



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

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de
l'Univers.
Département de Biologie

Laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et
activité biologique.

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En Biologie

Option : Biochimie appliquée

Par

M^{lle} Gheffour Kamila

Thème

**Etude phytochimique et évaluation des activités
biologiques des extraits d'*Echinops spinosus* de la région
de Tlemcen**

Soutenue le :30 juillet 2019

Devant le jury composé de :

<u>Président</u>	Pr. Lahfa Farid Boucif	<i>Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen</i>
<u>Directeur de thèse</u>	Pr. Boucherit Kebir	<i>Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen</i>
<u>Examineurs</u>	Pr. Bendimered Nassima	<i>Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen .</i>
	Pr. kahloula Khaled	<i>Université Dr. Tahar MOULAY de Saida</i>
	Dr. Azzi Rachid	<i>Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.</i>
	Dr.Seddiki Mohammed Lahbib	<i>Centre universitaire de Naama</i>

Année universitaire : 2018 / 2019

DEDICACES

A Allah

Le Tout miséricordieux, le très miséricordieux, louange à Toi qui m'a inculqué le courage pour mener à bien ce travail.

A notre très cher prophète Mohammad ﷺ

La Lumière du seigneur, meilleur que lui, ALLAH n'en a point créé. Elu d'Allah, il est le sceau des prophètes, que la paix et les bénédictions de Dieu soient sur lui.

A mes très chers parents

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut,

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, le respect, la reconnaissance, l'amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie infiniment, Que ce modeste travail soit le fruit de vos innombrables sacrifices, j'espère avoir répondu à vos espoirs, Que dieu le tout puissant vous procure santé, bonheur et longue vie.

A mon frère Chakib Arselane et ma sœur Rym Amel,

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour envers vous, puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. Merci pour vos encouragements et votre précieuse aide.

A toute ma famille.

A tous ceux qui m'aiment.

Rien n'est facile, rien n'est difficile c'est une question de réflexion ...

M^{elle} Gheffour kamila

Remerciements

*Au nom de dieu, le clément, le Miséricordieux, le très Miséricordieux,
Au nom de Muhammad, le Messager de Dieu - paix et bénédiction sur lui ainsi
que sa noble famille.*

*Je rends grâce à Allah qui m'a donné le courage, la force, la santé, la patience
et la foi afin de réaliser ce travail.*

J'exprime mes sincères remerciements et ma vive reconnaissance à Monsieur Boucherit Kebir, Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, la confiance qu'il m'a accordé, la liberté qu'il m'a laissé m'ont permis de réaliser ce projet. Monsieur, J'ai beaucoup appris de vos connaissances constructives et enrichissantes, vos encouragements sont avérés déterminants. Je vous remercie pour votre modestie.

Je tiens à remercier mon président Monsieur Lahfa Farid Boucif, professeur à l'université Abou Bekr belkaid Tlemcen pour sa générosité, pour sa rigueur scientifique ainsi que la qualité de son enseignement, qu'il soit assuré de ma respectueuse et sincère gratitude.

Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance à Mme Bendimred Nassima professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, nous vous sommes infiniment reconnaissants pour le grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Madame, Soyez assurée, de notre parfaite considération.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma respectueuse gratitude à Monsieur Azzi Rachid, Maitre de conférences classe A à l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, qu'il trouve ici le témoignage de ma grande gratitude. Mes remerciements vont également à Monsieur Kahloula

Khaled, professeur à l'Université Dr. Tahar MOULAY de Saida d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

J'exprime mes remerciements et ma gratitude à Mme Boucherit - Otmani Zahia Professeur à l'Université de Tlemcen.

Je vous remercie vivement pour : vos précieux conseils, vos orientations judicieuses, votre présence au laboratoire, votre écoute, votre exigence et votre rigueur scientifique.

Un remerciement spécial va à Monsieur Rahmoun Mohammed Nadjib, Maitre de conférences classe A à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen et directeur du laboratoire Antibiotiques, antifongiques, synthèse et activités biologiques pour son aide précieuse, son écoute, et ses conseils, Monsieur, je vous en suis infiniment reconnaissante.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Chaouche Mohammed Tarik Maitre de conférences classe A à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen pour ses conseils qu'il trouve ici ma sincère considération .

Mes remerciements vont également à madame Chaouche farah Maitre de conférences classe A à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen pour ses conseils qu'elle trouve ici mon profond respect.

Je souhaite également remercier M^{elle} Benariba Nabila Maitre de conférences classe A à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen pour ses qualités humaines, pour ses conseils et sa rigueur scientifique.

J'exprime aussi ma sincère gratitude à Mme Kazi tani zaket Maitre de conférences classe A à l'université Abou bekr belkaid Tlemcen pour son écoute, ses conseils, sa gentillesse, son aide, qu'elle trouve ici mes chaleureux remerciements.

J'exprime mes chaleureux remerciements à toute l'équipe du laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique « LapSab » dans lequel le travail a été mené .

Un remerciement spécial va à M^{elle} Belladgheme Rachida, et Mme Bénichou Ismahéne, nos ingénieurs de laboratoire pour leur disponibilité, leur aide constante et précieuse, leur écoute et surtout pour leurs qualités humaines qu'elles trouvent ici ma grande reconnaissance.

Table des matières

	Introduction générale	1
Première partie	Synthèse bibliographique	4
Deuxième partie	Matériel et méthodes	13
1.	Matériel	13
1.1.	Matériel végétal	13
1.2.	Solvants utilisés	13
1.3.	Microorganismes	14
1.4.	Globules rouges	14
2.	Méthodes	14
2.1.	Etude ethnobotanique	14
2.1.1.	Zone d'étude	14
2.1.2.	Description de la zone de récolte	15
2.2.	Etude phytochimique	15
2.2.1.	Préparation des extraits	15
2.2.2.	Tests phytochimiques	15
2.2.2.1.	Alcaloïdes	16
2.2.2.2.	Quinones libres (réaction de Bontrager)	16
2.2.2.3.	Coumarines	16
2.2.2.4.	Saponosides	16
2.2.2.5.	Tanins	16
2.2.2.6.	Composés réducteurs	16
2.2.2.7.	Amidon	17
2.2.2.8.	Flavonoïdes	17
2.2.3.	Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins	17
2.2.3.1.	Préparation de l' extrait pour les dosages	17
2.2.3.2.	Dosage des polyphénols totaux	17
2.2.3.3.	Dosage des flavonoïdes totaux,	18
2.2.3.4.	Dosage des tanins condensés	19

2.2.4.	Préparation des extraits végétaux	19
2.2.4.1	Préparation des extraits bruts	19
2.2.4.2	Extraction des flavonoïdes	19
2.2.4.3	Extraction des tanins.	20
2.2.4.4	Rendement en extraits	20
2.3.	Activités biologiques	20
2.3.1.	Evaluation de l'activité antioxydante	20
2.3.1.1	Méthode de réduction du fer : FRAP (<i>Ferric Ion Reducing Antioxidant Power</i>)	20
2.3.2.	Méthode de piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).	21
2.3.2.1.	Principe	21
2.3.2.2.	Mode opératoire	22
2.3.2.3.	Calcul des pourcentages d'inhibition	22
2.3.2.4.	Calculs des concentrations inhibitrices	22
2.4.	Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits.	22
2.4.1.	Préparation des disques.	23
2.4.2.	Evaluation de l'activité antibactérienne .	23
2.4.2.1.	Technique de diffusion sur gélose (méthode de disques).	23
2.4.2.2.	Méthode de détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) sur milieu liquide.	23
2.4.3.	Evaluation de l'activité antifongique des extraits	24
2.4.3.1.	Technique de diffusion sur gélose (méthode des disques)	24
2.4.3.2.	Technique de microdilution (Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).	24
2.5.	Evaluation de l'activité hémolytique	25

	2.5.1.	Préparation de PBS (Phosphate Buffered saline)	25
	2.5.2.	Préparation de la suspension érythrocytaire	25
	2.5.3.	Mesure de la fuite d'hémoglobine	25
3.		Analyse statistique	26
Troisième partie		Résultats et discussion	27
1.		Enquête ethnobotanique	27
1.1.		Connaissance sur la plante	27
1.2.		Tranche d'âge	27
1.3.		Sexe d'appartenance	28
1.4.		Niveau d'études	28
1.5.		Domaine d'indication thérapeutique	28
1.6.		Parties utilisées	29
1.7.		Mode de préparation	30
1.8.		L'analyse statistique	30
2.		Criblage phytochimique	31
2.1.		Tests phytochimiques	31
2.2.		Rendement en extraits	33
3.		Dosage des polyphénols totaux ,flavonoïdes et tanins.	34
3.1.		Dosage des polyphénols	34
3.2.		Dosage des flavonoïdes	36
3.3.		Dosage des tanins	38
4.		Activités biologiques	42
4.1.		Activité antioxydante	42
4.1.1.		Réduction du fer (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>) FRAP.	43
4.1.2.		Piégeage du radical libre DPPH.	47
4.2.		Evaluation de l'activité antimicrobienne	49
4.2.1.		Evaluation de l'activité antibactérienne	49
4.2.1.1.		Diffusion sur milieu solide (méthode des disques).	49
4.2.1.2.		Technique de microdilution (méthode de	52

	CMI).	
4.3.	Evaluation de l'activité antifongique	56
4.3.1.	Méthode de diffusion sur milieu solide (méthode de disque).	56
4.3.2.	Détermination des CMI par la méthode de microdilution.	58
4.3.3.	Corrélation entre les souches fongiques (CMI)	61
4.3.4.	Comparaison entre les deux méthodes de l'activité antifongique par test de corrélation.	61
4.4.	L'évaluation de l'activité anti-hémolytique.	63
Quatrième partie	Conclusion générale	73
Cinquième partie	Références bibliographiques	76
	Annexe	
	Manuel de préparation	

Liste des Tableaux

Tableau N°1 :	Microorganismes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.	13
Tableau N°2 :	Situation géographique de la station de récolte.	15
Tableau N°3 :	Concentrations d'extraits des deux parties de la plante <i>E.spinosus</i>	24
Tableau N°4 :	Caractérisation des groupes chimiques dans les extraits d' <i>Echinops spinosus</i> .	33
Tableau N°5 :	Rendement en extraits de la plante <i>Echinops spinosus</i>	34
Tableau N°6 :	Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins de la plante <i>Echinops spinosus</i> .	41
Tableau N°7 :	Valeurs des IC50(en µg/mL) des extraits des deux parties de la plante <i>Echinops spinosus</i>	49
Tableau N°8 :	Zone d'inhibition des différents extraits de la plante <i>Echinops spinosus</i>	52
Tableau N°9 :	Evaluation de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion sur milieu liquide des deux parties de la plante <i>Echinops spinosus</i> .	55
Tableau N°10 :	Concentration minimales bactéricides des différents extraits de la plante <i>Echinops spinosus</i> .	56
Tableau N°11 :	Diamètre des zones d'inhibitions fongiques de la plante <i>Echinops spinosus</i> .	58
Tableau N°12 :	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides(CMF) des extraits d' <i>Echinops spinosus</i>	61

Liste des figures

Figure N°1 :	Les différentes parties D' <i>Echinops spinosus</i> : (a) Fruit, (b) feuilles et tiges, (c) racines.	11
Figure N°2 :	Carte géographique de Tlemcen.	15
Figure N°3 :	Carte géographique d'Algérie.	15
Figure N°4 :	Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH	22
Figure N°5 :	Répartition de la fréquence d'utilisation d' <i>Echinops spinosus</i> par tranche d'âge.	27
Figure N°6 :	Répartition des différentes utilisations de la plante <i>Echinops spinosus</i> .	29
Figure N°7 :	Corrélation entre la fréquence d'âge et la connaissance de la plante <i>E.spinossus</i> .	31
Figure N°8 :	Corrélation entre la fréquence d'âge,le sexe,et la connaissance de la plante <i>E.spinossus</i>	31
Figure N°9 :	Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux.	35
Figure N°10 :	Teneur en polyphénols des deux parties de la plante <i>E.spinossus</i>	36
Figure N°11 :	Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.	37
Figure N°12 :	Teneur en flavonoïdes des deux parties de la plante <i>E.spinossus</i>	37
Figure N°13 :	Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins.	39
Figure N°14 :	Teneur en tanins des deux parties de la plante <i>Echinops spinossus</i> .	39
Figure N°15 :	Corrélation entre la teneur en polyphénols et les flavonoides pour l'extrait aqueux.	41
Figure N°16 :	Corrélation entre la teneur en polyphénols et les flavonoides pour l'extrait hydro-méthanolique.	42
Figure N°17 :	Corrélation entre la teneur en polyphénols et les tanins pour l'extrait aqueux.	42
Figure N°18 :	Corrélation entre la teneur en polyphénols et les tanins pour l'extrait hydro-méthanolique.	42
Figure N°19:	Courbe d'etalonnage de la BHA et l'acide ascorbique.	44
Figure N°20 :	Pouvoir réducteur des différents extraits de la plante <i>Echinops spinossus</i> .	45
Figure N°21 :	Pouvoir réducteur de la fraction n-buthanol des tanins de la partie aérienne et des racines de la plante <i>E.spinossus</i>	46
Figure N°22 :	Pouvoir réducteur des extraits de la partie aérienne d' <i>Echinops spinossus</i> .	46

Figure N°23 :	Pouvoir réducteur des extraits des racines d' <i>Echinops spinosus</i> .	47
Figure N°24 :	Comparaison des IC ₅₀ des deux parties de la plante <i>E.spinusus</i>	49
Figure N°25 :	Corrélation entre le diamètre d'inhibition et les CMI pour la souche <i>Candida albicans</i> 10231.	61
Figure N°26 :	Corrélation entre le diamètre d'inhibition et les CMI pour la souche <i>Candida albicans</i> IP444.	62
Figure N°27 :	Corrélation entre le diamètre d'inhibition et les CMI pour la souche <i>Candida albicans</i> 26790.	62
Figure N°28 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction n-buthanol des flavonoïdes .	65
Figure N°29 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction acétate d'éthyle des tanins de la partie aérienne.	66
Figure N°30 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction n-buthanol des tanins de la partie aérienne.	66
Figure N°31 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction acétate d'éthyle des tanins des racines.	67
Figure N°32 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne.	67
Figure N°33 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction acétate d'éthyle des flavonoïdes des racines.	68
Figure N°34 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction n-buthanol des flavonoïdes de la partie aérienne.	68
Figure N°35 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction n-buthanol des flavonoïdes des racines.	69
Figure N°36 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de l'extrait aqueux (sous reflux) de la partie aérienne.	69
Figure N°37 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de l'extrait aqueux des racines.	70
Histogramme 1 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps des différents extraits à l'IC ₅₀ de la partie aérienne de la plante <i>E.spinusus</i>	70
Histogramme 2 :	pourcentage d'hémolyse en fonction du temps des différents extraits à l'IC ₅₀ de la partie aérienne de la plante <i>E.spinusus</i>	71

Histogramme 3 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps des différents extraits à 71
40fois l'IC50 de la partie aérienne de la plante *E.spinosus*

Histogramme 4 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps des différents extraits à 72
40fois l'IC50 des racines de la plante *E.spinosus*

Liste des abréviations

AlCl₃ 6 H₂O : Chlorure d'aluminium hydraté.

AmB: Amphotéricine B.

ATCC: American type collection culture

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute.*

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

DMSO: Dimethyl sulfoxyde.

DPPH: 2, 2-Diphényl-1-picryl hydrazyl.

EUCAST: *European Committee for Antimicrobial susceptibility Testing.*

FeCl₃: Trichlorure de fer.

FRAP: Ferric ion Reducing Antioxydant Power.

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

HCl: Acide chlorhydrique.

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%.

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

MOPS: Acide morpholinopropanesulfonique

NaCl: Chlorure de sodium

NaNO₂: Nitrite de Sodium

NCCLS: National Clinical Committee Laboratory Standards.

NaOH: Hydroxyde de sodium

Na₂SO₄: Sulfate de sodium anhydre

NH₄OH: Hydroxyde d'ammonium.

RPMI: Roswell Park Memorial Institut.

UFC: Unité Formant Colonies.

UV: Ultra-violet.

Introduction générale

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse .

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, les tanins, les alcaloïdes, les flavonoïdes , les terpènes ...etc **[(Barbouche et coll.,2001),(Krief, 2003),(Bouzouita et coll., 2008)].**

Ce sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante et sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Ces composés procurent des propriétés curatives appréciables dont aucune chimie synthétique et combinatoire ne peut nous offrir **(Epifano et coll., 2007).**

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Echinops*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides.

A l'instar des autres régions d'Algérie, Tlemcen possède un patrimoine très riche en plantes vertueuses, 275 espèces de plantes médicinales appartenant à différentes familles ont été recensées et identifiées **(Loukkas, 2006).**

Le recours aux plantes médicinales aux propriétés antioxydantes constitue un des plus intéressants axes de recherche à explorer, renfermant des substances antioxydantes **[(Zheng et coll., 2001) ; (Anderson et coll., 2001)].**

Depuis, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices qui ont une capacité antioxydante non négligeable, parfois même plus élevée que celle de certains fruits et légumes et qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant **(Mata et coll., 2007).**

Ces produits sont classés en plusieurs composants chimiques dont les plus répandus sont les polyphénols, les alcaloïdes, et les terpènes **[(Cuendet, 1999) ; (Vermeris, 2006)].**

Les composés phénoliques font l'objet de nombreuses recherches. Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires [(El-demerdash et coll., 2005) ; (Gehin et coll., 2006) ; (Bouayad et coll., 2007) ; (Sivapriya et coll., 2007)].

L'évaluation des propriétés phyto-thérapeutiques demeure une tâche préoccupante et utile en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connues dans la médecine.

L'utilisation des plantes pour se soigner date de la préhistoire et tous les peuples sur tous les continents ont cette vieille tradition. Malgré les efforts des chimistes qui synthétisent de nouvelles molécules, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes.

Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale. Il est certain que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes et que, un à trois antibiotiques sont mis sur le marché chaque année, mais il est aussi évident que les agents antimicrobiens d'origine végétale ont leur place dans l'arsenal de médicaments prescrits par les cliniciens et à juste titre. Chaque antibiotique a une durée de vie effective limitée au bout de laquelle les microorganismes développent des résistances. De plus, dans les pays en développement, ces produits ne sont pas toujours disponibles, ou, lorsqu'ils le sont, ils coûtent trop cher pour les populations, ainsi plus de 80 % de ces populations ont recours exclusif aux plantes médicinales pour se soigner [(Kirby et coll.,1996) ; (Cowan et coll.,1999) ; (Newman et coll., 2000) ; (Hostettman et coll.,2002)].

Cette matière vivante est efficace pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs. En vue d'assurer la conservation et la disponibilité de ces plantes pour l'avenir, la réglementation de leur exploitation et de leur exportation est essentielle, tout comme la coopération et la coordination au niveau international (Jayasuriya DC et coll., 2002).

Dans les années récentes, des études sont réalisées pour avoir un rôle bénéficiaire des extraits de plantes bioactives surtout de la famille des astéracées. Cette étude permanente fait penser à leurs efficacités in vitro.

Utilisées fréquemment comme antibiotiques vis-à-vis une variété des microorganismes disponible et centrée au nord-ouest de l'Afrique mais aussi trouvée dans les pays méditerranéens surtout l'Algérie [(Chaouki et coll.,2013);(K. Side Larbi et coll., 2015)].

E. spinosus ou l'oursin épineux est une plante herbacée, vivace de 30 à 60 cm de hauteur, qui peuple les terres non cultivées, les terrains caillouteux et les zones côtières, abondante dans les sols arides d'Afrique du nord, d'Afrique tropicale, au Maroc (Allaoui, 2002) et en Algérie, elle se répartit du sud de la région méditerranéenne jusqu'au Sahara. Elle est assez commune dans les zones arides, sur sols caillouteux (Benaradj, A. et coll., 2010).

Pour cela notre laboratoire et principalement notre équipe de recherche s'intéresse de très près à la phytochimie et aux activités biologiques (antimicrobiennes et antioxydantes) des extraits végétaux des plantes médicinales dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels [(Mergheche Djamil, 2014); (Rahmoun nadjib,2013); (Bentabet nesrine,2014)].

Le choix de cette espèce a été guidé d'une part par les indications d'usage traditionnel, et d'autre part par le fait qu'*Echinops spinosus* n'a pas fait l'objet d'investigations chimiques et biologiques. Notre travail est réalisé en trois parties :

- Dans la première partie, une synthèse bibliographique est menée sur les plantes médicinales, les métabolites secondaires et leurs activités biologiques ainsi que sur l'espèce sélectionnée *Echinops spinosus* qui appartient à la famille des astéracées.
- Dans la deuxième partie le travail est expérimental, qui consiste en la réalisation d'une enquête ethnobotanique, le criblage phytochimique qui mène à faire des extractions, ainsi que le dosage de principales classes phénoliques, phénols totaux, flavonoïdes et tanins.

L'évaluation *in vitro* des activités biologiques correspondantes aux feuilles –tiges et racines de la plante *E.spinosa* notamment l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et celle de la réduction de fer (FRAP), l'effet antibactérien et antifongique des différents extraits de la plante en utilisant les souches de référence disponible au laboratoire ainsi l'évaluation de l'activité anti-hémolytique de quelques extraits vis-à-vis les érythrocytes à différentes concentrations en suivant une cinétique de fuite d'hémoglobine pendant 120 min.

Synthèse bibliographique

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme, le diabète, l'hypertension ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins nocifs pour l'organisme **(ISERIN, 2001)**.

Plus de 80% de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour se soigner en raison de leur efficacité, et l'inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne **(Lehmann, 2013)**.

Jusqu'en 2004, on a estimé que près de 75% de la population africaine ont toujours recours aux plantes pour se soigner. Ainsi ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce **(KAR, 2007)**.

La région méditerranéenne, en dépit de sa localisation dans une zone tempérée, possède des zones biogéographiques parmi les plus rares au monde et une biodiversité importante représentée par près de 25.000 espèces, ce qui correspond à 9,2% des espèces identifiées dans le monde sur un territoire représentant seulement 1,5% de la surface terrestre **[(Emregul, 2003) ; (Lebrini, 2005)]**.

De plus, près de 6377 espèces sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent pour 90% au traitement médicale **(Diallo, 2005)**.

De par sa situation géographique et de son climatique, l'Algérie dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques **(El Ouali, 2010)**.

Ce potentiel végétal comportant des milliers d'espèces constitue un axe de recherche très prometteur.

A l'instar des autres régions d'Algérie, Tlemcen possède un patrimoine très riche en plantes vertueuses. En effet, plusieurs espèces de plantes médicinales appartenant à différentes familles ont été recensées et identifiées **(Loukkas, 2006)**. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives avec moins d'effets secondaires à partir des plantes et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques constitue un objectif prioritaire pour la recherche scientifique et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Les plantes médicinales fournissent des composés naturels qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes), provoquant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) et inhibiteurs des bêta-lactamases (alkyls gallates) **(Affif Chaouch, 2015)**.

Les Astéracées (Composées) constituent l'une des grandes familles qui contient environ un dixième du nombre total des plantes à fleurs, comprenant environ 950 genres et plus de 20000 espèces et se caractérisent par de petites fleurs disposées dans une tête ressemblant à une fleur unique **(Rendle, 1979)**.

Ce sont des plantes dicotylédones qui ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Les fruits sont des akènes.

Les études réalisées sur des plantes médicinales de la famille des astéracées ont montré que ces dernières renferment des métabolites secondaires doués d'activités antioxydante, antibactérienne et antifongique, car ils sont capables d'inhiber la croissance bactérienne en agissant sur des cibles cellulaires différentes de celles visées par les antibiotiques **[(Agban et coll., 2013) ; (Tatiana Lopez et coll., 2016) ; (Boussoussa et coll., 2016) ; (Ramdane F., 2018)]**.

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés, on trouve les métabolites secondaires qui sont énormément utilisés en thérapeutique **(Fabricant et coll., 2001)**.

De nombreux travaux ont montré que ces métabolites secondaires présentent un potentiel important en tant qu'agents antibactériens, antifongiques, antioxydants, anticancéreux et antidiabétiques **[(Boudjouref M., 2011) ; (H. talbi et coll., 2014) ; (Ghedadba et coll., 2015)]**.

Actuellement, les recherches s'orientent vers le développement d'une nouvelle génération de substances antimicrobiennes et antioxydantes d'origine végétale pour

substituer celles issues de la synthèse chimique afin de minimiser les effets secondaires des médicaments.

De même, un certain nombre de secteurs industriels se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces produits dans leurs formulations [(Taviano et coll., 2013) ; (Kanga Yao et coll., 2016)].

Le traitement par les antibiotiques présente un grand intérêt, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multi-résistance microbienne. Par ailleurs, la maîtrise des infections devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (Pfaller, 2012).

Parmi les stratégies proposées pour pallier à la multi-résistance des microorganismes est de prolonger la durée de vie des molécules existantes sur le marché, essentiellement par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des germes en cause, mais aussi, des mécanismes d'action des antibiotiques à l'échelle moléculaire, tout cela accompagné d'une rationalisation de la prescription et l'utilisation de ces médicaments (Meridith et coll., 2015) ,(Boris legba et coll., 2017)] .

De même, la dysfonction antioxydante due au déséquilibre de la balance antioxydant/Pro-oxydant provoquant le stress oxydatif peut être manipulée par la supplémentation en antioxydants exogènes alimentaires, soit naturels ou de synthèse. Cependant, l'utilisation de ces derniers est restreinte en raison des effets indésirables sur la santé humaine.

