout », thèse doctorat, Ouargla ; 2014.
- [43] N.Dahmani, «Etude de la composition chimique de l'Artemesia herba-alba poussant en Algérie», thèse doctorat, USTHB, 2010.
- [44] J. Tranchant , « Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse », Manuel use, 1995.
- [45] E. k. Chaker, «Caractéristique chimiques et biologique des extraits de plantes aromatiques oubliées de midi-pyrénées,» thèse doctorat, toulouse, 2010.
- [46] J. boutonnat, «la peau - cours -,» faculté de médecine de gronoble, 2007.
- [47] H. L. Orsted, « La peau: anatomie physiologie et cicatrisation des plaies », ed: RQSP, 2018.
- [48] Anne Aerts et al, «Soins de plaies,» ed ;Boeck, 1998.
- [49] «Climate-data,» (En ligne).  
: <https://fr.climate-data.org/afrique/algerie/tizi-ouzou/boudjima-520990/?amp=true>.
- [50] M. CHAABI, «Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : Euphorbia stenoclada Baill. (Euphorbiaceae), Anogeissus leiocarpus Guill. & Perr. (Combretaceae), Limoniastrum feei (Girard) Batt. (Plumbaginaceae),» these doctort , Louis pasteur, 2008.
- [51] K.H.C. Baser, Handbook of essential oils : science, technology and applications, 1er édition éd ;CRC Press, 2009.
- [52] B. Jean, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales., 4eme édition éd., Eds Tec&Doc, 2009.
- [53] S. E. Stein, «NIST Standard Reference Database 1A,», manuel user's, 2008.
- [54] P. Charpentier et al, «Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier,» le cahier des techniques de l'Inra, pp. 9-82, 2006.
- [55] EVANS et W. Charles, « Trease and Evan's Textbook of Pharmacognosy » 13e éd., vol. 13, London, 1989, p. 546.

- [56] M. Souhila, K. Mustapha et M. Nacéra, «Etude De L'extraction Des Composés Phénoliques De Différentes Parties De La Fleur D'artichaut (cynara Scolymus L,» Revue Nature et Technologie, 2013.
- [57] V. Singleton et J. A. Rossi, «Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents,» American journal of enology and viticulture, 1965.
- [58] M. Kiranmai et M. Ibrahim, «Comparison of total flavanoid content of Azadirachta indica root bark extracts prepared by different methods of extraction,» Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2011.
- [59] LABEX, «En savoir plus : Couplage CG/SM».
- [60] S. Otles et B. Yalcin, «Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle,» ScientificWorldJournal, 2012.
- [61] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier et C. Berset, «Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant,» Lebensm, Wiss-Technol, 1994.
- [62] F. Beni, « BACTÉRIOLOGIE MÉDICALE Technique usuelles » ELSEVIER , 2016.
- [63] R. Paris et H. Moyse, Précis de matière médicale, Collection de précis de pharmacie, 1965.
- [64] G. Bachir et al, «étude des composés phénolique et terpénique d'une plante médicinale traditionnelle,» thèse doctorat, Béjaia , 2017.
- [65] Y. Lemya et al, «Interactions entre l'huile essentielle de Thymus capitatus, Mentha piperita et Carthamus caeruleus, et de leur composants majoritaires: Effet du synergisme ou d'antagonisme sur l'activité antioxydante.,» thèse doctorat, Tlemcen, 2016.
- [66] B. Farida, «Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du Tumus communis et carthamus caeruleus,» thèse doctorat, Setif, 2009.
- [67] R. Deschepper, «Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie,», thèse doctorat, Marseille ; 2017.
- [68] «Pubchem,» (En ligne).  
: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-linolenate>.

[69] (En ligne):

[http://www.biolineaires.com/l\\_\\_huile\\_de\\_lin\\_biologique\\_la\\_plus\\_riche\\_en\\_omega/](http://www.biolineaires.com/l__huile_de_lin_biologique_la_plus_riche_en_omega/).

[70] Ko GA et al «Sageretia thea fruit extracts rich in methyl linoleate and methyl linolenate downregulate melanogenesis via the Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway,» Nutrition Research and Practice, 2018.

[71] Theodor.C et al, «Effects of ultraviolet-irradiated methyl linolenate on cell division and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*,» *elsevier*, p. 382-385, 1962.

[72] N. Frankel et al, «thermal and metal-catalyzed decomposition of methyl linolenate hydroperoxides,» *AOCS*, p. 322-327, 1987.

[73] «HSDB» (En lign).

: <https://toxnet.nlm.nih.gov>.

[74] W. Gabriel, « How stress selects for reversible phenotypic plasticity,» *Journal of Evolutionary Biology*, 2005.

[75] A. Lydia, «Evaluation des activités biologiques d'une plante médicainal local *Carthamus caeruleus* L,» thèse doctorat, Béjaia, 2017.

[76] A, MOROH, «Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains,» *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, p 334, 2008.

[77] M. Démarchez, «Biologie de la peau,», 2014.

[78] Reddy M et al, «Atténuation de la douleur au cours des procédures de renouvellement de pensement-document de concensus-,», rapport médical, 2003.

[79] D. G. MANN, «<https://www.cicatrisation.info/>,» 2006. (En ligne):

<https://www.cicatrisation.info/methodes-therapeutiques/aspects-medicaux/nutrition-dietetique.html>.

[80] D. E. DENES, «Plaies chroniques et antibiotiques,» *Service de Maladies Infectieuses*, 2014.

[81] P. J. Chavoïn, «Les brûlures,» 2012.

[82] «Médecine sorbonne université,» (En ligne).

: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/orthopedie/polyortho/POLY.Chp.19.html>.

[83] P. Blavy, «Identification des éléments clefs du métabolisme des lipides et de leurs régulateurs,» thèse doctorat, Bretagne, 2010.

[84] A. Baghiani, «Antioxidant and radical scavenging properties of Carthamus,» thèse doctorat, Bordj Bou Ariridj, 2010.

## **Chapitre 2**

# **Matériel et méthodes**

## **Chapitre 3**

# **Résultat et discussion**