Récemment, Il y a eu une préoccupation concernant les effets destinés à la lutte contre le stress oxydatif et les infections microbiennes. [(Thierry Christiaens, 2016), (kouassi et coll.,2018)].

Les travaux menés en 2011 par l'équipe de Fraise sur 18 espèces de cette famille ont montré que la capacité totale du pouvoir antioxydant varie d'une plante à l'autre et qui dépasse 11% pour *Hieracium pilosella*.

Des études *in vitro* ont montré que les substances bioactives provenant de diverses espèces végétales appartenant à cette famille, présentent un spectre large d'activité sur une gamme de flore fongique ou sont inclus les champignons toxigènes [(Mohammedi Zohra., 2013) ; (A. Sharifzadeh et coll., 2016)].

De plus, Beaucoup de recherches se sont concentrées sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que *Tridax procumbens*, *Chromolaena Odorata*, *Artemisia campestris*, ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus [(Jürgen et coll., 2009) ; (Amégninou agban et coll., 2013) ; (Bammou M., et coll., 2015) ; (Affif Chaouche, 2015)].

Certains, comme les terpènes, donnent aux plantes leurs odeurs, d'autres (quinones et des tanins) sont responsables de pigment végétal [(Dixon et coll., 2001) ; (Affif Chaouche, 2015)].

Il a été rapporté que les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes et en tanins possèdent une activité antimicrobienne. Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés comme de très bons agents antimicrobiens [(Harborne et Williams., 2000) ; (Tim et coll., 2005)].

De nombreuses études ont rapporté les activités antimicrobiennes des flavonoïdes [(Bruneton, 2009) ; (Akroum, 2010)].

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

Les tanins ont eu depuis une décennie un large spectre et une forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, dû à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia, 2012).

Cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industries pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (Huang et coll., 2005). Il faut toutefois noter que plusieurs plantes appartenant à la famille des astéracées sont étudiées pour leur effet antimicrobien.

Artemisia campestris par exemple (l'armoise rouge) est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaires.

Naili et ses collaborateurs en 2010 ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris*, ils ont découvert que l'activité de cet extrait est plus efficace contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) que les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*).

En 2007, Kyeong et ses collaborateurs montrent que l'extrait aqueux des racines d'*Artemisia campestris* possède un potentiel antifongique sur des champignons de mycorhize, cependant, ces composés chimiques peuvent conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses par voie générale, il apparaît donc indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir hémolytique pour une adaptation rationnelle de la tradithérapie. De même l'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait est nécessaire pour situer les limites de tolérance de la plante [(Derbré, 2016) ; (Z. Selih et coll., 2016)].

La toxicité est une notion relative et varie en fonction de la partie de la plante étant extraite ou mangée et les quantités prises. Cependant, il est essentiel que les composés de l'extrait soient testés pour leur toxicité, bien que la plupart des tests ne mesurent actuellement que la toxicité aiguë.

Jusqu'alors, l'étude de l'activité anti-hémolytique des plantes présente un grand intérêt et devient un sujet d'actualité surtout en ce qui concerne le matériau naturel dans l'intérêt de favoriser le développement d'antibiotiques à base de produits naturels.

La conception et la réalisation de notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de ressources végétales par des recherches scientifiques afin d'exploiter cette richesse naturelle.

La recherche botanique, la biochimie, la pharmacologie, la pharmacie, la pharmacognosie, la chimie médicinale, la chimie organique et la toxicologie sont importants pour entreprendre cette recherche [(Kinghorn, 2001) ; (Butler, 2004) ; (Koehn et Carter, 2005) ; (Jones et coll., 2006)].

Le laboratoire antibiotiques, antifongiques, physico-chimie, synthèse et activités biologiques LapSab a engagé depuis plusieurs années une recherche de nouvelles

molécules bioactives présentant des activités biologiques, à partir de plantes locales dont *Citrullus colocynthis*, *Punica granatum*, *Berberis vulgaris*, *Echium vulgare*, *Fredolia aretioides*.

Depuis, les activités biologiques sont évaluées dans le laboratoire LapSab, on peut citer : l'activité étudiée chez les rats Wistar sur des cellules isolées et chez les rats normaux et rendus diabétiques par la streptozotocine [(Hamza Chérif et Chenini, 2006) ; (Benariba et coll., 2009) ; (Belkacem et coll., 2011)].

L'activité antioxydante *in vitro* (Benariba et coll., 2012) et antimicrobienne *in vitro* sur des souches bactériennes et des levures [(Azzi et Boumellah, 2002) ; (Adida, 2014)], l'activité antimicrobienne des extraits d'henné et de quelques naphthoquinones synthétiques et ses dérivés (Rahmoun et coll., 2013), l'évaluation de l'activité antifongique et antibactérienne et de la cytotoxicité des conservateurs (Halla et coll., 2014), composition chimique, activités antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles d' *Eryngium tricuspdatum* L (Mergheche et coll., 2014), Etude phytochimique des feuilles et des racines de *Fredolia aretioides* (Bentabet et coll., 2014).

Le travail entrepris dans cette thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'*Echinops spinosus* appartenant à la famille des Astéracées qui sont des plantes dicotylédones, herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille.

Au préalable, un travail de terrain est effectué dont le but consiste à mener une enquête ethnobotanique auprès des tradithérapeutes (ou tradipraticiens), des herboristes et des individus vivant en contact avec les plantes médicinales. Il s'agit de mettre en cohérence les informations relatives sur l'usage de ces plantes en médecine traditionnelle et de créer une synergie d'activité avec les composés chimiques actifs utilisés en médecine conventionnelle. La connaissance de l'enquête ethnobotanique nous permettra d'édifier les rôles potentiels des plantes médicinales dans la pharmacopée traditionnelle. Cette enquête met en exergue une pratique ancestrale très efficace pour soigner les maladies.

Le genre *Echinops* contient approximativement 120 espèces (Bobrov, 1997); (Garcia-Jacas, 2007)], distribuées un peu partout dans le monde [(Jäger, 2016 ; (Garnatje et coll., 2004)]. Elle s'étend tout au long de la Turquie (Garcia-Jacas et

coll., 2002), la France (**Rodillon, 1920**), et dans certains pays africains de la région méditerranéenne comme le Maroc et l'Algérie **[(Alaoui jamali et coll., 2002);(Guide illustré de la flore algérienne, 2009)] ..**

Echinops vient du grec *echinos* qui se traduit par hérisson ou oursin signifiant aspect : le nom fait allusion à l'inflorescence en forme de hérisson. Le nom *spinosus* fait référence aux nombreuses épines que porte la plante.

La tige est ramifiée par un capitule sphérique en forme de boule de couleur bleue (**Bernard Boullard, 2001**). (**Figure N°1**).

Les feuilles caulinaires, sessiles, ovales, pennatiséqués, mesurant de 5 à 15cm et leurs segments sont découpées et terminées par des aiguillons.

Les inflorescences à tête globuleuses, sphériques d'un diamètre de 4 à 6 cm ponctuées de bleu sont constituées de fleurs.

Les fruits sont des akènes turbinés à couronne raide et lacinée **[(Forey, 1998) ; Bernard Boullard, 2001)].**

Nommée localement Tassekra, cette espèce végétale est très répandue en médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques.



(a)



(b)



(c)

Figure N°1 : les différentes parties d'*Echinops spinosus* : (a) Fruit, (b) feuilles et tiges, (c) racines.

Ses feuilles ont déjà été utilisées en médecine locale comme un anti-inflammatoire pour traiter les affections hémorroïdaires (**Rodillon, 1920**). Employée au Maroc sous le nom de Shawk el gimal ou Tassekra, cette espèce est réputée pour son pouvoir d'améliorer le système circulatoire (**Renaud et Colin, 1934**), et pour le traitement des verrues (**Alaoui et coll., 2002**).

Ses racines en décoction sont utilisées contre les douleurs stomacales, les infections urinaires et administrées aux femmes avant l'accouchement pour accélérer la délivrance et après l'accouchement pour expulser le placenta (**Lahssissene et coll., 2009**). Cette espèce végétale riche en echinopsine stimulant le système nerveux est appréciée comme vaso-constricteur veineux et contribue donc à la circulation sanguine, grâce à la présence de dérivés de l'apigénol et du chrysoériol notamment (**Bernard Boullard, 2001**).

Au Maroc, d'après **Bellakhdar en 1997**, elle est également recommandée en médecine traditionnelle pour soigner l'asthénie, le diabète. Quant à la plante pulvérisée, on l'a dit dépurative, diurétique et efficace en cas d'affections hépatiques. L'utilisation traditionnelle de cette plante par la population a fait l'objet de quelques travaux scientifiques.

En 1999, Rimbau et ses collaborateurs ont révélé que les racines d'*E. spinosus* ont une bonne activité anti-inflammatoire dans les extraits aqueux, chloroformiques et éthanoliques. De plus, une étude faite par **Alaoui et ses collaborateurs en 2002** sur la même partie de plante. (Les fractions d'extraits acétate d'éthyle et aqueuses) a montré une activité anticancéreuse intéressante contre le cancer du sein.

Enfin, une récente étude effectuée au sein du laboratoire de chimie des éléments organiques **en 2013 par Wenbo Xu et ses collaborateurs** sur la synthèse chimique totale des échinopines A et B qui sont de nouveaux terpénoïdes isolés à partir des racines d'*Echinops spinosus* et utilisés contre le cancer du sein.

Il est à noter que la quasi-totalité des travaux scientifiques s'intéressaient à l'utilisation traditionnelle de cette plante et se fondent dans un axe physiologique entre autre l'activité anti-inflammatoire et anticancéreuse mais aucune activité antioxydante, antimicrobienne et anti-hémolytique n'a été effectuée, vu la difficulté de récolte de cette plante qui réside dans la profondeur de ses racines dans le sol mais aussi l'aspect épineux de ses feuilles et tiges.

C'est pour ces raisons, que nous avons jugé intéressant d'étudier l'effet biologique de plusieurs extraits en utilisant plusieurs solvants de polarité différente.

Ce travail réalisé au laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » s'est déroulé en trois grandes parties: Tout d'abord, nous avons effectué une enquête ethnobotanique auprès de la population de Tlemcen. Ensuite, nous avons réalisé une étude phytochimique qui comporte les tests phytochimiques, le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, et des tanins. En conclusion, nous avons mis en évidence l'activité antioxydante, antibactérienne et antifongique et anti-hémolytique des extraits bruts et spécifiques.

Matériel et méthodes

Ce travail est effectué au laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » (LapSab), Faculté SNV/STU. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Notre travail a porté sur *Echinops spinosus*, plante vivace appartenant à la famille des Astéracées. Cette espèce végétale est récoltée en mars 2013 dans la région d'Amieur qui se situe à 18 km du nord-est de Tlemcen (Algérie). La partie aérienne (tiges et feuilles) et les racines de la plante sont séchées, broyées et conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et de l'humidité.

1.2. Microorganismes

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, nous avons utilisé trois souches de levures (*Candida albicans*) et huit souches de bactéries dont quatre à Gram positif (+) et quatre à Gram négatif (-) (**Tableau N°1**). Les souches proviennent toutes du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique.

Tableau N°1 : Microorganismes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Levures	<i>Candida albicans</i> ATCC10231
	<i>Candida albicans</i> IP444
	<i>Candida albicans</i> ATCC 26790
Bactéries Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Bactéries Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC13311
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047

1.3. Globules rouges

Le globule rouge représente le modèle universel des cellules animales. Du sang frais est utilisé pour évaluer l'activité hémolytique.

2. Méthodes

2.1. Etude ethnobotanique

Une enquête ethnobotanique prospective est réalisée dans la région de Tlemcen auprès des herboristes, guérisseurs, vendeurs de plantes, artisans teinturiers et détenteurs du savoir traditionnel.

250 personnes ont été interviewées. Un questionnaire ouvert leur a été soumis (**Annexe 1**). Le temps soumis pour chaque interviewé était d'un quart d'heure. Cette enquête nous a permis de collecter des renseignements précis, pour chaque région de Tlemcen, sur l'emploi et les usages de cette plante.

2.1.1. Zone d'étude

La wilaya de Tlemcen se situe sur le littoral nord-ouest de l'Algérie et dispose d'une superficie égale à 9017km². Elle est limitée par :

- La mer méditerranée au nord.
- La wilaya d'Ain Témouchent à l'est.
- La wilaya de Sidi Bel Abbès au sud-est.
- La wilaya de Naâma au sud et le Maroc à l'ouest.

La population totale de la wilaya de Tlemcen est de 949 135 habitants, soit une densité de 106,6 habitants par Km². Cette population se répartie sur 20 Daïras et 53 communes (**ANDI, 2013**). (**figure N°2**), (**figure N°3**).

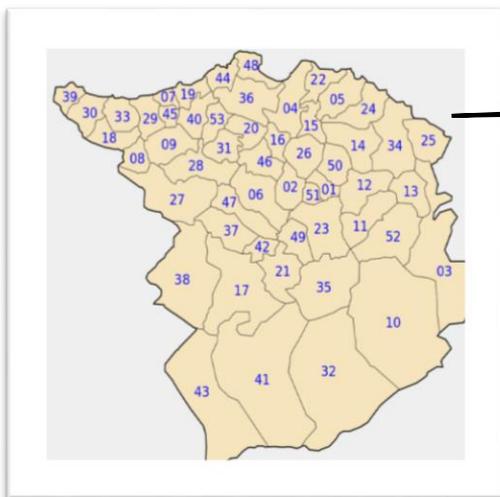


Figure N°2: Carte géographique Tlemcen

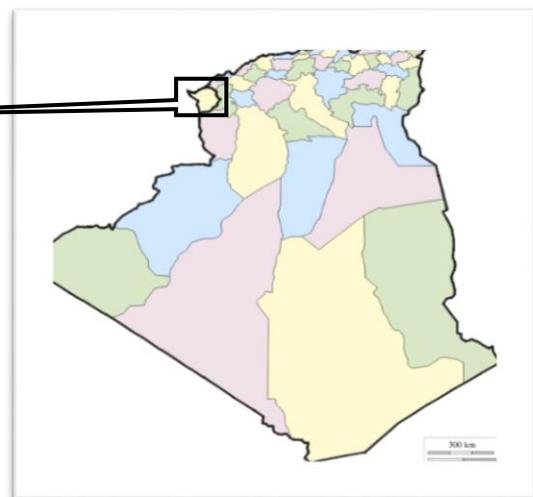


Figure N°3: Carte géographique d'Algérie

2.1.2. Description de la zone de récolte

Il s'agit d'une étude transversale descriptive réalisée dans la région d'Amieur commune de Chetouane de la wilaya de Tlemcen entre 2013 et 2015.

Les paramètres géographiques de cette région sont présentés dans le tableau N°2.

Tableau N° 2 : Situation géographique de la station de récolte.

<i>Région</i>	<i>Latitude</i>	<i>Longitude</i>
Amieur	35°2'6.56"	-1°14'20.38"

2.2. Etude phytochimique

2.2.1. Préparation des extraits

5g de matière végétale de chaque partie de la plante (feuilles+ tiges et racines) sont mises en présence de 100 mL de chaque solvant (Eau, éthanol, éther di-éthylique). Le mélange est porté à chaud sous reflux et sous agitation continue pendant 30min. Ensuite, le mélange est filtré et les trois extraits sont soumis aux tests phytochimiques.

2.2.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont réalisés à partir des extraits préparés au préalable afin de caractériser la présence des métabolites secondaires. Ces derniers sont basés sur des essais de solubilité, de coloration, de précipitation en se référant aux techniques décrites par **Bruneton (1999), Karumi et coll., 2004 et Oloyede (2005)**.

2.2.2.1. Alcaloïdes (Paris et Moyse, 1969)

Les alcaloïdes sont caractérisés par les réactifs de Mayer et Wagner. 6mL de chaque extrait. Le résidu est repris par 5 mL d'HCL 2N.

Dans des tubes à essai contenant 1mL du filtrat, 5 gouttes de réactif de Mayer sont ajoutées dans le premier tube et 5 gouttes du réactif de Wagner dans le second. L'apparition d'un précipité brun ou blanc d'une turbidité indique la présence des alcaloïdes.

2.2.2.2. Quinones libres (réaction de Bontrager) [(Dahou et coll.,2003) ;(Oloyede, 2005)].

Quelques gouttes de NaOH 0,1 N sont ajoutées à 5mL de chaque extrait. La présence des quinones libres est confirmée lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

2.2.2.3. Coumarines (Bruneton, 1999).

5mL des trois extraits (extrait étherique, éthanolique et aqueux) sont évaporés à sec et le résidu est repris dans l'eau chaude. Un volume de cette phase aqueuse est additionné d'une solution d'ammoniaque "NH₄OH" à 10% et un autre volume est gardé comme témoin. L'apparition de fluorescence après observation sous UV indique la présence de coumarines.

2.2.2.4. Saponosides (Dohou et coll., 2003).

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant 10mL d'eau distillée à 2mL de chaque extrait pour chacune des deux parties (feuilles+ tiges et racines), puis la solution est agitée pendant 1 minute. La présence des saponosides est confirmée par l'apparition d'une mousse qui persiste durant 15min.

- S'il n'y a pas de mousse, le test est dit négatif (-).
- Si la mousse est de 1 cm d'épaisseur, le test est faiblement positif (+).
- Si la mousse est entre 1 et 2 cm, le test est positif (++).
- Si la mousse est supérieur à 2 cm, le test est fortement positif (+++).

2.2.2.5. Tanins (Trease et Evans, 1987)

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 mL de chaque extrait, 1mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ diluée à 1%. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence de tanins.

2.2.2.6. Composés réducteurs

La détection des sucres réducteurs consiste à traiter 1mL de l'extrait avec 2mL d'eau distillée et 2mL de liqueur de Fehling (1 mL de la liqueur de Fehling A + 1mL de la liqueur de Fehling B) puis chauffer les tubes au bain marie jusqu'à ébullition. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.

2.2.2.7. Amidon (Dohou et coll., 2003)

5mL de la solution à tester sont chauffés avec 10mL d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à ébullition. Le réactif d'amidon est ensuite ajouté. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

2.2.2.8. Flavonoïdes (Ciulel, 1982)

On prend 2mL des trois extraits de chacune des deux parties (feuilles tiges et racines) et on ajoute quelques gouttes d'HCl 37% et 0,5 g de tournure de magnésium Mg²⁺. Si le test est positif, il y'a apparition d'une couleur rose ou rouge qui caractérise les flavonoïdes.

2.2.3. Dosage des polyphénols, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés

2.2.3.1. Préparation de l'extrait pour les dosages

L'extrait eau/méthanol (macération 48 heures et évaporation à sec) est solubilisé dans le méthanol à une concentration de 10 mg/mL pour le dosage des flavonoïdes totaux et à une concentration de 1 mg/mL pour celui des polyphénols totaux.

2.2.3.2. Dosage des polyphénols totaux [(Vermeris et Nicholson, 2006) ; (Boizot et Charpentier, 2006)].

La méthode est celle utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 700 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présentes dans les extraits végétaux.

0,1 mL de l'échantillon est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2%. Après agitation au vortex et repos pendant 5 minutes, 100 μ L de réactif Folin Ciocalteu à 0,2N sont ensuite additionnés, La lecture est faite à 700 nm contre un blanc après 30 minutes d'incubation à température ambiante.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 grammes de matière végétale sèche (MS). Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à des concentrations finales allant de 0,1 à 1 mg/mL.

Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique /100 g de matière végétale sèche mg EAG/100g MS calculé selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de polyphénols} = a .f/b$$

a : Concentration en polyphénols en mg/mL déterminée à partir de la courbe d'étalon.

f : Facteur de dilution (f=22).

b : Concentration initiale de l'extrait (1mg/mL).

2.2.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux (Ardestani et Yazdanparast, 2007).

Les flavonoïdes sont dosés par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm. Dans un tube à essai nous avons mélangé 500 μL de l'échantillon à doser avec 2 mL d'eau distillée. Après l'addition de 150 μL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15 %, nous avons laissé le mélange reposer pendant 6 minutes, ensuite nous avons ajouté 150 μL de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6 \text{ H}_2\text{O}$) à 10% . Après repos pendant 6 minutes, 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% sont incorporés. Le volume total est complété à 5 mL avec l'eau distillée.

La lecture est faite à 510 nm contre un blanc après 15min de repos.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à des concentrations finales allant de 0,1 à 0,8 mg/mL

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par cent grammes de matière végétale sèche. Selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de flavonoïdes} = a. f / b$$

a : Concentration des flavonoïdes en mg/mL déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

f : Facteur de dilution ($f=10$)

b : Concentration initiale de l'extrait (10mg/mL).

2.2.3.4. Dosage des tanins condensés (Sun et coll., 1998).

En présence d'acide sulfurique, les tanins condensés se dépolymérisent et, par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 500 nm. Une prise de 50 μL d'extrait convenablement dilué est ajoutée à 3 mL de vanilline à 4% et 1.5 mL d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). Après homogénéisation, le mélange est mis en incubation à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance de cette préparation est mesurée à 500 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à des concentrations de 0 à 400 µg.mL⁻¹. Les teneurs en tanins condensés sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par cent grammes de la matière végétale sèche (**mg EC/100g MS**).

2.2.4. Préparation des extraits végétaux (Upson et coll., 2000)

2.2.4.1. Préparation des extraits bruts

L'extrait hydro-méthanolique est préparé par dissolution de 1g de matière végétale dans 10 mL de solvant. Après 5min de chauffage, une macération de 24h sous agitation continue à température ambiante est réalisée, le mélange est filtré, avec renouvellement du solvant tous les 24h. L'opération est répétée trois fois. Les fractions sont regroupées et évaporées à sec.

2.2.4.2. Extraction des flavonoïdes (Upson et coll.,2000)

5 g de poudre végétale (partie aérienne ou racines) d'*E. spinosus* sont mis en contact avec 50 mL de méthanol aqueux à 70%. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 5 minutes. Après macération pendant 48 heures en renouvelant le solvant et filtration sur papier filtre, le filtrat est évaporé sous vide en utilisant un Rotavapeur type -bouché R-200.

Les résidus secs obtenus sont traités par l'eau bouillante pour dissoudre les flavonoïdes. La phase aqueuse est filtrée et extraite dans un premier temps deux fois par l'acétate d'éthyle (v/v) dans une ampoule à décanter. Nous récupérons la phase acétate d'éthyle qui est évaporée à sec (extrait acétate d'éthyle). La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est traitée deux fois avec le n-buthanol et on récupère ainsi la phase n-buthanol qui est évaporée à sec (extrait n-buthanol).

2.2.4.3. Extraction des tanins (Zhang et collaborateurs, 2008)

2,5g de broyats de la matière végétale sont extraits par 50 mL du mélange acétone/eau (35/15) pendant 72 heures. La solution obtenue est filtrée et évaporée à 40°C au Rotavapeur type -bouché R-200 pour éliminer l'acétone et la phase aqueuse est lavée par le dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après élimination de la phase organique, la phase aqueuse est traitée trois fois avec l'acétate d'éthyle (v/v), les trois phases organiques obtenues sont réunies et évaporées à sec à 40°C au Rotavapeur. La phase aqueuse restante est traitée trois fois par le n-buthanol. Les phases n-buthanol sont évaporées à sec afin de récupérer l'extrait sous forme de poudre.

2.2.4.4. Rendement en extraits

Afin de déterminer le rendement en extraits secs, nous avons calculé le rapport entre le poids de l'extrait sec en gramme et le poids du matériel végétal en gramme selon la formule suivante :

$$\text{Rendement\%} = m_0/m_1 * 100$$

2.3. Activités biologiques

2.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

2.3.1.1. Méthode de réduction du fer : FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Karagozler et coll., 2008).

➤ Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

➤ Mode opératoire

Un millilitre de différentes concentrations de chaque extrait (**0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/mL**) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2,5 mL de la solution tampon phosphate (**0,2 M à pH 6,6**) et 2,5 mL de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 minutes puis refroidis à température ambiante. Après, 2,5 mL de l'acide trichloracétique (10%) sont additionnés.

Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. Après 2,5 mL du surnageant de chaque concentration sont mélangés avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL FeCl_3 (Chlorure de fer) (0,1%).

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions des deux parties de la plante étudiée. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

2.3.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Sanchez-Moreno *et coll.*, 2002).

2.3.2.1. Principe

Le DPPH• (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Figure N°4) (Parejo *et coll.*, 2002).

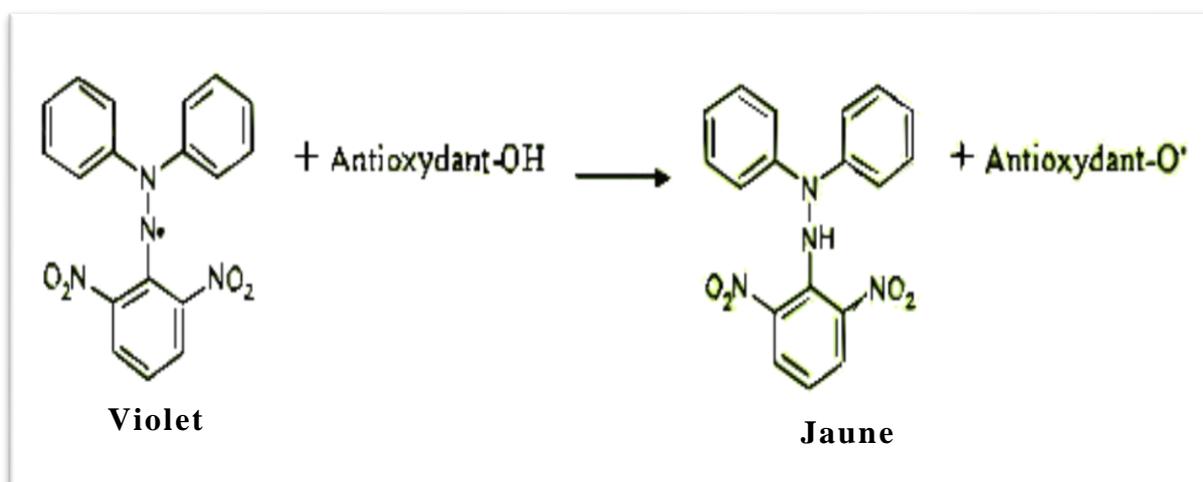


Figure N°4 : Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH• (Parejo *et coll.*, 2002)

2.3.2.2. Mode opératoire

Un volume de 50 µL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1950 µL de la solution méthanolique du DPPH (0,0025 g/L) fraîchement préparée. Pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le blanc réactif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µL du

méthanol avec 1950 µL d'une solution méthanolique de DPPH. Le méthanol est utilisé comme control négatif.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

2.3.2.3. Calcul des pourcentages d'inhibition

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I \% = ((Ac - At) / Ac) * 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : absorbance du test effectué.

2.3.2.4. Calcul des concentrations inhibitrices (IC₅₀) :

La concentration inhibitrice de 50 % ou IC₅₀ (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions logarithmiques des graphes tracés : pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées déterminées par le logiciel **ORIGIN 50**.

2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits

L'étude de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références est réalisée par des techniques différentes et complémentaires qui sont : la technique de diffusion sur milieu solide en utilisant la méthode des disques et la méthode de diffusion sur milieu liquide en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Nous avons testé l'activité des extraits à différentes concentrations sur un panel de microorganismes (bactéries, levures). Le principe consiste à imbiber le disque avec 10 à 15µL d'extrait.

Les souches sont revifiées dans le sabouraud liquide pour les levures et dans le bouillon nutritif pour les bactéries pendant 24h à une température égale à 35 ± 2°C. La gentamycine et L'amphotéricine B respectivement, sont utilisés comme antibiotique et antifongique de référence.

2.4.1. Préparation des disques

Nous avons utilisé le papier Wattman N°3 coupé en disques de 6 mm de diamètre. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques, une fois préparés, sont placés dans un tube à vice et autoclavés pendant 20 minutes à 120° C.

2.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

2.4.2.1. Technique de diffusion sur gélose (méthode de disques) (CLSI, 2009).

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien, elle est aussi appelée : la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs. Des boîtes de Pétri contenant du Mueller Hinton agar sontensemencées aseptiquement par une suspension de 10^8 cellules/mL, qui provient d'une culture jeune de bactéries. L'ensemencement est fait par écouvillonnage. Après séchage des boîtes, ces dernières sont incubés dans une étuve à 37°C pendant 24h. La turbidité est ajustée à 0.5 McFarland.

L'absorbance est comprise entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde égale à 625nm. L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des disques. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions en millimètres (mm).

Les zones doivent être uniformément circulaires (**Richard et coll., 2007**). Selon **Moreira et ses collaborateurs en 2005**, les seuils de sensibilités exprimés en zones d'inhibition sont comme suit :

- Diamètre inférieur à 8 mm : résistante.
- Diamètre entre 9 et 14 mm : sensible.
- Diamètre entre 15 et 19 mm : très sensible.
- Diamètre supérieur à 20 mm : extrêmement sensible.

2.4.2.2. Méthode de détermination des Concentrations Minimales Inhibitrice (CMI) sur milieu liquide

Nous avons utilisé la technique décrite en 2003 par la méthode de **CLSI (NCCLS, 2003)**. Cette dernière donne des résultats rapides, reproductibles et économiques. C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antibactériens et des antifongiques et de déterminer les CMI correspondantes. Cette dernière est la

plus petite quantité d'extrait ou d'antibiotique (ATB) capable d'inhiber une croissance visible à l'œil nu.

A partir d'une culture jeune sur gélose nutritive pour les bactéries, nous avons prélevé quelques colonies que nous avons suspendues dans 5mL de l'eau physiologique. L'inoculum est ajusté à 10^8 cellules/mL (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm.

Après l'ajustement de l'inoculum, une série de dilutions est faite ; La première consiste à prélever 15 μ L de l'inoculum à 10^8 cellules/mL et de le compléter jusqu'à 3mL avec Muller Hinton liquide soit une dilution au 1/200, la deuxième dilution est faite dans le puit au 1/10 pour avoir une concentration finale de 5.10^4 cellules/mL dans le puit. Les concentrations d'extraits sont consignés dans le tableau N°3.

Tableau N°3 : Concentrations d'extraits des deux parties de la plante *E.spinosus*

Extraits	Concentrations en mg/mL	
	Partie aérienne	Racines
Sous reflux aqueux	600	600
Eau/méthanol	2400	1100
Eau/acétone	2400	750
Flavonoïdes : Fraction acétate d'éthyle	3250	624
Flavonoïdes : Fraction n-buthanol	2000	6000
Tanins : Fraction acétate d'éthyle	1040	2000
Tanins : Fraction n-buthanol	2000	5000

2.4.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits (CLSI, 2009)

2.4.3.1. Technique de diffusion sur gélose (méthode des disques)

Les boîtes de pétri contenant la gélose sontensemencés par un inoculum de 10^6 cellules/mL. Le milieu de culture utilisé est Muller Hinton Agar supplémenté de 2% de glucose et de 0,5 μ g de bleu de méthylène. Le protocole expérimental est identique à celui utilisé pour les bactéries. Les seuils de sensibilité sont identiques à ceux utilisés pour les bactéries.

2.4.3.2. Technique de microdilution sur milieu liquide (Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices CMI) (Sokmen et coll., 2004)

A partir d'une culture jeune sur gélose Sabouraud, nous avons prélevé quelques colonies que nous avons suspendues dans 5mL de l'eau physiologique. L'inoculum équivalent à 0,5 McFarland est préparé et ajusté à 10^6 cellules/mL l'absorbance est de l'ordre de 0,12 à 0,15 à une longueur d'onde de 530nm.

Les puits des microplaques contenant le bouillon Roswell Park Memorial Institut (**RPMI-1640**) (**Sigma**) additionné de 0,165M d'acide morpholinepropanesulfonique (MOPS) et différentes concentrations d'extraits dans le DMSO à 2% sont ajoutés à un inoculum de 10^6 cellules/mL. Les microplaques sont placées dans une étuve à 37°C à 24heures. La lecture est faite à 530nm, à l'œil nu sachant que la CMI est la plus faible concentration de la substance testée pour laquelle aucun trouble visuel n'est observé. L'amphotéricine B est utilisé comme antifongique de référence à une concentration de 0,5µg/mL.

2.5. Evaluation de l'activité hémolytique (Lee, 2002)

2.5.1. Préparation de PBS (Phosphate Buffered Saline)

Nous avons préparé une solution tampon phosphate saline (PBS) à $\text{pH} = 7,4 \pm 0,02$ par l'utilisation des composés suivants avec les concentrations qui correspondent : NaCl (137mM), KCl (2,7mM), Na_2HPO_4 (8mM), KH_2PO_4 (2mM) (**Mohan, 2006**).

2.5.2. Préparation de la suspension érythrocytaire (Lee, 2002)

Du sang fraîchement prélevé sur tube sec est centrifugé à 4000 tours/min pendant 5min à l'aide d'une centrifugeuse. Après élimination du surnageant, le culot est lavé deux fois avec une solution de lavage glacée MgCl_2 , NaCl (2mM, 150mM) puis resuspendu à nouveau dans le tampon phosphate de solution salée PBS (10mM, $\text{pH} = 7,4$).

2.5.3. Mesure de la fuite de l'hémoglobine (Lee, 2002)

Les globules rouges sont suspendus dans le tampon phosphate salé (PBS) 10mM, $\text{pH} = 7,4$.

La suspension érythrocytaire à 2% est incubée (dans un incubateur de paillasse type Orbital Shaker, Thermo Forma) à 37°C pendant 120min avec différentes concentrations d'extraits selon leurs IC_{50} . Des prélèvements de 0.5mL sont réalisés pour être resuspendus dans 2,5mL d'une solution de lavage glacée MgCl_2 , NaCl (2mM, 150mM) en suivant le temps (0min, 5min, 10min, 20min, 40min, 60min, 90min, 120min). Les tubes sont centrifugés à 4000 tours/min pendant 5min.

Le surnageant est utilisé pour suivre la fuite de l'hémoglobine intracellulaire par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS.

Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec l'eau distillée. Le tampon seul est utilisé comme contrôle négatif. Pour chaque échantillon, le pourcentage de l'activité hémolytique maximale est déterminé par l'équation suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse} = 100 \cdot \frac{\text{DO en présence de l'eau distillée} - \text{DO en présence d'extrait}}{\text{DO en présence de l'eau distillée}}$$

3. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD. La différence entre les différents tests et les corrélations sont déterminées par le test d'ANOVA univarié, et la détermination des taux de signification en utilisant Excel 2010 et le logiciel IBM SPSS 19. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives.

Résultats et discussion

L'objectif de notre étude est la valorisation des plantes locales dotées de propriétés biologiques intéressantes. Le choix de notre plante n'est pas basé sur un seuil au hasard, mais il est circonscrit selon divers critères fiables.

Le manque de travaux sur *Echinops spinosus* dans le domaine thérapeutique d'une part et son utilisation fréquente en médecine traditionnelle d'autre part, nous ont suscité à faire une enquête ethnobotanique auprès de la population de Tlemcen, de l'étudier du point de vue chimique et biologique afin de savoir les constituants responsables de son potentiel thérapeutique.

1. Enquête ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique effectuée sur 250 enquêtés a montré que la fréquence d'utilisation de cette plante est de 28,4% ce qui prouve l'ignorance de l'importance de cette espèce végétale surtout par la tranche d'âge de 18 à 30 ans.

L'étude ethnobotanique a été menée dans la wilaya de Tlemcen entre 2013 et 2015. Nous nous sommes fixée comme objectif l'évaluation du potentiel de la région en plantes médicinales utilisées spécifiquement dans le traitement de plusieurs maladies et surtout pour valoriser les plantes poussant spontanément dans la région. Le questionnaire utilisé comporte deux parties, la première concerne l'informateur et la deuxième la plante utilisée, son mode d'emploi ainsi que son utilisation thérapeutique (**ANNEXE 1**).

1.1. Connaissance sur la plante

L'enquête a ciblé 250 personnes de la population locale de Tlemcen (village et centre-ville) dont 28,4% ont déjà utilisé la plante, 25,4% entendent parler seulement et un grand pourcentage n'a jamais entendu parler (47,2%) c'est-à-dire qu'il a recours à la médecine moderne ou utilisent d'autres plantes .

1.2. Tranche d'âge

L'utilisation de la plante *E. spinosus* dans la région de Tlemcen est répandue chez toutes les tranches d'âge, avec une prédominance chez les personnes âgées qui dépassent les 50 ans (47%), suivie de la tranche entre 30 et 50 ans avec un pourcentage de 39 %. Cependant, pour la tranche d'âge de 18 à 30 ans, on note un taux de 14%(**figure N°5**).

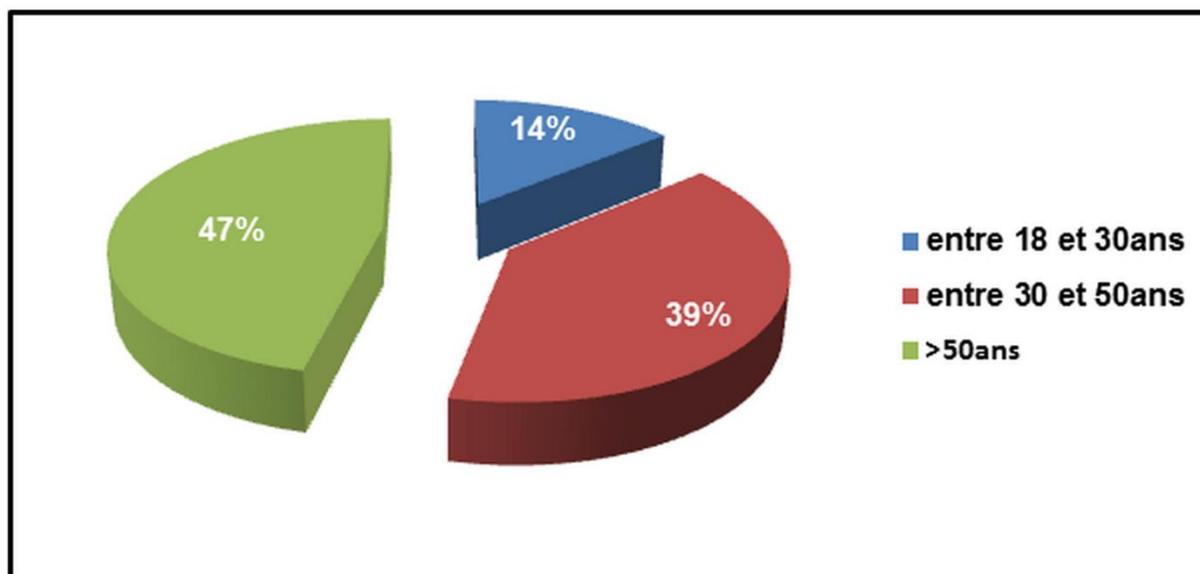


Figure N°5: Répartition de la fréquence d'utilisation d'*Echinops spinosus* par tranche d'âge.

1.3. Sexe d'appartenance

Dans la région de Tlemcen les femmes et les hommes s'intéressent à la phytothérapie, cependant il y a une prédominance chez les femmes qui s'intéressent beaucoup au traitement à base de plantes avec un pourcentage de 86%, tandis que les hommes ne dépassent pas 14%.

Ces résultats sont conformes aux résultats obtenus par divers auteurs [(Azzi et coll., 2012) ; (Bentabet et coll., 2014) ; (Jdaidi et coll., 2016)].

1.4. Niveau d'études

D'après l'enquête, il ressort que la grande majorité des usagers de plantes sont non scolarisés avec un pourcentage de 45 % des gens qui ont déjà utilisé cette plante, cependant les personnes ayant le niveau de l'école primaire ont un pourcentage d'utilisation non négligeable 28 %, viennent ensuite les universitaires avec un pourcentage de 10%, alors que celles ayant le niveau moyen et secondaire utilisent peu les plantes médicinales (9 %) et (8%) respectivement.

1.5. Domaine d'indication thérapeutique

L'enquête ethnobotanique nous a permis de répertorier un certain nombre de maladies traitées par cette plante. Les résultats obtenus dans la ville de Tlemcen sont regroupés sur la **figure N°6**.

Nous remarquons que les racines d'*Echinops spinosus* sont utilisées avec des fréquences de 31,03% pour l'évacuation du placenta après l'accouchement, 28,74 % pour soulager les douleurs du cycle menstruel. Elles sont utilisées aussi en cas de

grossesse arrêtée (10,34%) et pour les candidoses buccales et vaginales (9,2%). Son utilisation pour le traitement des infections urinaires et pour dissoudre les kystes utérins est moins fréquente avec 4,6 et 3,45% respectivement. Les enquêtés témoignent que cette plante est utilisée pour traiter l'hypoglycémie, l'inflammation, l'hypotension, l'eczéma, les douleurs abdominales avec une fréquence qui ne dépasse pas 1,15%. Dans la littérature la plante est utilisée pour évacuer le placenta, pour le traitement des verrues, pour le traitement des douleurs stomacales, l'amélioration du système circulatoire, le traitement des douleurs stomacales, le traitement des affections hémorroïdaires [(Boullard *et coll.*,2001),(Allaoui *et coll.*,2002)].

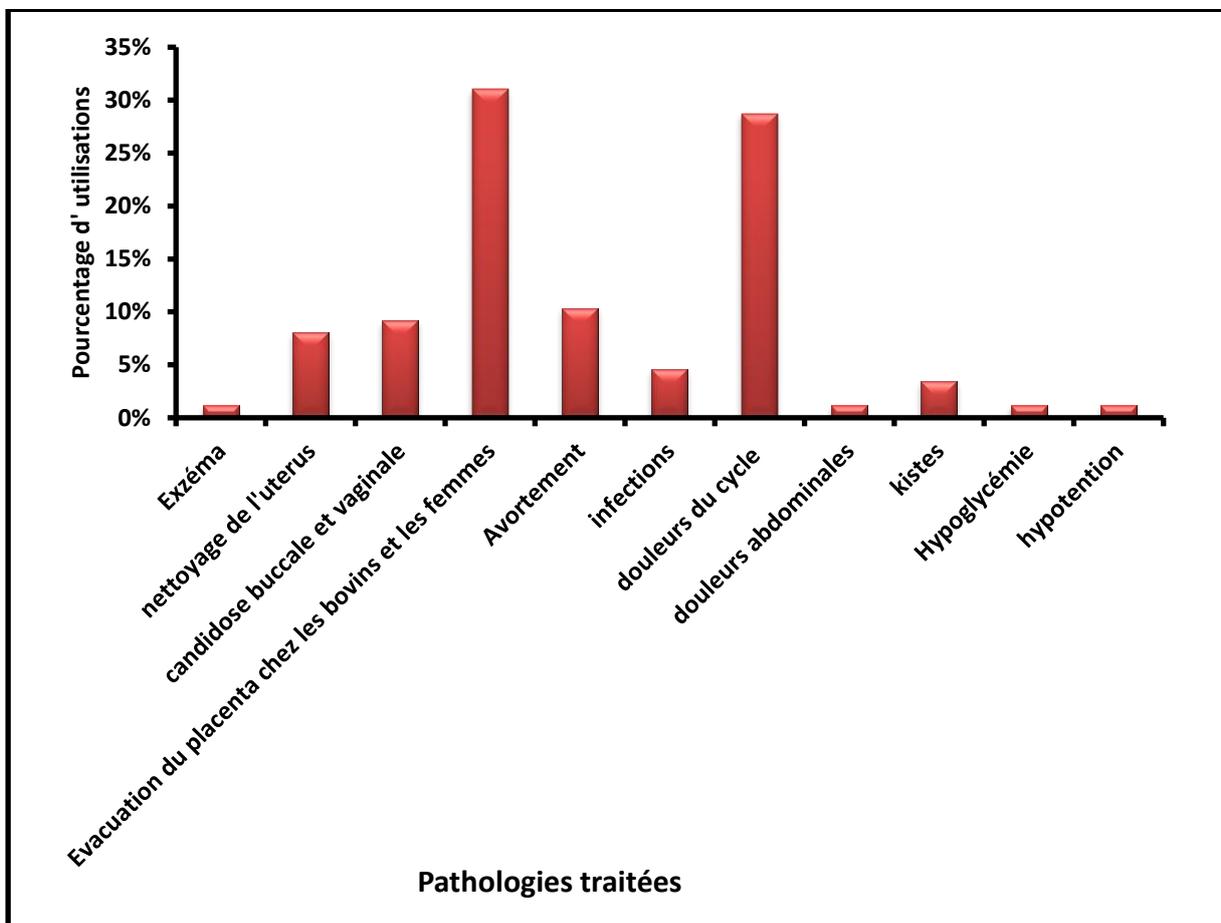


Figure N° 6 : Répartition des différentes utilisations de la plante *Echinops spinosus*.

1.6. Parties utilisées

Sur l'ensemble des enquêtés, seulement 32% ont répondu positivement sur les parties utilisées de la plante *Echinops spinosus*. Dans la région de Tlemcen, les

racines d'*Echinops spinosus* sont les plus utilisées avec un pourcentage de 74%, suivis des feuilles-tiges avec une fréquence qui ne dépasse pas 21%.

Seulement, 5% de la population indique que les deux parties de cette plante sont utilisées .

1.7. Mode de préparation

Les résultats relatifs au mode de préparation d'*Echinops spinosus* indiquent que la décoction constitue le mode de préparation le plus fréquent soit 17,6 %, elle est suivie par la préparation en infusion 8,8%, les autres préparations (macération, poudre) ne dépassent pas 1,2% pour l'ensemble des enquêtés. Pour le reste de la population 72,4%, ils n'ont pas répondu sur le mode de préparation de cette plante.

Les résultats obtenus montrent que les femmes en général et en particulier les analphabètes s'intéressent beaucoup plus à la phytothérapie que les hommes, ce qui est confirmé par plusieurs chercheurs [(Benkhigue, 2011) ; (El Hilah F. et coll., 2015)], cela peut être dû au fait que la transmission des recettes à base de plantes est faite de mères aux filles.

E. spinosus est utilisée pour évacuer le placenta chez les femmes après l'accouchement ainsi que pour éviter le blocage du cycle menstruel.

Les candidoses, les douleurs et les infections sont aussi traitées par cette plante qui touchent plus les femmes que les hommes.

C'est la partie racine qui est la plus utilisée en décoction et en infusion cela peut être dû au fait que la décoction permet de recueillir le plus de principes actifs et atténue ou annule l'effet toxique de certaines recettes.

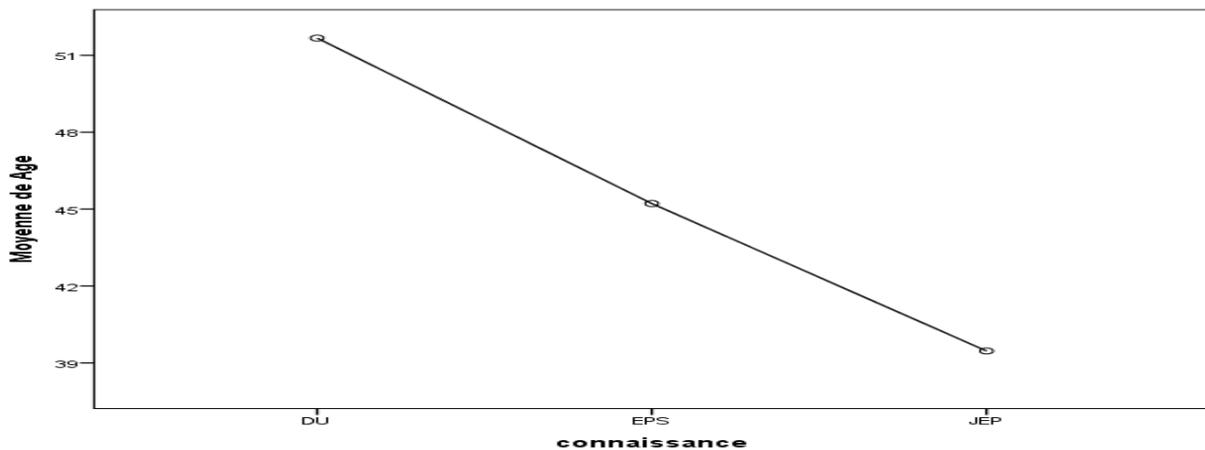
1.8. L'Analyse statistique

Le traitement statistique des données est réalisé à l'aide du logiciel SPSS 21 en utilisant le test ANOVA à un seul facteur. L'intérêt de cette analyse consiste à mettre en valeur nos résultats.

La comparaison des moyennes a été effectuée au seuil de 5% (la différence est significative pour une valeur de $p < 0,05$).

Dans la présente étude, nous remarquons que la valeur P est égale à 0.062, cela explique qu'il n'y a pas une différence significative entre l'âge et la connaissance de la plante c'est-à-dire que la connaissance de la plante dépend de la fréquence d'âge ce qui explique l'utilisation de cette plante par les personnes âgées (**figure N°7**).

L'analyse statistique effectuée nous a montré qu'il existe une forte relation très significative entre l'âge, le sexe et la connaissance de la plante ($P=0,006^{**}$). Nous remarquons que la plupart des répondants sont des femmes qui ont déjà utilisé la plante avec une fréquence d'âge qui varie entre 20 et 80 ans, une autre tranche de population entend parler seulement de la plante mais ne connaît pas son utilité exacte. Cependant, la plus grande tranche de la population qui touche les deux sexes avec un effectif plus élevé n'a jamais entendu parler de cette plante. Cette tranche représente beaucoup plus les jeunes que les adultes (**figure N°8**).



DU : Déjà utilisé, **EPS** : Entend parler seulement, **JEP** : Jamais entendu parler.

Figure N°7: Corrélation entre la fréquence d'âge et la connaissance de la plante *E. spinosus*.

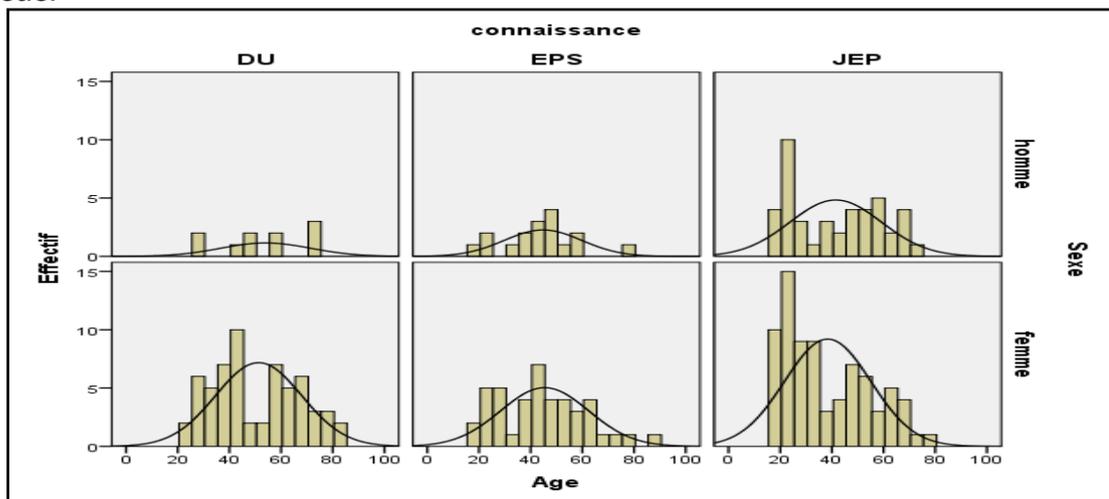


Figure N°8: Corrélation entre la fréquence d'âge, le sexe, et la connaissance de la plante *E. spinosus*

2. Criblage phytochimique

L'étude phytochimique constitue la première étape dans la recherche des molécules à activité thérapeutique. Elle est utilisée essentiellement pour détecter les différentes classes de composés chimiques existants dans la plante.

2.1. Tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur l'extrait aqueux, l'extrait éthanolique et l'extrait d'éther di-éthylique de la partie aérienne et des racines de la plante *Echinops spinosus* sont présentés dans le **Tableau N°4**.

Tableau N°4 : Caractérisation des groupes chimiques dans les extraits d'*Echinops spinosus*.

Groupes chimiques	Feuilles et tiges			Racines		
	Extrait aqueux	Extrait éthanolique	Extrait étherique	Extrait aqueux	Extrait éthanolique	Extrait étherique
Tanins catéchiques	+++	++	++	+++	+	-
Sucres réducteurs	+++	+	-	+++	+	-
Flavonoïdes	++	++	-	++	-	-
Quinones	++	++	-	++	+	-
Alcaloïdes	++	++	-	+	+	-
Amidon	+	+	-	+	-	-
Saponosides	-	-	-	-	-	-
Coumarines	-	+	-	-	-	-

Réaction très positive +++
 Réaction moyennement positive ++
 Réaction positive +
 Réaction négative -

Nous remarquons que les tanins et les sucres réducteurs sont présents dans l'extrait aqueux des deux parties de la plante par rapport aux deux autres extraits. Les flavonoïdes et les quinones sont également présents dans l'extrait aqueux des deux parties de la plante et dans l'extrait éthanolique de la partie aérienne seulement. Les alcaloïdes sont retrouvés dans la partie aérienne. En revanche, les saponosides sont absents dans les trois extraits testés.

Nos résultats sont en accord avec les travaux effectués par **Alilou et ses collaborateurs en 2014** qui montrent que le criblage phytochimique des feuilles et des fleurs de la plante *Asteriscus graveolens subsp odorus* appartenant à la famille des astéracées effectué pour la première fois, a révélé la présence des alcaloïdes,

des flavonoïdes, des tanins catéchiques, des terpènes, des coumarines et une absence totale des saponines dans les feuilles et les racines.

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

2.2. Rendements en extraits

Les extractions effectuées lors de cette étude nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait en utilisant des méthodes d'extractions solide/liquide et liquide /liquide par des solvants spécifiques pour chaque extrait. La quasi-totalité des extraits obtenus avaient un aspect pâteux et parfois en poudre cristallisée, de couleur verte ou marron.

Le tableau N°5 représente les résultats des rendements en extraits calculés à partir des feuilles, des tiges et des racines d'*Echinops spinosus*.

Tableau N° 5: Rendement en extraits de la plante *Echinops spinosus*.

	Extraits	Extrait en gramme (g)	Rendement %	Couleur	Aspect
Partie Aérienne	Sous reflux aqueux	4	20	Marron clair	Poudre cristallisée
	Eau/méthanol	6,088	15,22	Vert noirâtre	Pâteux
	Eau/acétone	4,36	21,8	Vert foncé	Pâteux
	Flavonoïdes	5,1796	12,93	Marron verdâtre	Pâteux
	Acétate d'éthyle				
	Tanins	0,5726	1,43	Noir verdâtre	Poudre
	Acétate d'éthyle				
Racines	n-buthanol flavonoïdes	0,8345	4,17	Marron orangé	Pâteux
	n-buthanol tanins	0,5542	1,38	Marron orangé	Pâteux
	Sous reflux aqueux	2,4	12	Marron foncé	Poudre Cristallisée
	Eau/méthanol	2,515	6,2875	Marron foncé	Pâteux
	Eau/acétone	4,8	24	Marron rougeâtre	Pâteux
	Acétate d'éthyle flavonoïdes	0,3342	1	Marron foncé	Poudre cristalline colle mâtée
	Acétate d'éthyle tanins	0,4148	1,037	Noir	Poudre
n-buthanol flavonoïdes	1,3732	3,43	Marron orangé	Pâteux	
n-buthanol tanins	0,4232	1,058	Marron foncé	Granuleux dans une pate	

Nous constatons que le rendement est plus important dans les extraits bruts que dans les extraits spécifiques.

L'extrait hydro-acétonique donne le rendement le plus élevé avec un pourcentage de 24% et 21,8 % pour les racines et la partie aérienne respectivement.

L'extrait aqueux quant à lui présente un pourcentage intéressant de 20% suivie de l'extrait hydro-méthanolique de la partie aérienne (15,22%), puis de l'extrait aqueux des racines avec un pourcentage de 12%. L'extrait hydro-méthanolique de la même partie ne dépasse pas 6,28%.

Cela peut être expliqué par la forte polarité de l'eau et du méthanol d'une part, et la polarité moyenne de l'acétone qui permet d'extraire un maximum de composés polaires et moyennement polaires.

Le choix du mélange de solvants pour les extraits bruts est basé sur les résultats de plusieurs travaux antérieurs qui ont montré que l'acétone à 70% dans l'eau donne un meilleur rendement que l'eau ou le méthanol à 80%, par conséquent, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande du soluté, favorisant ainsi l'extraction [(Seigler et coll., 1986) ; (Robards et Antolovich, 1997) ; (Trabelsi et coll., 2010) ; (Penchev et coll., 2010) ; (Mussatto et coll., 2011)].

Concernant les extraits spécifiques, la teneur la plus élevée est celle de la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne des flavonoïdes (12,23%), suivie de l'extrait n-buthanol des flavonoïdes de la partie aérienne (4,17%). En effet, les autres fractions représentent des rendements faibles ne dépassant pas les 4%.

Pour ce qui est de l'aspect et la couleur des extraits, nous remarquons que la quasi-totalité des extraits obtenus présentent généralement un aspect pâteux et parfois en poudre cristallisée, de couleur verte ou marron.

Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature, car le rendement semble être lié à la durée du stockage, à la période de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées, et aux conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée .

3. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins

Les deux parties de la plante *E. spinosus* ont été analysées quantitativement à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible pour leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés.

Les résultats obtenus dans le **tableau N°6** sont calculés à partir des courbes d'étalonnages (**Figures N°9, N°10, N°13**).

3.1. Dosage des polyphénols

Le dosage effectué sur l'extrait aqueux et hydro-méthanolique a montré que l'extrait aqueux des racines présente la teneur en polyphénols totaux la plus élevée soit $852 \pm 0,01$ mg EAG/100g de MS, alors que la partie aérienne estimée à $36,1 \pm 0,001$ mg EAG/100g de MS .

Les travaux de recherche effectués sur le dosage des polyphénols totaux montrent qu' *Ageratum conyzoides* appartenant à la famille des astéracées est riche en polyphénols (**Kabran Guy Roger Mida, 2012**), ainsi les études menées sur *Artemisia herba alba* montrent que la teneur en polyphénols est de $25,34 \pm 0,69$ mg EAG/mL d'extrait (**Boudjelal, 2013**).

Nos résultats sont supérieurs à ceux de **Bakchiche et ses collaborateurs en 2014**, qui rapportent qu' *Artemisia campestris* présente une teneur en polyphénols totaux égale à $53.84 \pm 4,59$ mg EAG /100g MS.

La quantité des composés phénoliques des extraits de plantes varie d'une plante à l'autre, cela est probablement dû à la localisation géographique, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la maturité de la plante (**Park et coll., 2002**) et la durée de conservation (**Özgüven et coll., 1998**).

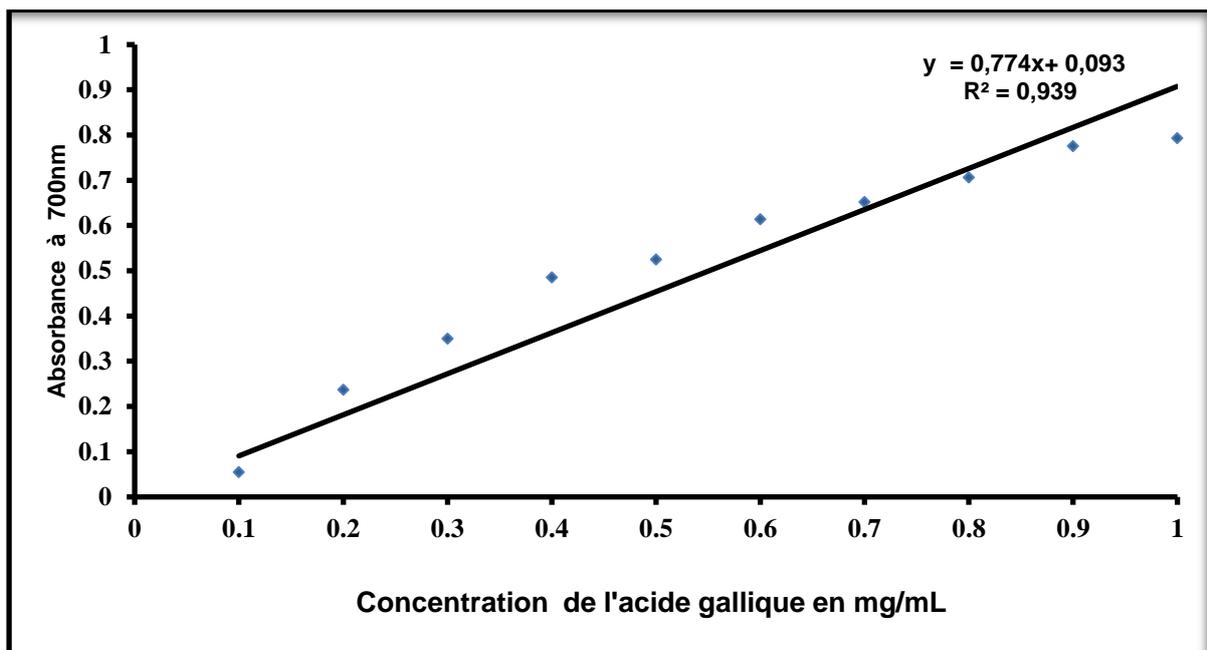


Figure N°9: Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux

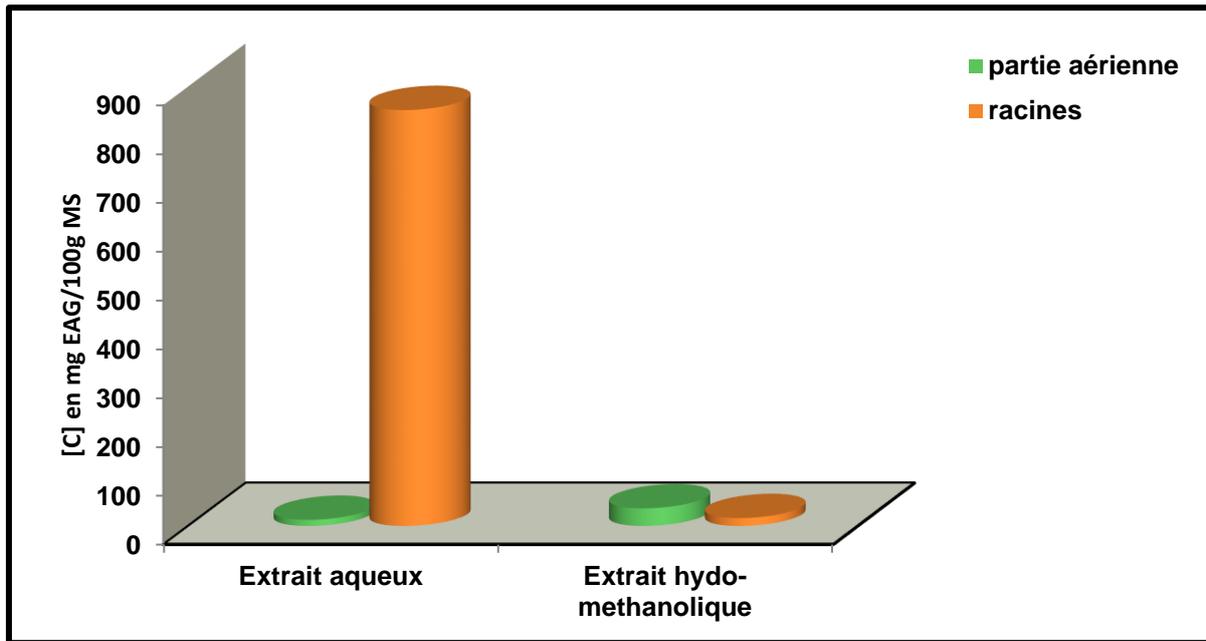


Figure N°10 : Teneur en polyphénols des deux parties de la plante *Echinops spinosus*.

3.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes des deux parties de la plante est effectuée au moyen d'un dosage spectro-photométrique des extraits bruts des composés phénoliques (**Tableau N°6**), (**figure N°11**)

Les résultats obtenus sont reportés dans la **figure N°12**.

Nous remarquons que la partie aérienne comporte la quantité la plus élevée à partir de l'extrait hydro-méthanolique soit $128,5 \pm 0,02$ mg EAG/100g de MS, des racines $13,37 \pm 0,003$ mg EAG/100g de MS.

Les travaux menés sur la teneur en flavonoïdes montrent que la plante *Sphaeranthus amaranthoides* appartenant à la famille des astéracées présente une teneur égale à 96,43 mg EC/G de MS (**Gayathri et et coll., 2015**).

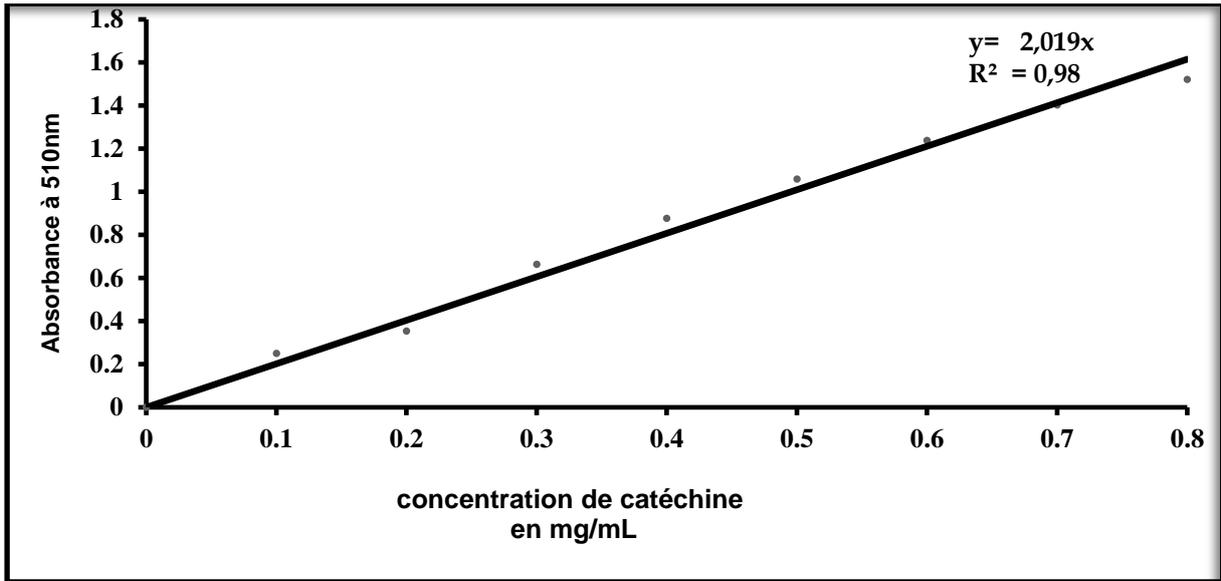


Figure N°11 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

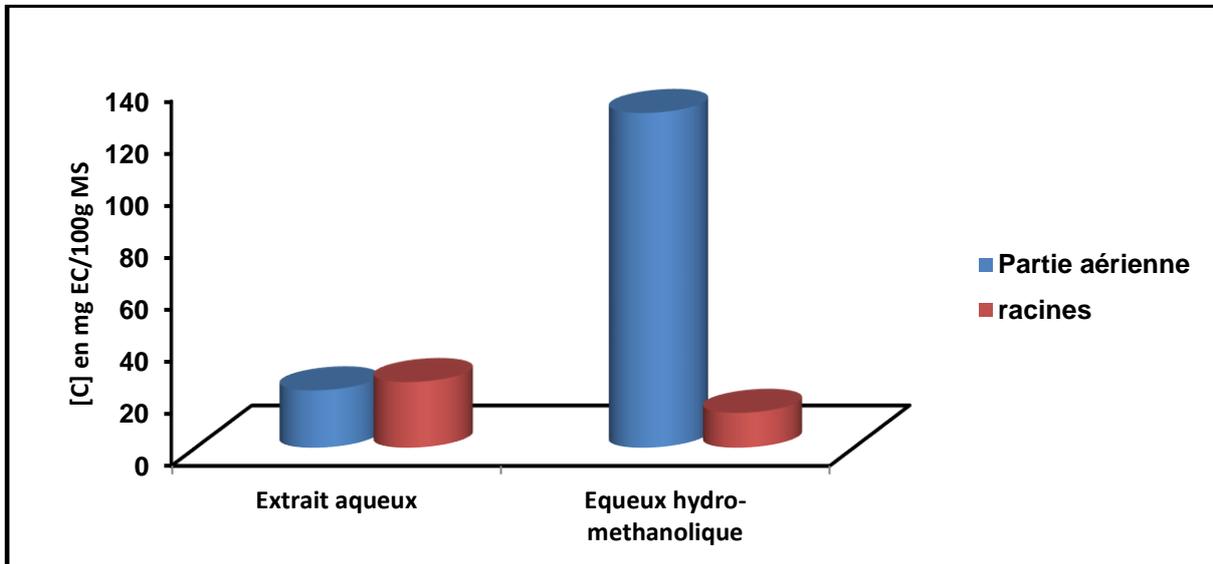


Figure N° 12 : Teneur en flavonoïdes des deux parties de la plante *Echinops spinosus*.

3.3. Dosage des tanins

Les résultats relatifs au dosage des tanins sont consignés dans le **Tableau N°6** et la **figure N°13**.

En vertu de la **figure N°13** et **figure N°14** nous remarquons que la partie aérienne possède la valeur la plus élevée soit $1910 \pm 0,04$ mg EAG/100g de MS suivie de celle des racines avec une valeur de $704,34 \pm 0,002$ mg EAG/100g de MS à partir de l'extrait aqueux, cependant l'extrait hydro-méthanolique a révélé une faible teneur en tanins. En tenant compte de la polarité des extraits, il apparaît que la teneur en tanins dans *Echinops spinosus* augmente avec la polarité de l'extrait sans pour autant négliger la polarité du solvant utilisé.

Nos résultats concordent avec les travaux de recherche de **Djemai et ses collaborateurs** qui ont montré que l'extrait aqueux est plus riche en tanins par rapport à l'extrait hydro-méthanolique et que la haute teneur de ces molécules est dans les extraits les plus polaires (**Djemai zoughlache et coll., 2009**).

Nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par **Rajeev et ses collaborateurs en 2012** qui montrent qu' *Artemisia absinthium* a une teneur en tanins à partir de l'extrait aqueux estimé à $30,44 \pm 1,08$ mg / EAG / g d'extrait (**Rajeev et coll., 2012**).

Il est important de noter qu'une fois les tanins sont appliqués sur les muqueuses et la peau, il se produit une sorte de tannage, il s'y ajoute une action vasoconstrictrice sur les petits vaisseaux, ce qui complète cette activité. Cette propriété explique leur emploi dans le traitement des hémorroïdes et les blessures superficielles. Les tanins oligomères flavanoliques ont une activité anti-élastase, ceci entraîne une diminution de la libération des peptides vaso-actifs et une diminution par conséquent de la libération des prostaglandines inductrices de l'élastase et d'autres protéases.

Ils diminuent le taux de cholestérol et préviendraient l'athéromatose, ils ont ainsi des propriétés anti-diarrhéiques en diminuant la perméabilité de la muqueuse intestinale.

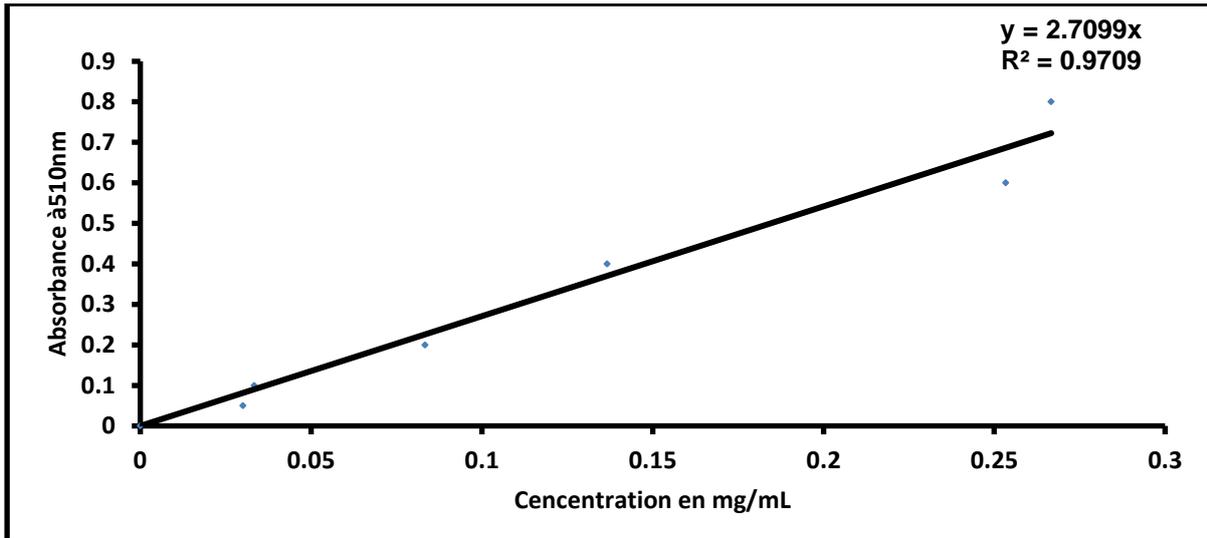


Figure N°13 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins.

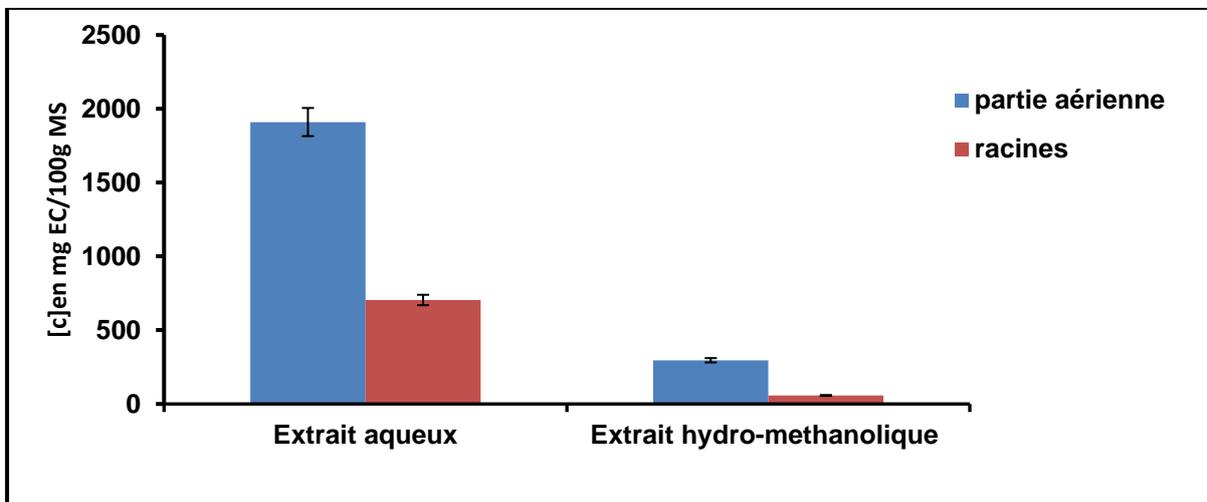


Figure N° 14: Teneur en tanins des deux parties de la plante *Echinops spinosus*.

Tableau N° 6 : Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins de la plante *E. spinosus*.

n=3	Extrait aqueux		Extrait hydro-méthanolique	
	Partie aérienne	racines	Partie Aérienne	Racines
Polyphénols totaux mg EAG/100 g de MS	12,5±0,05	852±0,01	36,1± 0,001	16,1±0,0005
Flavonoïdes mg EC/100g de MS	22±0,03	25,2 ± 0,1	128,5± 0,02	13,37±0,003
Tanins mg EC/100g de MS	1910± 0,04	704,34 ± 0,002	296± 0,1	57,7±0,001

Dans les infections pulmonaires, les tanins agissent grâce à une action inhibitrice sur la croissance des bactéries, des champignons et des virus (**Solim igor, 2002**).

L'analyse statistique des données de l'extrait aqueux et l'extrait hydro-méthanolique montre qu'il existe une parfaite corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et les tanins, qui est inversement proportionnelle à la quantité des polyphénols ($R = -1$). Ce résultat est très significatif ($p = 0,01^{**}$) (**figure N°15**).

Pour les flavonoïdes, nous notons que la teneur en flavonoïdes est proportionnelle à la teneur en polyphénols, cette corrélation est très significative ($R=1$, $p=0,01^{**}$) (**figure N°16**).

Concernant l'extrait hydro-méthanolique, la teneur en polyphénols totaux est proportionnelle à la teneur en tanins et en flavonoïdes avec une parfaite corrélation qui est fortement significative ($R=1$, $p<0,001^{***}$) (**figure N°17, figure N°18**).

La corrélation est croissante ceci explique que la teneur en tanins et en flavonoïdes augmente en fonction de l'augmentation de la teneur en polyphénols totaux. L'analyse des coefficients de corrélations nous indique que l'activité dépend d'abord des tanins puis des flavonoïdes et enfin des polyphénols totaux.

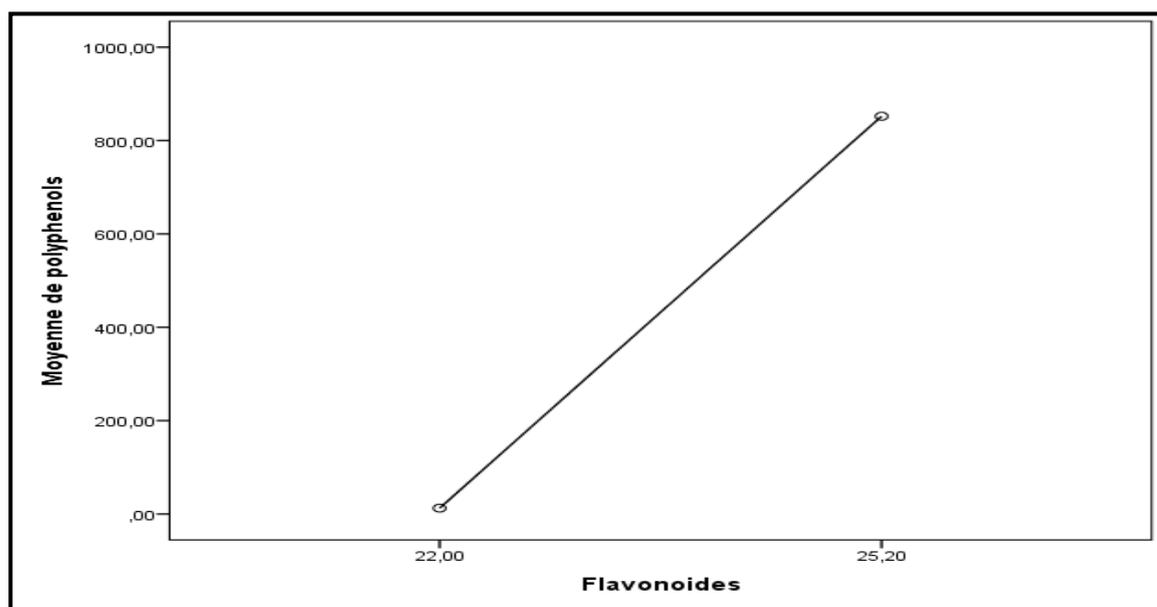


Figure N° 15 : Corrélation entre la teneur en polyphénols et les flavonoïdes.
Pour l'extrait aqueux

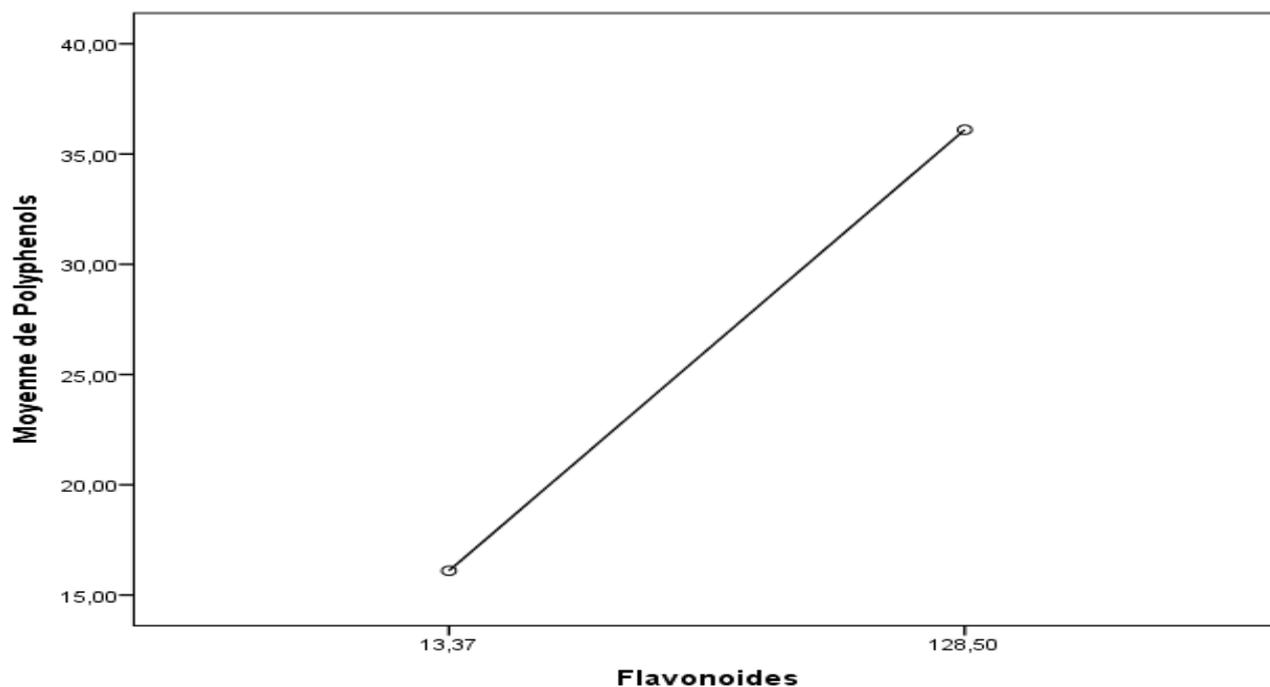


Figure N°16: Corrélation la teneur en polyphénols et les flavonoïdes pour l'extrait hydro-méthanolique.

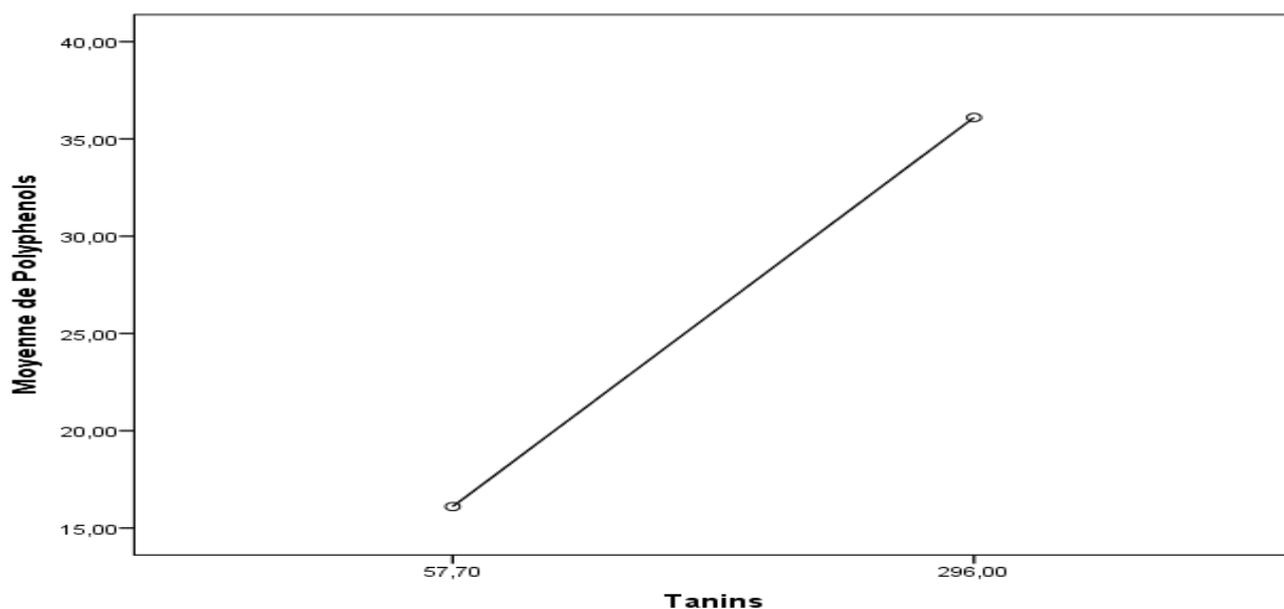


Figure N° 17: Corrélation entre la teneur en polyphénols et les tanins pour l'extrait aqueux

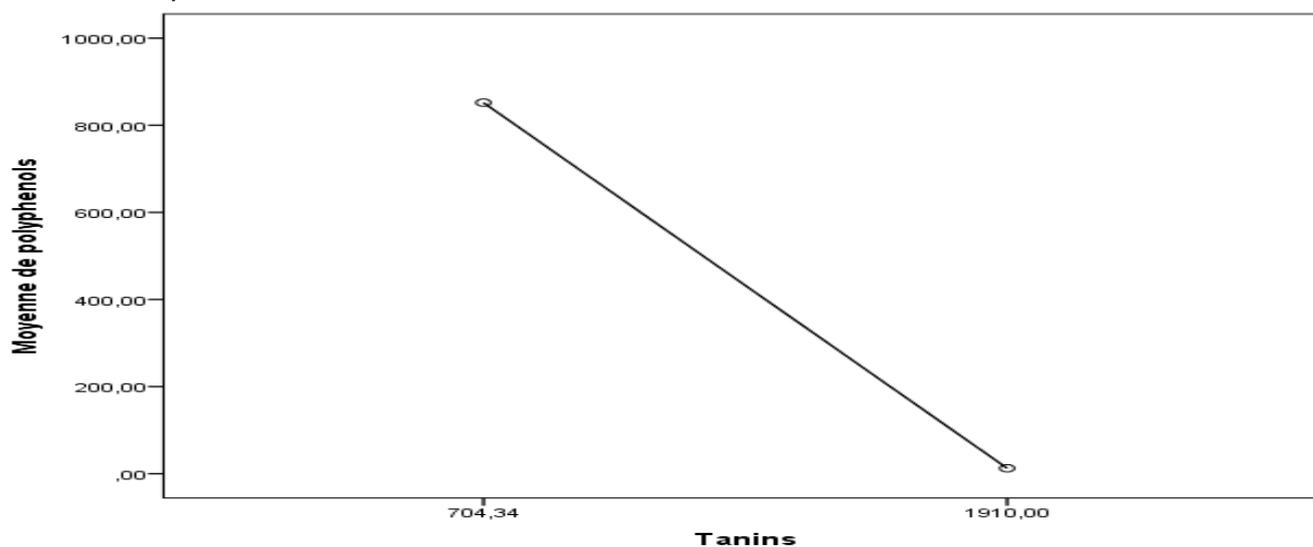


Figure N°18 : Corrélation entre la teneur en polyphénols et les tanins pour l'extrait hydro-méthanolique.

4. Activités biologiques

4.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante est évaluée par deux méthodes spectroscopiques à savoir la réduction du fer (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) FRAP et le piégeage du radical libre DPPH.

4.1.1. Méthode de réduction du fer (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) FRAP

Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (**Karagozler et coll., 2008**).

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction du fer (FRAP) sont présentés dans **la figure N°19, figure N°20 (A, B, C, D, E, F), figures N °21, 22, 23 et 24.**

Ils sont variables d'un extrait à un autre avec une capacité plus importante pour les extraits de la partie aérienne.

Nous remarquons que les extraits testés possèdent une activité dose-dépendante. L'extrait acétate d'éthyle des tanins a montré un pouvoir réducteur plus important par rapport aux autres extraits soit une densité optique égale à 2,8 à la concentration de 2,5mg/mL.

En effet, pour les extraits bruts, c'est l'extrait hydro-méthanolique et l'extrait hydro-acétonique de la partie aérienne qui présentent la densité optique la plus élevée (DO=1) par rapport à l'extrait aqueux (DO=0,8) à la même concentration.

D'après les résultats, nous pouvons déduire que la forte capacité de réduction du fer de l'extrait acétate d'éthyle des tanins qui est supérieure à celle de l'antioxydant de référence (BHA) de la partie aérienne, ceci peut être due à la présence de tanins en quantité élevée et aux flavonoïdes présents pour l'extrait buthanolique de la même partie, cependant les autres extraits présentent une capacité de réduction du fer plus ou moins intéressante, ce qui traduit la richesse d'*Echinops spinosus* en antioxydants.

Nos résultats concordent avec ceux de **Baddou et ses collaborateurs en 2014**, qui ont montré un effet antioxydant considérable sur la plante *Rumex vesicarius*, ceci est due à la richesse des astéracées en polyphénols totaux.

Ce test basé sur une réaction d'oxydo-réduction peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante (**Prior et coll., 2005**). De ce fait les extraits les plus riches en composés phénoliques, peuvent être également considérés comme les plus antioxydants.

L'activité réductrice de l'extrait acétate d'éthyle des tanins et n-butanol des flavonoïdes de la partie aérienne peut être due aussi à sa richesse en composés catéchiques. Cette suggestion est en accord avec l'étude de **DeGraft et ses collaborateurs en 2007** qui indiquent que le noyau catéchol est la seule structure qui augmente le pouvoir réducteur d'un composé à 36% par rapport à un autre qui n'en contient pas.

Plusieurs travaux de recherche rapportent que la capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle, et que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons testés [(**Ozturk et coll., 2007**) ; (**Yang et coll., 2008**) ; (**Su et coll., 2008**) ; (**Liuk et coll., 2009**)].

Une étude faite par **Bouchet et ses collaborateurs en 1998** indique que les tanins condensés ont des propriétés antioxydantes intéressantes, exprimées soit par leur effet inhibiteur de la peroxydation lipidique induite par Fe^{2+} , soit par la capacité de piéger des radicaux libres.

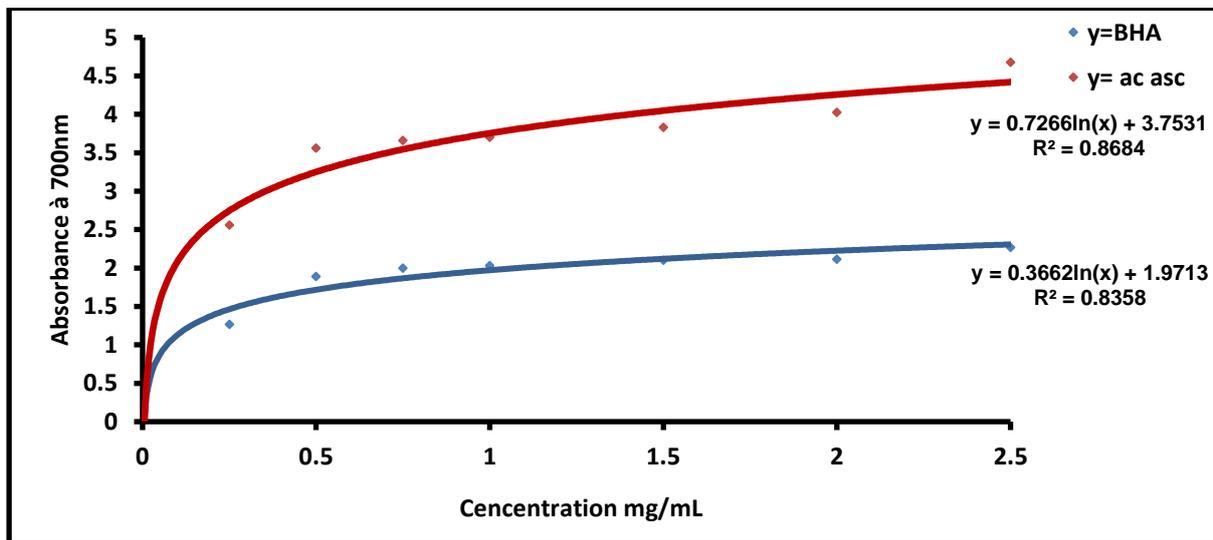
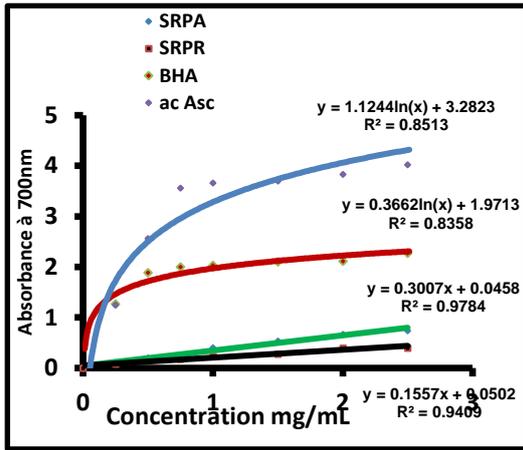
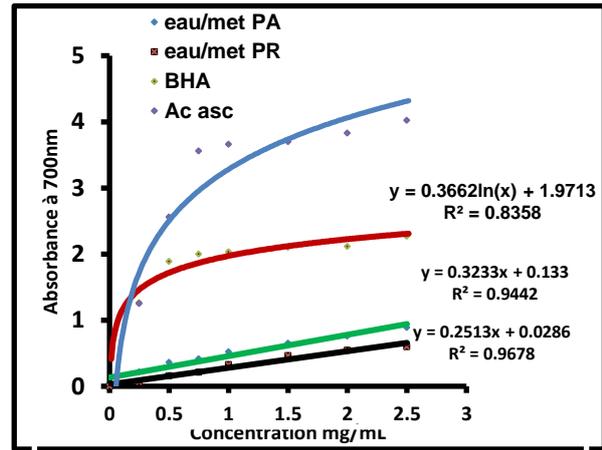


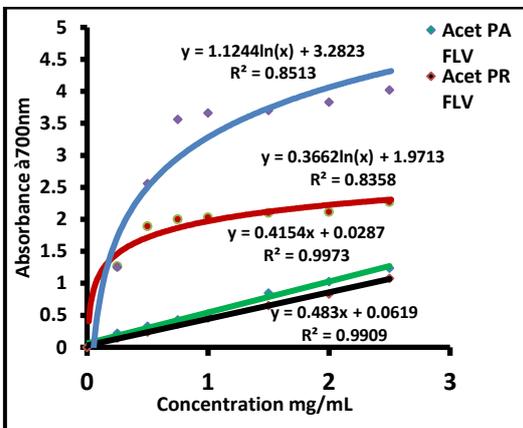
Figure N°19: Courbe d'étalonnage de la BHA et de l'acide ascorbique



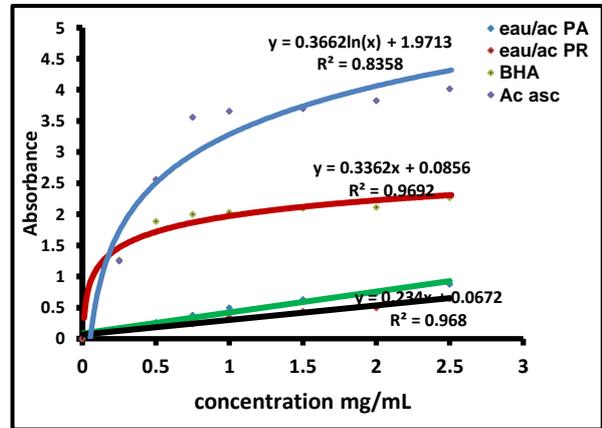
(A) Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de la partie aérienne et des racines d'*E. spinosus*.



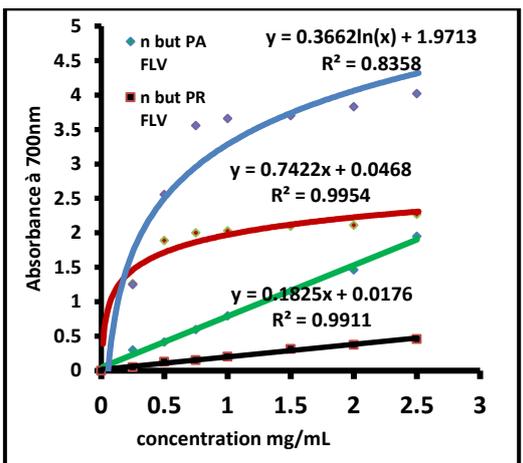
(B) Pouvoir réducteur de l'extrait hydro-méthanolique de la partie aérienne et des racines d'*E. spinosus*.



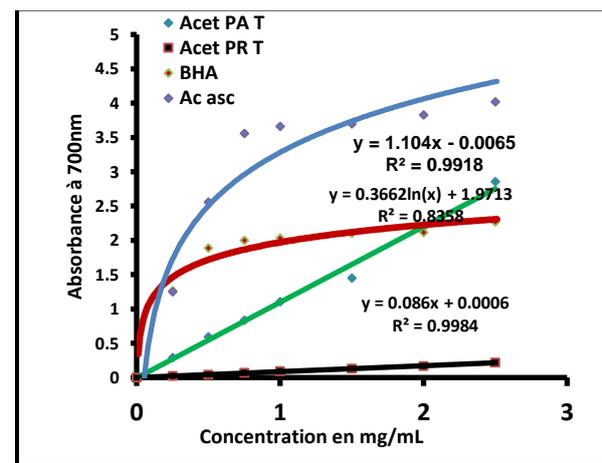
(C) Pouvoir réducteur des fractions acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne et des racines d'*E. spinosus*



(D) Pouvoir réducteur des fractions hydro-acétoniques des extraits de la partie aérienne et des racines d'*E. spinosus*.



(E) Pouvoir réducteur des fractions butanoliques de la partie aérienne et des racines de la plante *E. spinosus*



(F) Pouvoir réducteur des fractions acétate d'éthyle de la partie aérienne et racines de la plante *E. spinosus*.

Figure N°20 : Pouvoir réducteur des différents extraits de la plante *E. spinosus*.

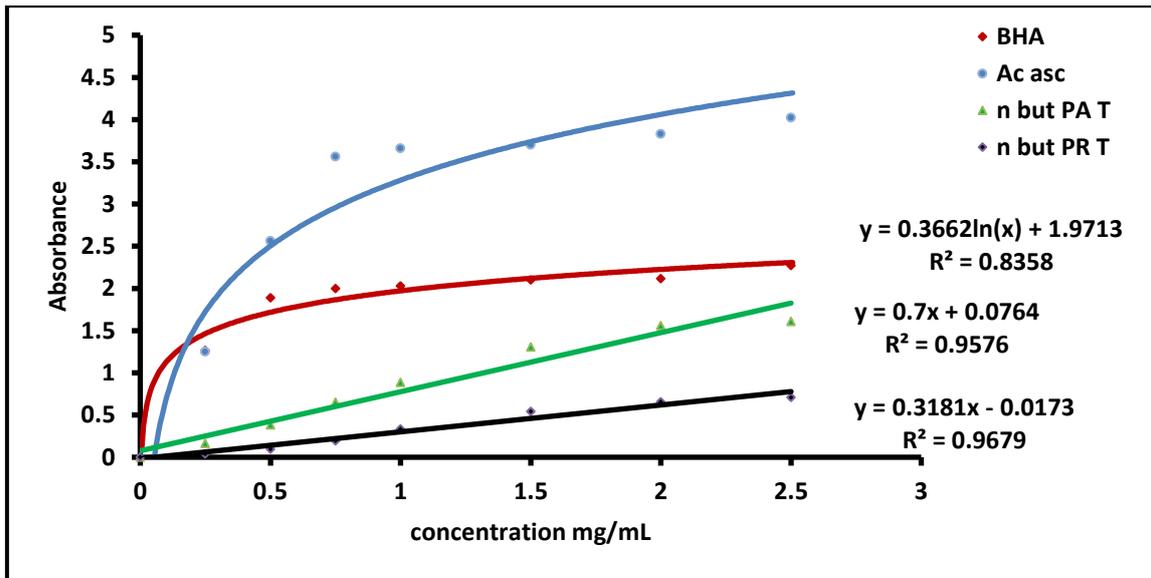


Figure N° 21: pouvoir réducteur de la fraction n-buthanol des tanins de la partie aérienne et des racines de la plante *E. spinosus*.

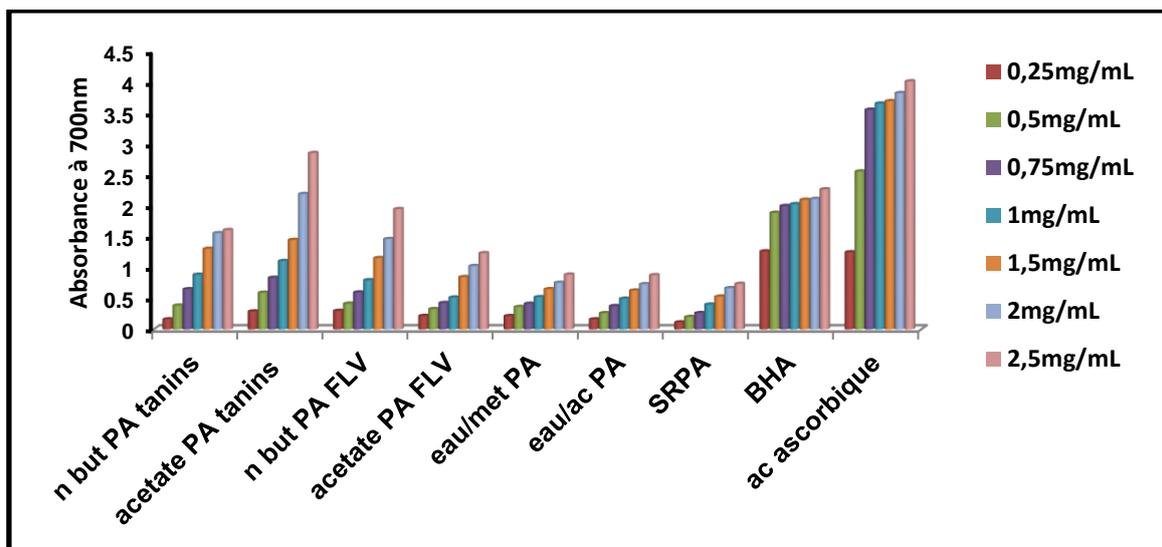


Figure N° 22 : pouvoir réducteur des extraits de la partie aérienne d'*Echinops spinosus*.

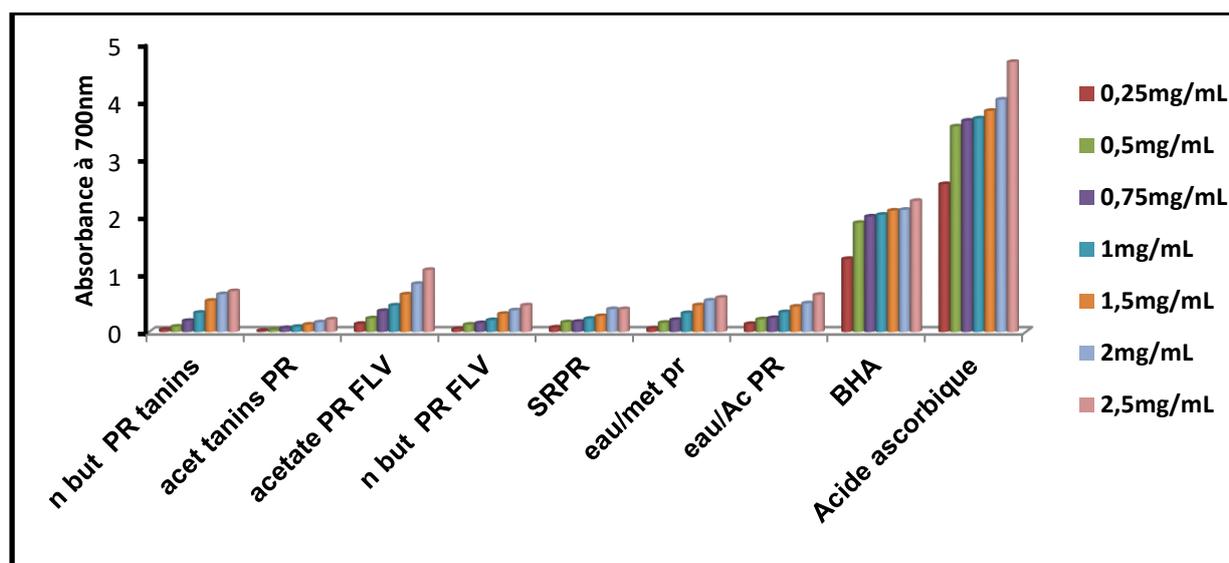


Figure N°23 : pouvoir réducteur des extraits des racines d'*Echinops spinosus*.

L'analyse statistique montre qu'il y a une forte corrélation significative ($R^2=1$, $P=0,01^{**}$) entre les extraits de la partie aérienne et des racines, ceci explique la richesse de la plante en métabolites secondaires.

4.1.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

Les résultats de piégeage du radical libre DPPH sont regroupés dans le **Tableau N°7**.

Les analyses statistiques ont montré que les valeurs des IC_{50} des extraits des deux parties de la plante *E. spinosus* sont significativement différentes.

Nous pouvons dire que l'extrait des tanins de la phase acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante qui présente la plus forte capacité à piéger le radical libre soit une $IC_{50} = 8,25 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$ (cette valeur reste supérieure à celle obtenue avec le BHA avec une $IC_{50}=5,75 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$, suivie de l'extrait des flavonoïdes de la phase n-buthanol des racines avec une $IC_{50}=16,25 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$ et ensuite vient l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne avec une IC_{50} égale à $17,25 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$, tandis que l'extrait acétate d'éthyle des tanins des racines est moins actif par rapport aux extraits précédents avec une IC_{50} égale à $23 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$. D'après la **figure N°24**, nous notons que c'est la partie aérienne qui présente la meilleure capacité de piégeage du radical libre DPPH par rapport aux racines, mis à part deux extraits qui sont : l'extrait hydro-méthanolique et l'extrait buthanolique des flavonoïdes ou c'est l'inverse. Cela peut être dû à la composition chimique de l'extrait et la nature du solvant utilisé.

Ces résultats confirment que les deux parties d'*E. spinosus* présentent une grande aptitude à piéger le DPPH. Cette propriété montre que le potentiel antioxydant de la plante est avéré.

Tableau N°7: Valeurs des IC₅₀ (en µg/mL) des extraits des deux parties de la plante *E. spinosus*.

Extraits		IC ₅₀ (µg/mL)	
Partie aérienne	Extraits bruts	Aqueux (Macération 24h)	79,5±0,02
		Aqueux (sous reflux)	62,5±0,01
		Eau/méthanol	54,25±0,1
		Eau/acétone	39,5±0,03
	Extraits spécifiques	Flavonoïdes : fraction Acétate d'éthyle	17,25±0,002
		Flavonoïdes : fraction n-buthanol	24±0,003
		Tanins : fraction Acétate d'éthyle	8,25±0,001
		Tanins : fraction n-buthanol	59,5±0,05
Partie racine	Extraits bruts	Aqueux (Macération24h)	79,5±0,01
		Aqueux (sous reflux)	87,5±0,02
		Eau/méthanol	40,75±0,02
		Eau/acétone	55,5±0,03
	Extraits spécifiques	Flavonoïdes : fraction Acétate d'éthyle	47,75±0,01
		Flavonoïdes ; fraction n-buthanol	16,25±0,004
		Tanins : fraction acétate d'éthyle	23±0,03
		Tanins : fraction n-buthanol	71±0,014
Butyl-hydroxyanisol (BHA)		5,75±0,02	
Acide ascorbique		2,5±0,01	

Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **Boudjlel en 2013** sur *Artemisia herba alba* qui ont montré que l'extrait méthanolique présente une IC₅₀=0,56mg/mL, ainsi que ceux de **Chahmi et ses collaborateurs** sur *Inula viscosa* montrent que l'extrait acétate d'éthyle présente une IC₅₀ égale à 120mg/L (**Chahmi et coll., 2015**).

Il est à noter que la forte capacité de l'extrait acétate d'éthyle peut être due à la présence des tanins galliques et des dimères pro-anthocyanidols (**Seigler, 1986**).

Selon **Turkmen et ses collaborateurs en 2007**, les polyphénols semblent être des donneurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. Les flavonoïdes quant à eux apportent une protection contre les radicaux libres en empêchant leur liaison avec les lipides membranaires des cellules ; ce qui se traduit par une diminution du malonyl dialdéhyde (peroxyde lipidique) une prévention contre la leucopénie et la thrombopénie observées en présence des

radicaux libres [(Chaudhuri *et coll.*, 2007) ; (Chandana Venkateswara et Vijayakuma, 2008)].

En effet, les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (Bourgou *et coll.*, 2008).

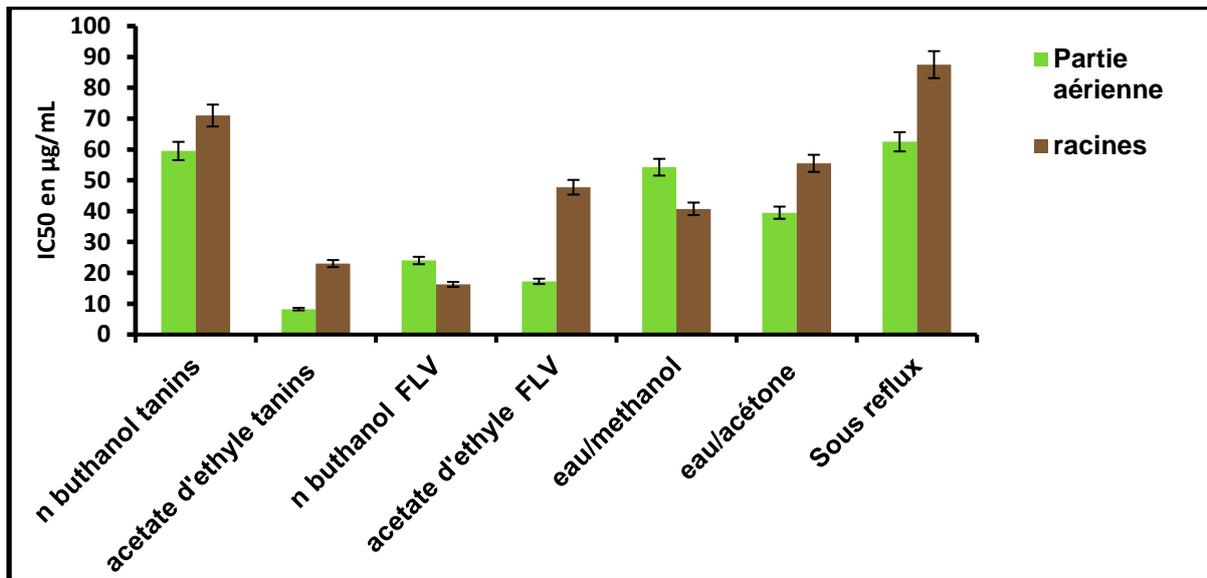


Figure N° 24 : comparaison des IC₅₀ des deux parties de la plante *Echinops spinosus*.

4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

4.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

4.2.1.1. Diffusion sur milieu solide (méthode des disques).

Les tests antibactériens réalisés en utilisant la méthode de dilution en milieu solide effectués sur huit souches ont donné des résultats qui sont consignés dans le **Tableau N°8**. Ces résultats expriment les diamètres des zones d'inhibitions des différents extraits.

En effet, les diamètres d'inhibition varient de 6 à 14 mm pour les souches à Gram positif (+) et de 6 à 10 mm pour les souches à Gram négatif (-).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydro-méthanolique de la partie aérienne présente le diamètre d'inhibition le plus élevé vis-à-vis *Bacillus subtilis*, soit 14 mm suivie de l'extrait acétate d'éthyle des tanins de la même partie avec un diamètre de 11 mm vis-à-vis la même souche, ainsi que l'extrait acétate d'éthyle des tanins présente un diamètre d'inhibition de 11 mm vis-à-vis *Staphylococcus aureus*. Ces diamètres restent toujours inférieur à celui de la gentamycine.

Il est important de souligner que les valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues se sont révélées supérieures à celles trouvées par les travaux de **Chikhi et ses collaborateurs** en **2013** sur les phagnalons vis-à-vis les souches *S. aureus*, *S. typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae* qui ont des diamètres d'inhibition ne dépassant pas 7mm pour l'extrait aqueux, cependant, les travaux de **Boudjel en 2013** montrent que l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba* exerce une activité inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* ATCC6538 avec une zone d'inhibition égale à 18mm et une zone égale à 13 mm sur *Escherichia coli* ATCC25922, ce qui est supérieur par rapport à nos résultats.

Tableau N° 8: Zone d'inhibition des différents extraits de la plante *E. spinosus*.

Extraits		Diamètre de zones d'inhibition (mm)							
		Bactéries à Gram positif				Bactéries à Gram négatif			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> MDRCA	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterobacter Cloacea</i>
Partie aérienne	Brut aqueux (sous reflux)	7	6	7	7	6	7	6	7
	Brut hydro-méthanolique	7	6	6	14	6	6	8	7
	Flavonoïdes ; Fraction acétate d'éthyle	11	6	7	9	6	8	7	7
	Flavonoïdes Fraction n-buthanol	6	6	7	6	6	7	6	7
	Tanins Fraction acétate d'éthyle	10,5	6	7	11	6	7	7	7
	Tanins Fraction n-buthanol	9,5	7	7	7	6	6	7	7
Racines	Brut aqueux (sous reflux)	9,5	6	6	6	6	6	6	7
	Brut hydro-méthanolique	7	8	7	7	6	7	6	7
	Flavonoïdes ; Fraction acétate d'éthyle	8	6	10	8	6	9	8	8
	Flavonoïdes Fraction n-buthanol	6	6	6	6	6	6	7	7
	Tanins Fraction acétate d'éthyle	13	6	8,5	9	7	10	7	7
	Tanins Fraction n-buthanol	9	6	7	7	6	6	6	7
DMSO		6	6	6	6	6	6	6	6
Gentamycine		21,33	-	23	25	21,5	14	25	18

D<8mm (**Résistante**), 9mm>D<14mm (**sensible**), 15mm>D<19mm (**très sensible**), D>20mm (**extrêmement sensible**) (Moreira et coll., 2005).

4.2.1.2. Technique de microdilution.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents extraits d'*Echinops spinosus* vis-à-vis les bactéries sont représentées dans le **Tableau N°9**. Après 24h d'incubation à 37°C, on a observé une augmentation progressive du nombre de colonies au fur et à mesure que la concentration des extraits diminue. Cette augmentation du nombre de colonies est plus remarquable pour les extraits bruts que pour les extraits spécifiques.

Nous remarquons que l'extrait acétate d'éthyle des tanins de la partie aérienne est le plus actif vis-à-vis les souches *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* avec une CMI égale à 0,331mg/mL.

L'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne quant à lui présente un effet inhibiteur vis-à-vis l'ensemble des souches testées, cependant pour les extraits bruts, la concentration minimale inhibitrice est plus ou moins élevée en la comparant avec les extraits spécifiques, enregistrant des CMI qui atteignent 50mg/mL. Ces résultats montrent une différence significative de valeurs pour les extraits étudiés qui pourrait être expliquée par la différence de croissance et de métabolisme bactérien, des conditions de croissance requises spécifiques à chaque type de bactérie (milieu de culture approprié) et la nature du solvant utilisé pour l'extraction ainsi que par la composition chimique de chaque extrait.

Certains auteurs ont montré que les tanins fragilisent la paroi cellulaire par inhibition des enzymes microbiens et forment ainsi un complexe avec la paroi cellulaire pour la rendre perméable [(Dixon et coll., 2005) ; (Engels et coll., 2011)] en agissant sur la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, inhibant ainsi l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines (Gescher et coll., 2011).

concernant les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB), les valeurs varient d'un extrait à un autre. Pour la fraction acétate d'éthyle des tanins de la partie aérienne, on note une CMB égale à 0,331mg/mL contre *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*, elle est égale à 0,662mg/mL contre *E.coli* et *Klebsiella pneumonia*, elle est égale à 1,325mg/mL contre *Salmonella typhimurium* et *Enterobacter baumani* cela indique une bonne activité bactéricide de nos extraits sur l'ensemble des souches testées (**Tableau N°10**).

Les résultats de certains auteurs ont mis en exergue l'activité antibactérienne et antifongique des astéracées entre autre *Tridax procumbens* et *Chromolaena odorata*, et ont montré que les extraits éthanoliques des écorces de racines de cette dernière ont une activité antibactérienne très élevée sur *Staphylococcus aureus*.

(NCTC 6571), sur *E. coli* **(NCTC11699)**, *Klebsiella sp*, et sur le genre *Bacillus* avec des CMI comprise entre 0,0625 et 0,5 mg/mL **[(Irobi, 1997) ; (Ngono Ngane, 2006)]**.

Ainsi, les travaux menés par **Side Larbi et ses collaborateurs** sur l'extrait méthanolique de la plante *Anacyclus valentinus* ont montré des CMI allant de 3,125 mg/mL à 12,5mg/mL et des CMB allant de 25 à 50 mg/mL **(Side larbi et coll., 2016)**.

Il convient de noter que l'activité antibactérienne dépend également du stade de croissance des cellules bactériennes. En effet, selon **Bakkali et ses collaborateurs**, les cellules en division seraient plus sensibles, ceci serait probablement dû au fait que les extraits pénètrent plus efficacement dans les sites en pleine croissance **(Bakkali F., 2008)**.

D'après la littérature, les différents composants contenus dans les extraits de plantes (polysaccharides, acides gras et phospholipides) agissent comme tout agent antimicrobien en ciblant la paroi et la membrane de la cellule bactérienne en la rendant plus perméables. La fuite du contenu bactérien et des ions provoquerait alors la lyse et la mort cellulaire **(Flamini, 1999)**.

Tableau N°9 : Activité antibactérienne par méthode de diffusion sur milieu liquide des deux parties de la plante *Echinops spinosus*.

Bactéries Extraits		CMI (mg/mL)							
		Bactéries à Gram positif (+)				Bactéries à Gram négatif (-)			
		<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> <i>MRSA</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klepsiella</i> <i>pneumoniae</i>	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	<i>Enterobacter</i> <i>baumannii</i>
Partie aérienne	Brut aqueux	12,5	25	12,5	12,5	25	25	12,5	25
	Eau/méthanol	12,5	25	3,125	50	25	50	25	12,5
	Flavonoïdes ; Fraction acétate d'éthyle	7	0,875	0,875	0,875	0,437	1,75	3,5	1,75
	Flavonoïdes : Fraction n- buthanol	20	10	20	10	10	10	10	10
	Tanins : Fraction acétate d'éthyle	10,6	1,325	0,331	0,331	0,662	0,662	1,325	1,325
	Tanins : Fraction n- buthanol	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
racines	Brut aqueux	50	50	12,5	50	12,5	25	12,5	50
	Brut hydro- méthanolique	31,2	3,125	3,9	12,5	3,9	50	12,5	12,5
	Flavonoïdes : Fraction acétate d'éthyle	8	17,5	8	8	8	17,5	8	17,5
	Flavonoïdes : Fraction n- buthanol	2	16	8	4	8	8	8	16
	Tanins : Fraction acétate d'éthyle	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
	Tanins Fraction n- buthanol	10	10	10	10	10	10	10	10
Gentamycine ($\mu\text{g/mL}$)		0,19	-	0,5	-	0,39	3,12	0,78	-

Tableau N°10 : Concentrations minimales bactéricides des différents extraits de la plante *Echinops spinosus*.

Bactéries Extraits		CMB (mg/mL)							
		Bactéries à Gram (+)				Bactéries à Gram (-)			
		<i>S. aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterobacter baumannii</i>
Partie Aérienne	Brut aqueux	12,5	25	12,5	12,5	25	25	25	25
	Brut hydro- méthanolique	12,5	25	3,125	50	25	50	25	12,5
	Flavonoïdes Acétate d'éthyle	7	1,75	1,75	1,75	0,437	1,75	3,5	1,75
	Flavonoïdes n-buthanol	20	10	20	10	10	10	10	10
	Tanins Acétate d'éthyle	10,6	1,325	0,331	0,331	0,662	0,662	1,325	1,325
	Tanins n-buthanol	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2
Racines	Brut aqueux	50	50	12,5	50	12,5	25	12,5	50
	Brut hydro- méthanolique	31,2	6,25	3,9	25	3,9	50	12,5	12,5
	Flavonoïdes Acétate d'éthyle	8	17,5	8	8	8	17,5	8	17,5
	Flavonoïdes n-buthanol	4	16	16	8	8	8	16	16
	Tanins Acétate d'éthyle	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
	Tanins n-buthanol	10	10	10	10	10	10	10	10

Pour les flavonoïdes, étant donné que ces derniers sont synthétisés par les plantes suite à une infection microbienne, il n'est donc pas surprenant qu'ils possèdent des propriétés antimicrobiennes (Cowan, 1999).

La catéchine par exemple est douée de propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales [(Friedman et coll., 2006) ; (Cushnie et coll., 2003)].

De plus, plusieurs chercheurs ont montré que les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Babayi et coll., 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska et coll., 2006), *Enterococcus faecalis*,

Enterobacter cloacae, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* [(Didrak, 1999) ; (Modak, 2001) ; (Okigbo et coll., 2005)].

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, quelques études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites ; comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (Dadi et coll., 2009). En effet, selon les travaux de **Dadi et ses collaborateurs**, la quercétine serait capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes : Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité et bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase. Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement.

4.3. Evaluation de l'activité antifongique

4.3.1. Méthode de diffusion sur milieu solide (méthode de disque).

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition fongique d'*Echinops spinosus* sont répertoriés dans le **Tableau N°11**.

Nous constatons que l'extrait n-buthanol des flavonoïdes de la partie aérienne est actif sur les trois souches testées avec des diamètres d'inhibition de 25 mm vis-à-vis *Candida albicans* IP444 et ATCC26790 et de 15 mm pour *Candida albicans* ATCC10231.

De plus, l'extrait n-buthanol des tanins est actif sur *Candida albicans* ATCC10231 avec un diamètre d'inhibition de 16 mm.

L'extrait n-buthanol des tanins des racines est actif vis-à-vis *Candida albicans* ATCC 26790 avec un diamètre d'inhibition de 25mm, cependant, pour *Candida albicans* IP444, il s'est avéré qu'elle est sensible à l'extrait acétate d'éthyle des tanins.

Pour *Candida albicans* ATCC10231, nous notons que cette dernière est sensible à l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes et l'extrait n-buthanol des tanins avec des diamètres de zones d'inhibitions égale à 16,5 mm et 14 mm respectivement.

Tableau N°11 : Diamètre des zones d'inhibitions fongiques de la plante *Echinops spinosus*.

Extraits			Diamètre de zone d'inhibition (mm)		
			<i>Candida albicans</i> IP444	<i>Candida albicans</i> 10231	<i>Candida albicans</i> 26790
Partie aérienne	Extraits bruts	Sous reflux (aqueux)	6	10	6
		Eau/méthanol	6	7	-
		Eau/acétone	6	7	-
	Extraits spécifiques	Acétate d'éthyle flavonoïdes	8,5	11	8,5
		n-buthanol flavonoïdes	25	15	25
		Acétate d'éthyle tanins	9	9	9
		n-buthanol tanins	8	16	8
racines	Extraits bruts	Sous reflux (aqueux)	8	10	7
		Eau/méthanol	9	6	8
		Eau/acétone	6	7	8
	Extraits spécifiques	Acétate d'éthyle flavonoïdes	11	16,5	7
		n-buthanol flavonoïdes	7	7	7,5
		Acétate d'éthyle tanins	17	7	10
		n-buthanol tanins	6	14	25

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car d'une part cette plante est étudiée pour la première fois pour son effet antifongique vis-à-vis les souches de *Candida albicans*, d'autre part, l'utilisation des différentes parties des plantes appartenant à la famille des astéracées, les méthodes d'extractions des extraits ainsi que leurs concentrations peuvent réduire la fiabilité de la comparaison entre les études.

Nos résultats sont supérieurs à ceux des travaux de recherche d'*Artemisia campestris* qui ont montré que l'extrait méthanolique de cette dernière présente une zone d'inhibition égale à 10 mm (Deliu et coll.,2013).

4.3.2. Détermination des CMI par la méthode de microdilution

Les résultats relevés lors de l'analyse statistique témoignent d'une différence significative entre les réponses des trois levures vis-à-vis des extraits étudiés

($P < 0,05^*$), quelque soit l'organe d'extraction. Sous l'action des différents extraits spécifiques, c'est la fraction n-butanol des flavonoïdes de la partie aérienne qui présente l'inhibition la plus forte vis à vis *Candida albicans* ATCC10231 soit une CMI égale à 0,156 mg/mL, suivie de la fraction acétate d'éthyle des flavonoïdes des racines avec une CMI égale à 0,312 mg/mL et 0,625 mg/mL vis-à-vis des souches *Candida albicans* ATCCIP444 et *Candida albicans* ATCC26790 respectivement, tandis que pour les extraits bruts c'est l'extrait aqueux qui présente une forte inhibition vis-à-vis *Candida albicans* ATCC26790 dans les deux parties de la plante *E.spinosus*. Les concentrations minimales inhibitrices sont égales à 3,75 mg/mL et 7,5 mg/mL pour la partie aérienne et les racines respectivement (**Tableau N°12**).

Les résultats relatifs aux concentrations minimales fongicides (CMF) montrent des valeurs variables qui sont très proches, souvent égales et parfois deux fois la CMI.

Cet effet fongicide enregistré pour la plante *Echinops spinosus* est minimal sur *Candida albicans* IP444 (CMF=0,156 mg/mL) et maximal sur *Candida albicans* ATCC10231 (CMF=120 mg/mL).

Il faut signaler que sur l'ensemble des extraits testés, nous avons noté une activité inhibitrice fongicide préférentielle de l'extrait n-butanol des flavonoïdes de la partie aérienne (CMF=0,156 mg/mL) et de l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes des racines (CMF=0,312 mg/mL) vis-à-vis *Candida albicans* IP444 et *Candida albicans* ATCC10231 respectivement. De plus, l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes et l'extrait hydro-acétonique des racines présentent une activité fongicide très intéressante égale à 0,626mg/mL vis-à-vis *Candida albicans* 26790.

Les extraits n-butanol des tanins et acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne quant à eux, présentent un effet fongicide ne dépassant pas 2 mg /mL pour l'ensemble des souches, à l'exception de *Candida albicans* ATCC 26790 où la CMF est égale à 3,75 mg/mL pour l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne. Pour les autres extraits, nous remarquons que la concentration minimale fongicide est variable d'un extrait à un autre, cependant cette activité est très faible pour l'extrait hydro-méthanolique et l'extrait hydro-acétonique de la partie aérienne puisque les trois souches présentent une CMF très élevée sous leurs actions.

Il est toutefois important de noter que les trois souches de *Candida albicans* considérées comme étant les plus pathogènes ont été inhibées par les extraits de la plante *Echinops spinosus* et avec des CMI et CMF très intéressants ceci confirme

son usage traditionnel et concordent avec les résultats trouvés lors de l'enquête ethnobotanique qui l'utilisent contre les candidoses.

Plusieurs études se sont penchées sur les propriétés antifongiques des astéracées.

Ahossi et ses collaborateurs ont montré que la susceptibilité des différentes espèces fongiques dépend de la concentration de l'extrait utilisé (**Ahossi et coll., 2014**).

Kurita et Koike ont étudié l'activité antifongique des composés phénoliques. Ils se sont rendu compte que celle-ci augmente avec l'hydrophobicité de ces composés, ce qui suggère des interactions hydrophobes entre ces composés et les cellules fongiques testées (**Kurita et Koike ,1982**).

Les travaux de recherche menés sur *Acanthospermum hispidum* ont montré que l'extrait brut aqueux présente une CMF supérieur à 50 mg/mL (**Basile A., 2015**).

Nos extraits présentent un effet fongicide élevé en le comparant avec les extraits des écorces de *Guarea cedrata* et *Khaya ivorensis* ayant toutes les deux une CMF égale à 100 mg/mL sur *Candida albicans* (**Coulibaly et coll., 2010**).

Malgré l'activité des extraits vis-à-vis des souches testées, ces derniers et surtout les extraits bruts ont une faible activité antimicrobienne par rapport aux extraits spécifiques, cela est probablement dû à la compétition de l'ensemble des métabolites secondaires présents dans un même extrait et /ou la faible solubilité des extraits surtout quand leurs concentrations est élevée.

L'analyse des méthodes employées, par l'ensemble des travaux répertoriés, pour la détermination de la CMI a mis en évidence une grande variabilité entre les études. En effet, nous avons constaté que la majorité des études ont fait appel à la technique de diffusion en milieu liquide, et plus précisément à celle de la microdilution sur microplaque de 96 puits. Selon l'étude de **Budzyńska et ses collaborateurs en 2009**, cette technique est plus sensible que la méthode de diffusion en milieu solide offrant une meilleure précision et une meilleure reproductibilité des résultats.

Tableau N°12: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentration minimales fongicides (CMF) des extraits d'*Echinops spinosus*.

Souches de référence		<i>Candida albicans</i> ATCC10231		<i>Candida albicans</i> IP444		<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	
		CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
Partie aérienne	Aqueux (sous reflux)	15	15	30	30	3,75	3,75
	Eau/méthanol	60	60	120	120	60	60
	Eau/acétone	120	120	120	120	120	120
	Flavonoïdes Fraction acétate d'éthyle	2	2	1,62 5	1,62 5	3,75	3,75
	Flavonoïdes Fraction n-buthanol	0,156	0,15 6	6,5	6,5	10	10
	Tanins Fraction acétate d'éthyle	5,11	5,05	5,02	5,02	5,225	5,11
	Tanins Fraction n-buthanol	2	2	1	2	1,125	1,125
racines	Aqueux (sous reflux)	30	30	30	30	7,5	7,5
	Eau/méthanol	11,1	11,1	5,55	5,55	5,55	5,55
	Eau/acétone	20	20	3,75	1,87 5	0,625	0,625
	Flavonoïdes fraction acétate d'éthyle	5	5	0,3 12	0,31 2	0,625	0,625
	Fla Flavonoïdes Fra fraction n-buthanol	30	30	30	30	30	30
	Tanins fraction acétate d'éthyle	10	10	10	10	10	10
	Tanins fraction n-buthanol	10	10	2,5	1,25	10	10
	Amphotéricine B (µg/mL)	CMI=0,3906			CMF=1,1718		

4.3.3. Corrélation entre les souches fongiques (CMI)

L'analyse statistique effectuée à l'aide du logiciel SPSS par test de corrélation entre l'ensemble des souches, montre un coefficient de corrélation r inférieur ou égale à 1. Il est de l'ordre de 0,96 entre *Candida albicans* 10231 et *Candida albicans* IP444, de l'ordre de 0,91 entre *Candida albicans* 10231 et *Candida albicans* 26790, et de l'ordre de 0,9 entre *Candida albicans* 26790, et *Candida albicans* IP444. Ces résultats confirment qu'il y a une très forte corrélation entre les CMI des extraits vis-à-vis les souches testées.

4.3.4. Comparaison entre les deux méthodes de l'activité antifongique par test de corrélation

La comparaison des deux méthodes de l'activité antifongique témoignent qu'il y'a une faible corrélation négative entre les deux méthodes utilisées, soit la méthode des disques et la méthode des CMI, cela signifie qu'il y'a pas une relation significative entre les deux méthodes pour les trois souches testées ($R^2 = -0,255$, $R^2 = -0,261$, $R^2 = -0,267$), ($P > 0,05$) car l'une est qualitative et l'autre est quantitative, cela peut dépendre de plusieurs paramètres entre autre la mal diffusion de l'extrait, et sa solubilité (figure N°25 , figure N°26, figure N° 27.

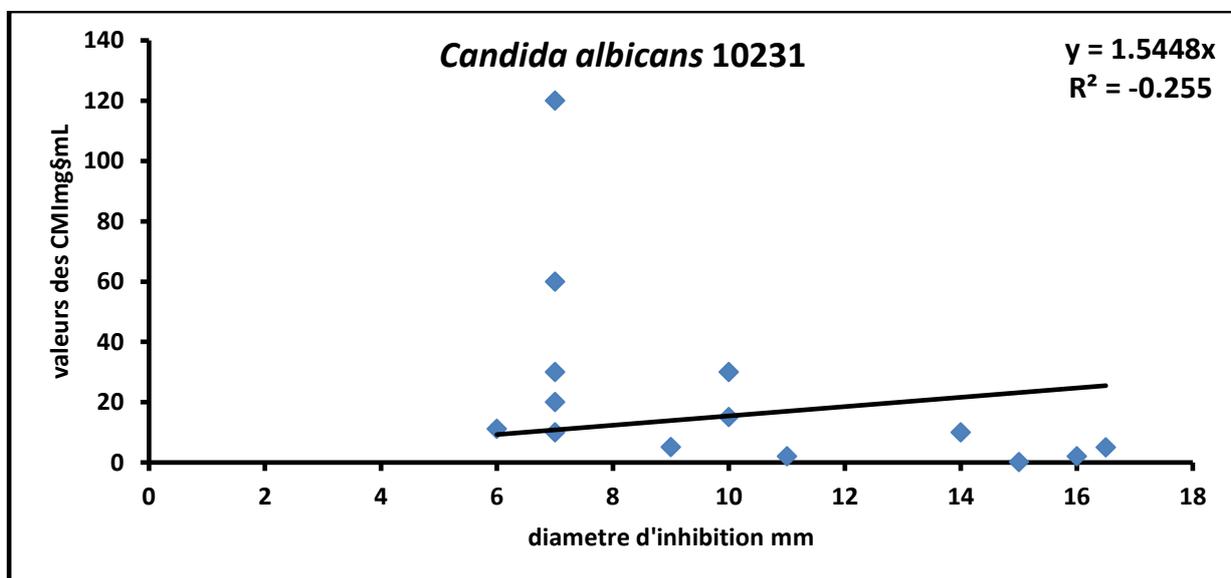


Figure N°25 : Corrélation entre le diamètre d'inhibition et les CMI pour la souche *Candida albicans* 10231.

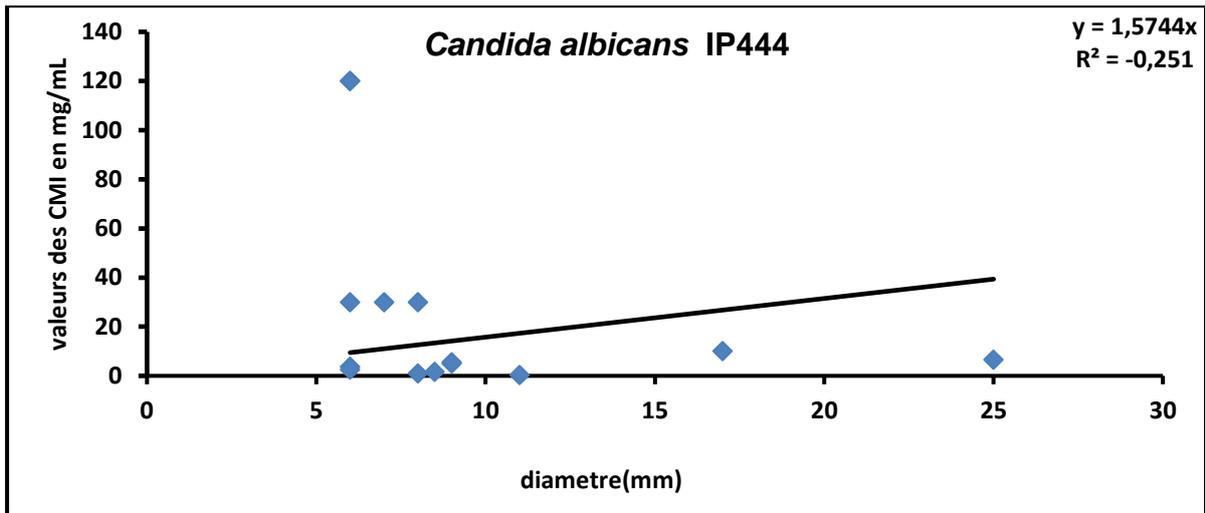


Figure N°26 : Corrélation entre le diamètre d'inhibition et les CMI pour la souche *Candida albicans* IP444.

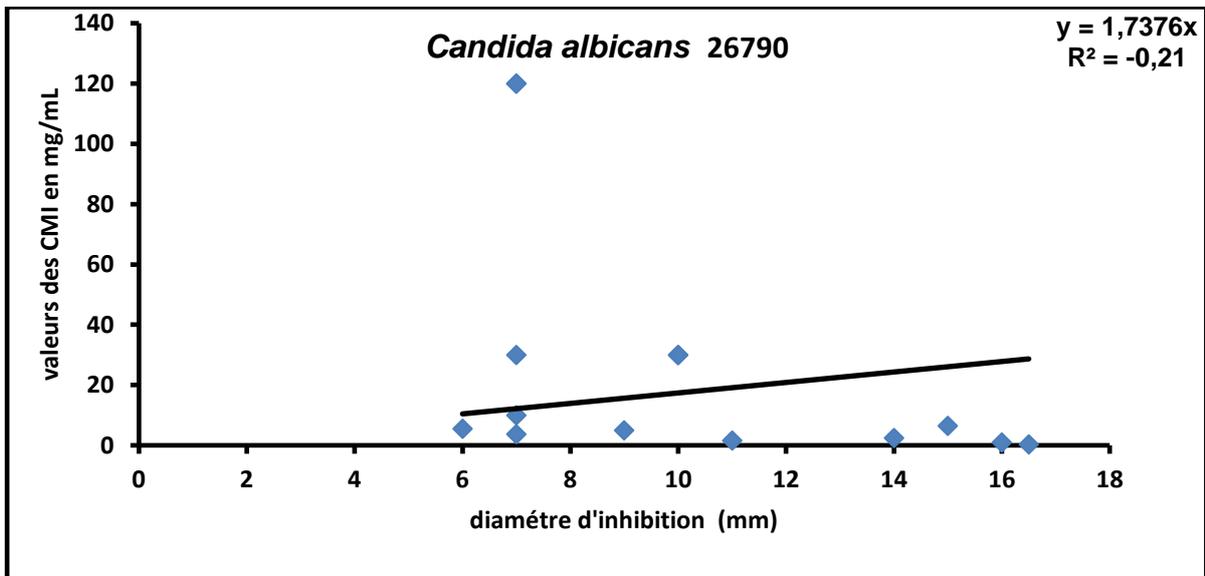


Figure N°27 : Corrélation entre le diamètre d'inhibition et les CMI pour la souche *Candida albicans* 26790.

4.4. L'évaluation de l'activité hémolytique

L'évaluation des activités biologiques des extraits naturels requiert l'évaluation de leurs activités hémolytiques vis-à-vis les érythrocytes.

La capacité anti-hémolytique des extraits est mesurée en suivant le protocole décrit par **(Lee et coll., 2002)**.

La cinétique d'hémolyse obtenue pour l'ensemble des extraits, montre que l'inhibition de l'hémolyse est remarquée pour presque tous les extraits d'une manière dose dépendante.

Le test de l'activité hémolytique est évalué à partir des IC_{50} trouvées de l'activité antioxydante. Pour cela, nous avons pris cinq concentrations (IC_{50} , $2IC_{50}$, $10IC_{50}$, $20IC_{50}$, $40IC_{50}$) pour chaque extrait afin de situer le seuil de concentration responsable de l'hémolyse des érythrocytes **(figures N°28, N°29, N°30, N°31, N°32, N°33, N°34)**

La cinétique de la fuite de l'hémoglobine intracellulaire est suivie pendant 2 heures sous agitation continue à 4000 tours/min à 37°C, la lecture est faite à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis à 548 nm en mesurant à chaque fois le taux de l'hémoglobine après centrifugation en additionnant à la suspension érythrocytaire les extraits à différentes concentrations ainsi que la solution de lavage.

Les résultats de l'activité anti-hémolytique des extraits enregistrent un pouvoir anti-hémolytique allant de 0,005% à 6,83% pour les IC_{50} **(histogrammes 1 et 2)**.

Cependant, ce pouvoir varie de 0,464% à 39,59% pour une concentration qui est 40fois l' IC_{50} **(histogrammes 3 et 4)**.

Les résultats obtenus après 120min d'incubation à 37°C sous agitation continue à une concentration égale à 40fois l' IC_{50} , nous ont permis de classer les extraits selon leurs pouvoir croissant d'hémolyse comme suit : l'extrait aqueux des racines **(2,97%)** < l'extrait n-buthanol des tanins de la partie aérienne **(3 ,725 %)** < l'extrait n-buthanol des flavonoïdes de la partie aérienne **(4,45 %)** < l'extrait acétate d'éthyle des tanins de la partie aérienne **(5,39%)** < l'extrait n-buthanol des flavonoïdes des racines **(5,71%)** < l'extrait aqueux de la partie aérienne **(27,4%)** < l'extrait n-buthanol des tanins des racines **(34,38%)** < l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne **(35,05%)** < l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes des racines **(38,47%)** < l'extrait acétate d'éthyle des tanins des racines **(39,59%)**.

De ce classement nous pouvons déduire que c'est l'extrait aqueux des racines qui présente l'activité anti-hémolytique la plus faible qui est égale à **2,97%**, suivie de l'extrait n-buthanol des tanins de la partie aérienne avec un pourcentage de **3,725%**,

et l'extrait n- buthanol des flavonoïdes avec une activité anti-hémolytique égale à **4,45% (histogrammes 3 et 4)**.

Ces résultats ne dépassent pas 5% de l'hémolyse totale à une concentration qui est 40 fois l'IC₅₀ ce qui prouve que ces extraits ne présentent aucun pouvoir hémolytique vis-à-vis les érythrocytes humains.

Ces résultats prometteurs concordent avec les résultats de l'enquête ethnobotanique qui mentionnent que les racines en décoction sont très recommandés pour le traitement de diverses maladies et qu'ils ne présentent aucun effet secondaire contrairement à la partie aérienne qui est peu utilisée par la population, ceci ne néglige pas l'efficacité de cette dernière qui a enregistré une meilleure activité antioxydante, antibactérienne et antifongique.

En ce qui concerne l'extrait acétate d'éthyle des tanins de la partie aérienne et l'extrait n-buthanol des flavonoïdes des racines, ces derniers présentent un effet hémolytique très léger qui se tourne autour des 5%.

Donc on peut dire que ces extraits peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques.

Nos résultats concordent avec ceux de **Maia et ses collaborateurs en 2009**, qui ont évalué l'activité hémolytique d'extrait sec de l'écorce de *Maytenus guianensis*, et vérifié que cette espèce n'a pas causé d'hémolyse sur les érythrocytes humains et peuvent être utilisés à des fins pharmacologiques.

Plusieurs auteurs se sont intéressés au pouvoir anti-hémolytique des plantes, Toutefois, certains mentionnent que les membranes biologiques peuvent être affecté par les produits naturels présent dans les plantes médicinales (**Mohammedi Z., 2013**). Parmi ces produits naturels, nous pouvons citer les flavonoïdes qui ont des effets bénéfiques sur la stabilité de la membrane érythrocytaire, ces derniers peuvent être incorporé dans la membrane érythrocytaire (**Sharma et coll., 2001**).

De plus, **De Freitas et ses collaborateurs** rapportent que l'interaction des liaisons de Van der Waals à l'intérieur de la bicouche lipidique par les flavonoïdes peuvent être une source de stabilité de la membrane (**De Freitas et coll., 2008**).

Ainsi, il a été montré que les flavonoïdes sont connus pour avoir un rôle préventif contre la cardiotoxicité, et la capacité à prévenir différentes atteintes hématologiques en permettant une bonne régénération érythrocytaire [(**Sadzuka et coll., 1997**) ; (**Chaudhuri et coll., 2007**) ; (**Chandana Venkateswara et Vijayakuma, 2008**)].

cependant, l'hémolyse des érythrocytes entraîne la destruction et la lyse de la membrane. Cette activité d'hémolyse se rapporte à la concentration de l'extrait.

De plus, l'activité hémolytique de chaque extrait est liée à sa composition chimique. Il est à noter que l'extrait aqueux et l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne et l'extrait acétate d'éthyle et n-buthanol des tanins des racines ont une activité hémolytique modérée vis-à-vis des érythrocytes qui dépasse les 30%, cela peut être expliqué par le fait que ces derniers possèdent une forte activité antimicrobienne qui permet la lyse et la destruction de la membrane des cellules microbiennes afin d'évacuer leur contenu.

Nos résultats montrent que cette plante a un effet stabilisateur et protecteur de la membrane érythrocytaire d'une part ce qui va favoriser son utilisation en thérapeutique surtout comme antioxydants et d'autre part, elle a un effet hémolytique qui va servir à son utilisation comme antibiotique et /ou antifongique.

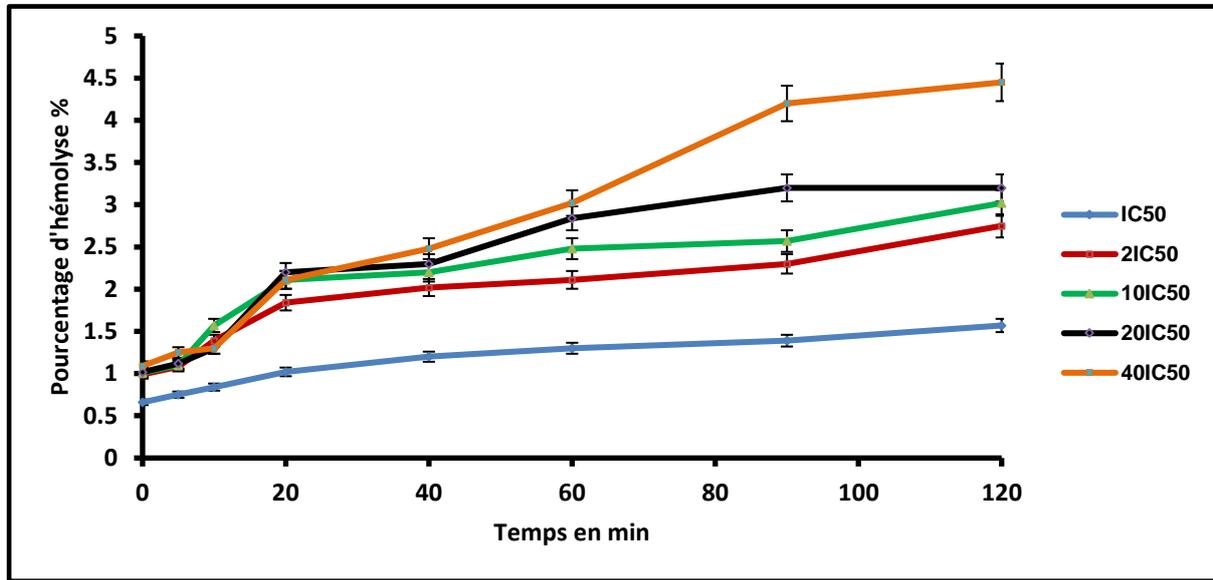


Figure N°28 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction n-buthanol des flavonoïdes.

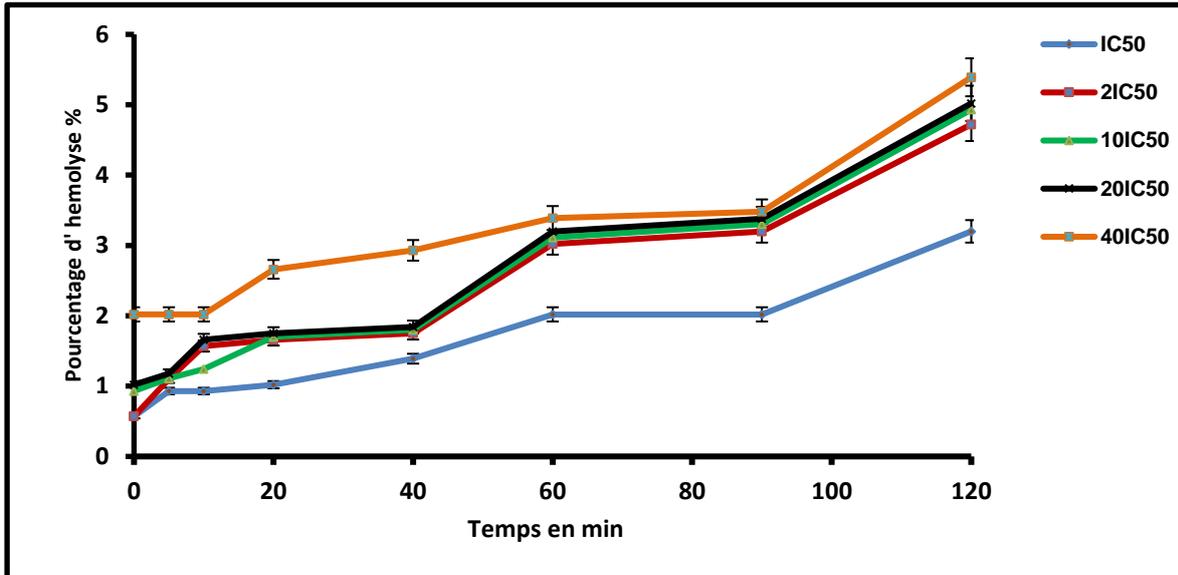


Figure N°29 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction acétate d'éthyle des tanins de la partie aérienne.

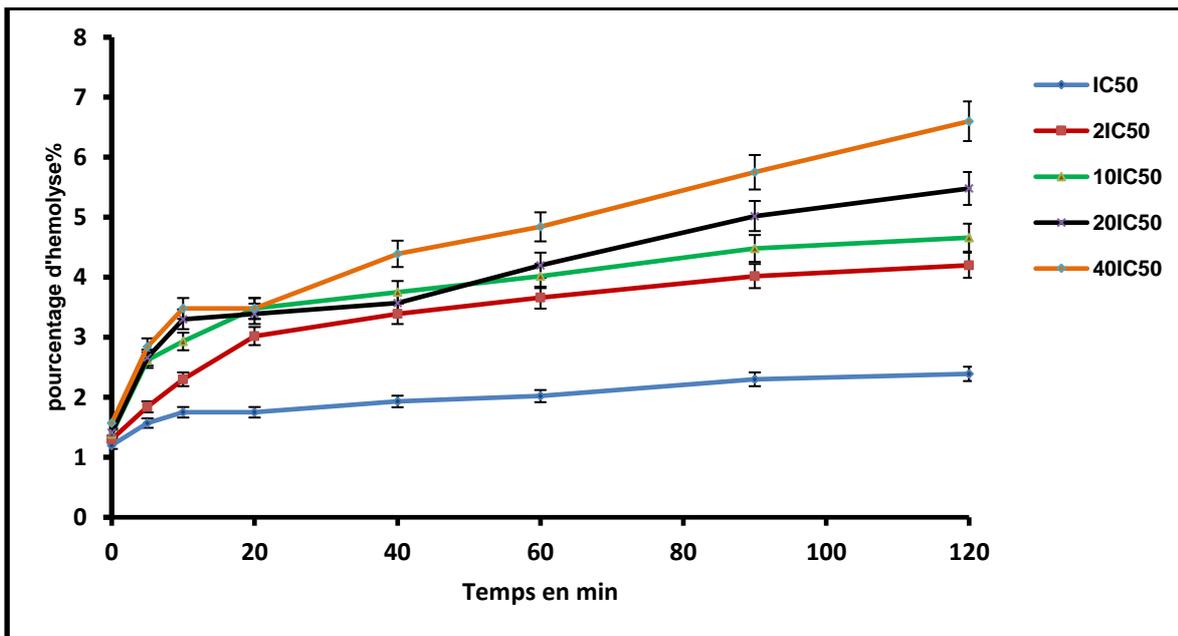


Figure N° 30: pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction n-butanol des tanins de la partie aérienne.

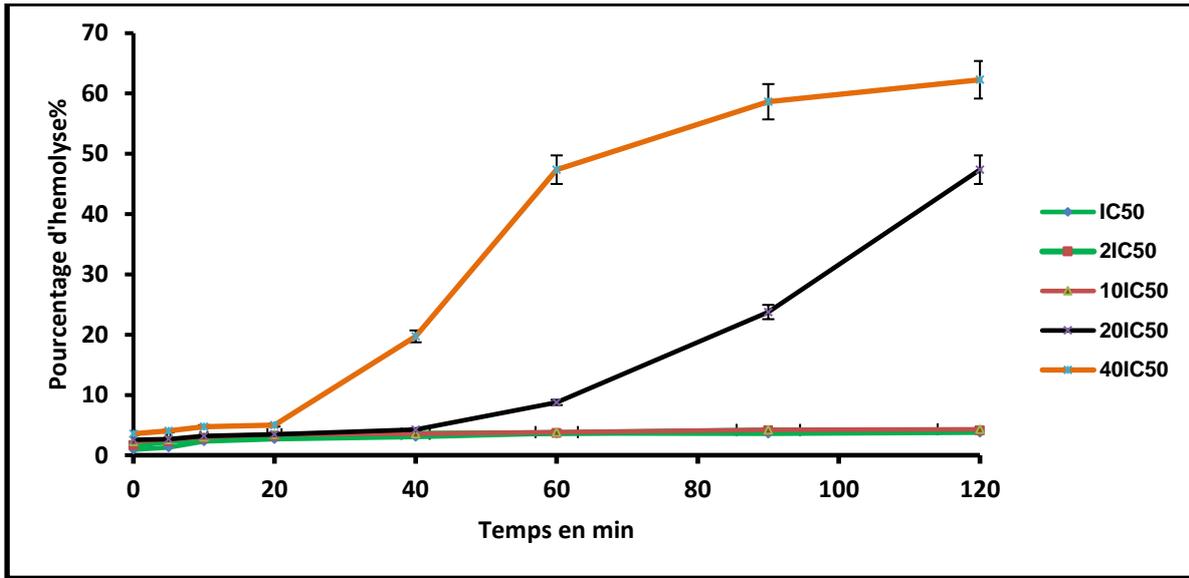


Figure N°31 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction acétate d'éthyle des tanins des racines.

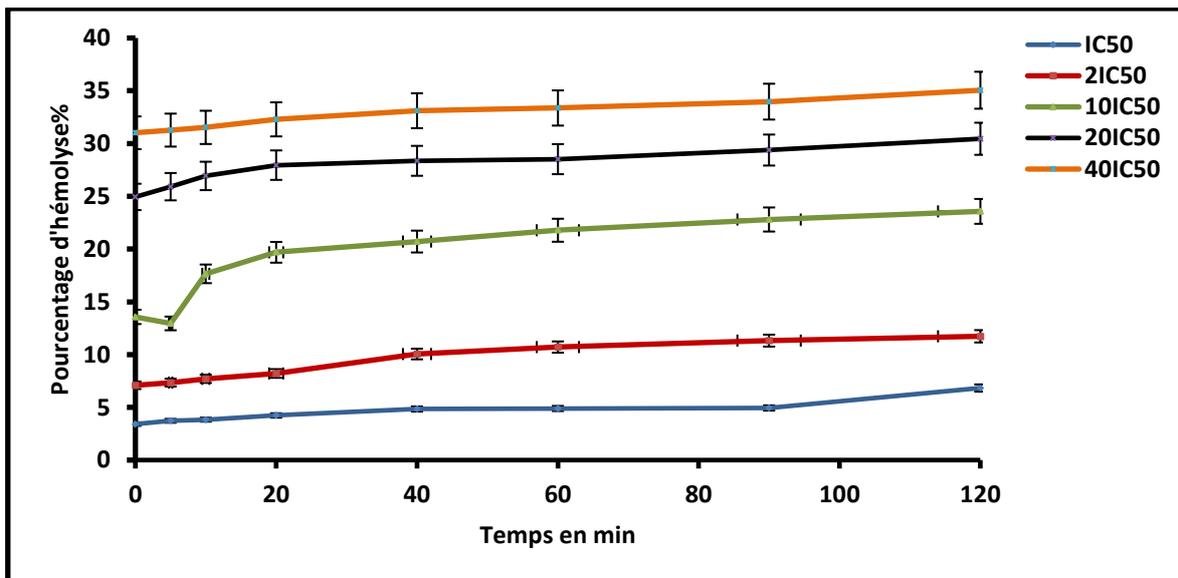


Figure N°32 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne.

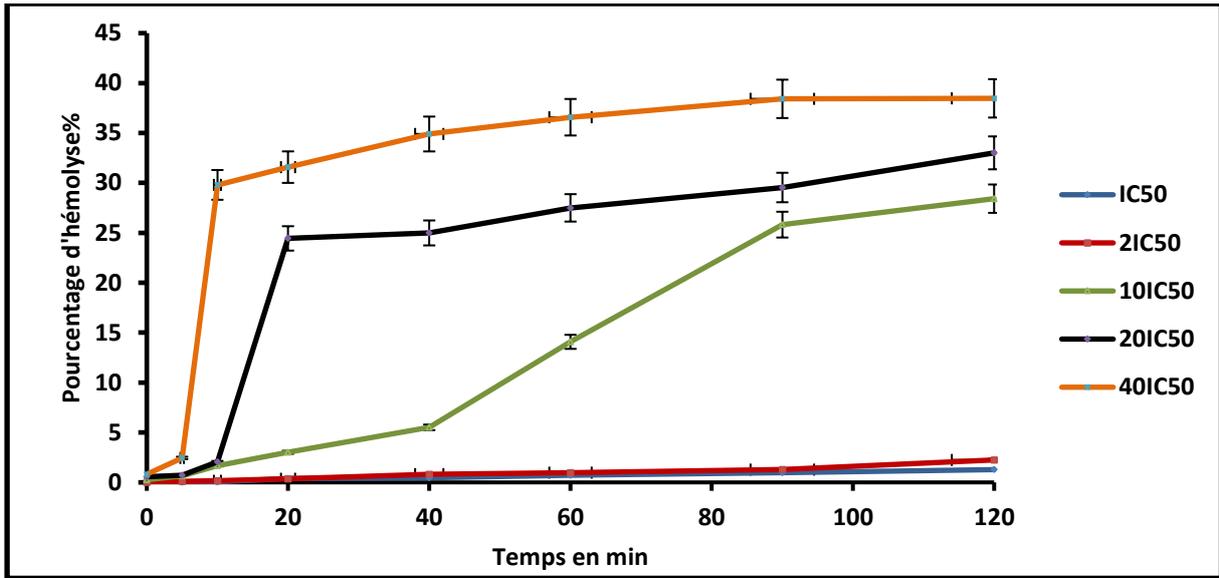


Figure N°33 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction acétate d'éthyle des flavonoïdes des racines.

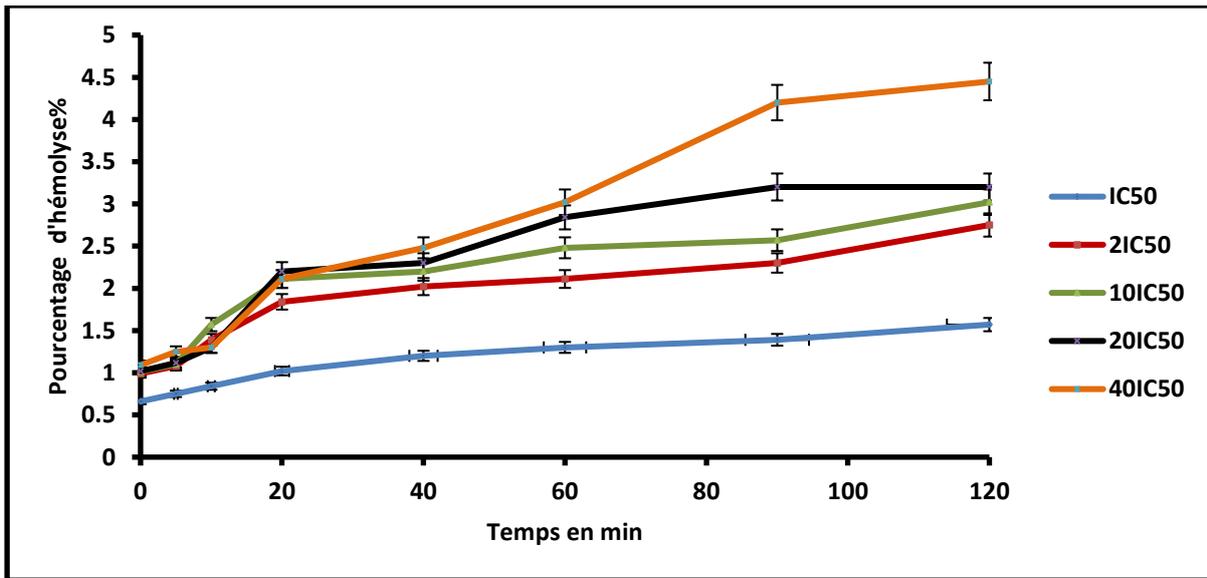


Figure N°34 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction n-buthanol des flavonoïdes de la partie aérienne.

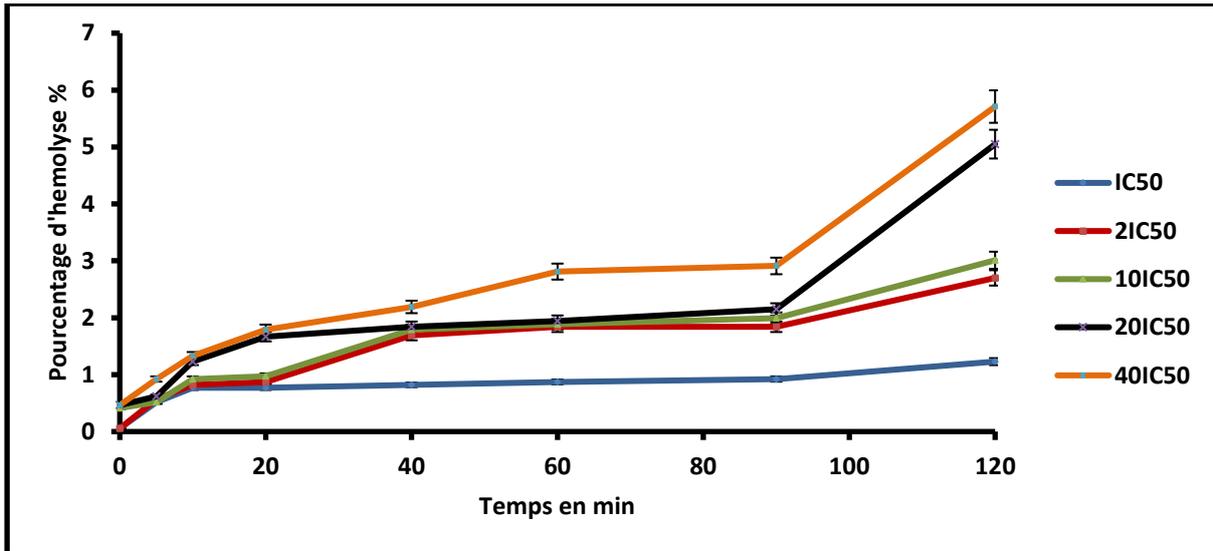


Figure N°35 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de la fraction n-butanol des flavonoïdes des racines.

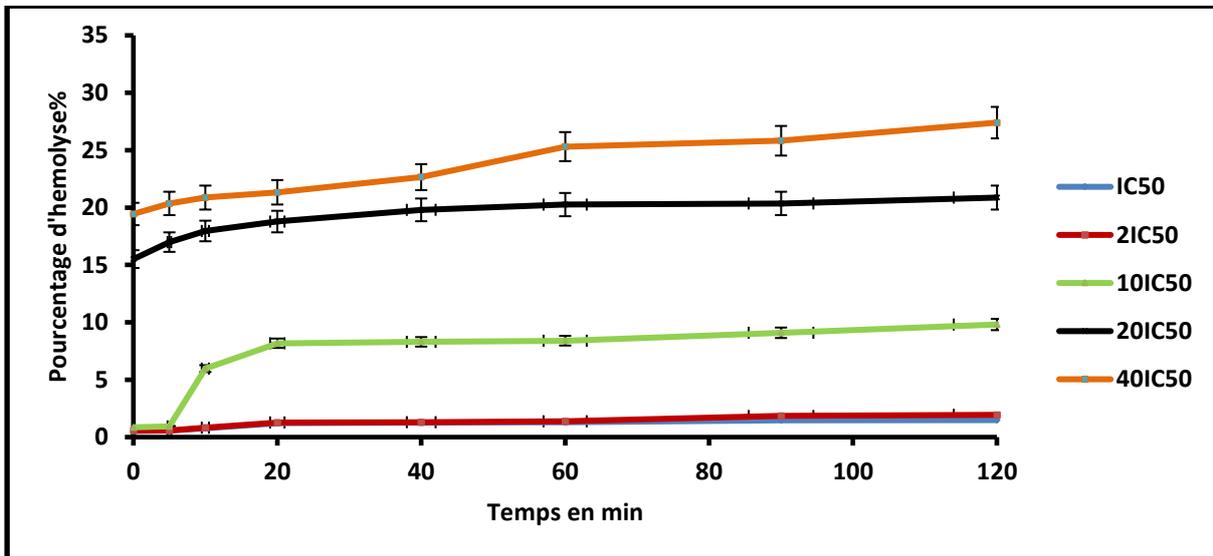


Figure N°36 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de l'extrait aqueux (sous reflux) de la partie aérienne.

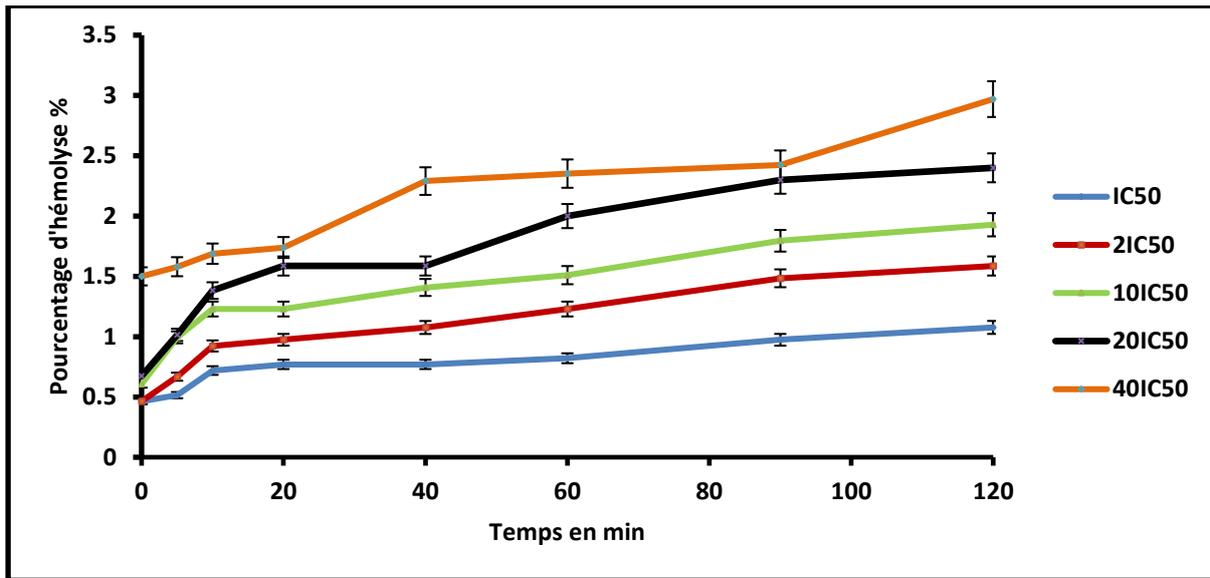
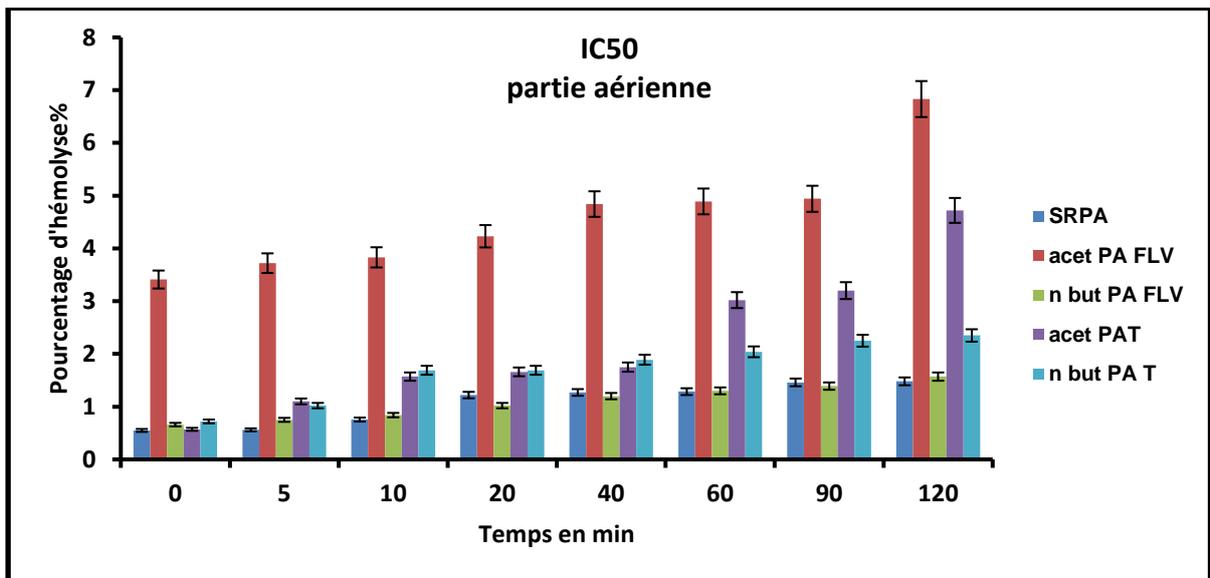
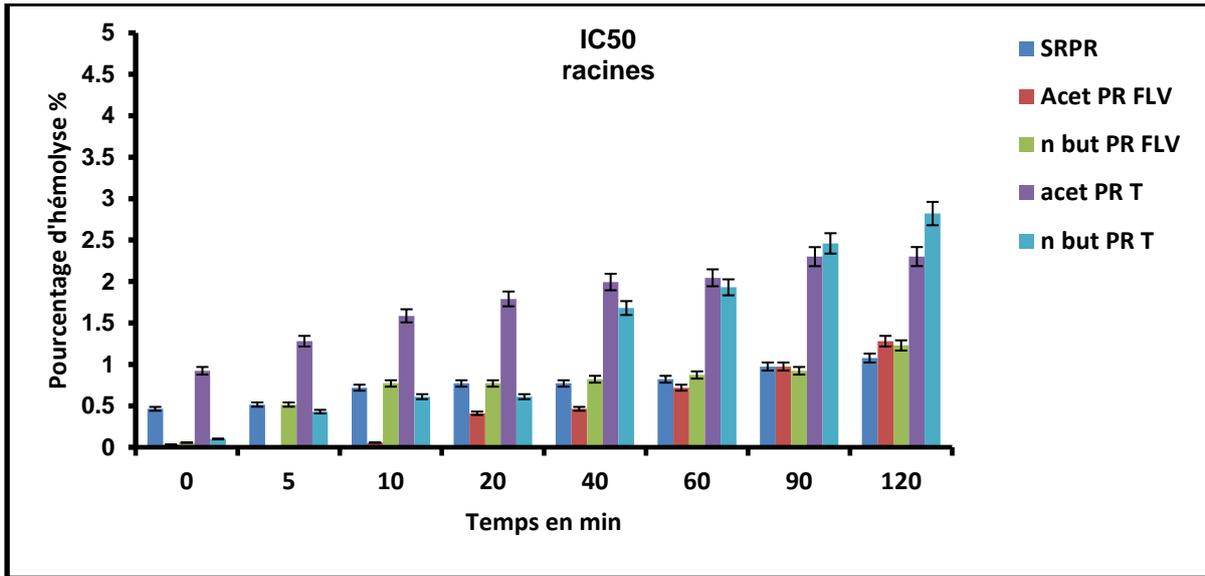


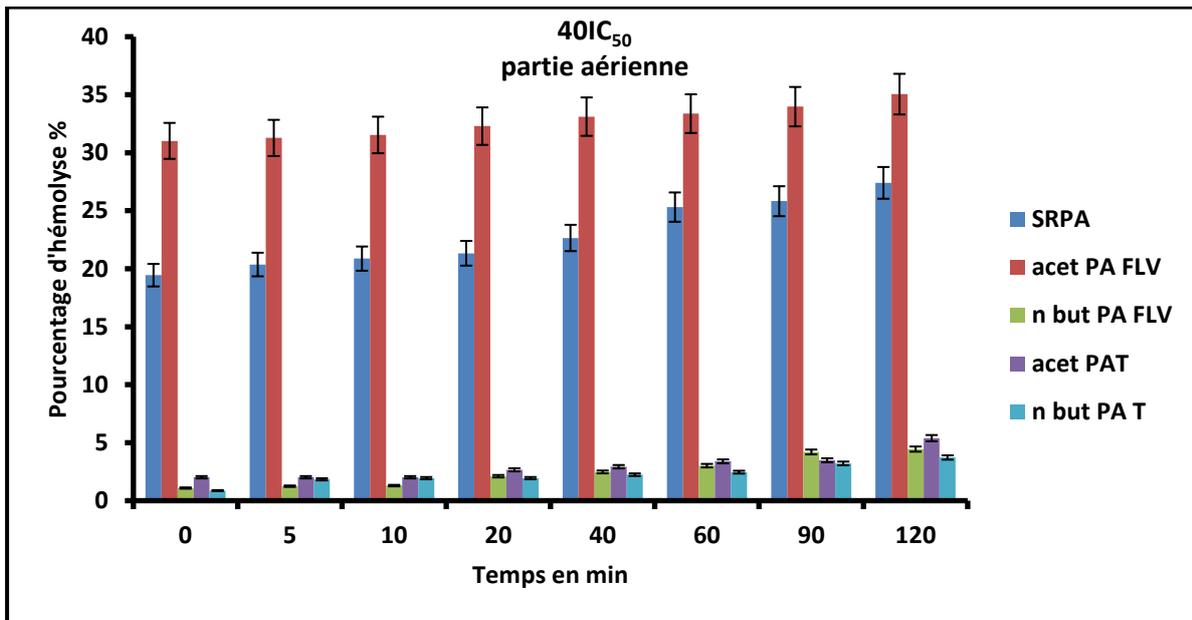
Figure N°37 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps de l'extrait aqueux des racines.



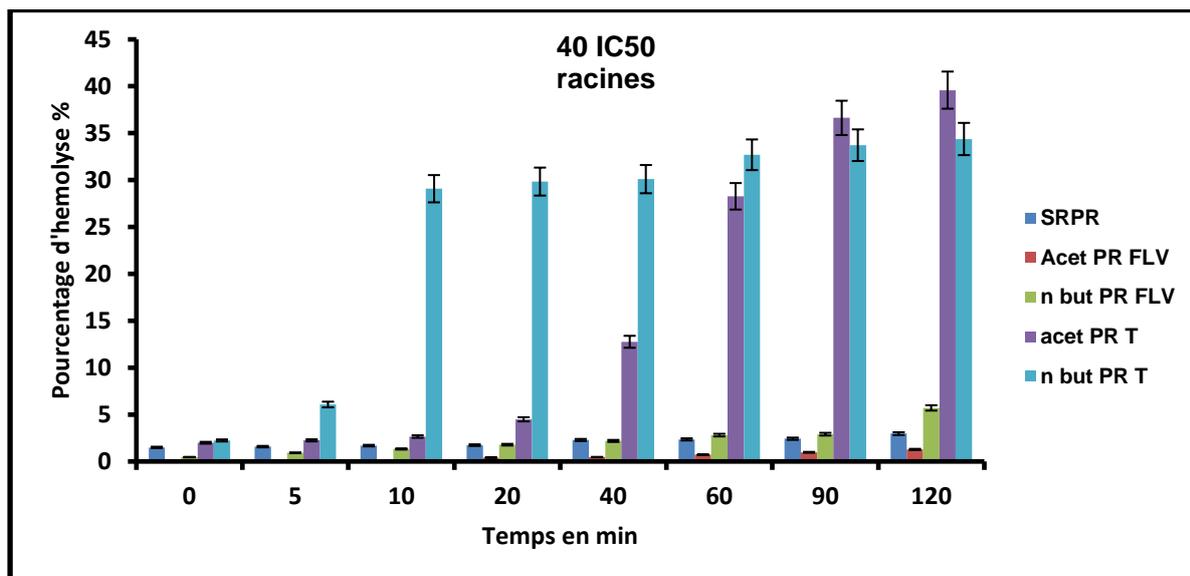
Histogramme 1: pourcentage d'hémolyse en fonction du temps des différents extraits à l'IC₅₀ de la partie aérienne de la plante *E.spinosus*.



Histogramme 2 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps des différents extraits à l'IC₅₀ des racines de la plante *E.spinosis*.



Histogramme 3 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps des différents extraits à 40 fois l'IC₅₀ de la partie aérienne de la plante *E.spinosis*.



Histogramme 4 : pourcentage d'hémolyse en fonction du temps des différents extraits à 40 fois l'IC₅₀ des racines de la plante *E.spinosus*.

Conclusion Générale

Les résultats obtenus au cours de ce travail complète une démarche scientifique importante qui vise à faire une corrélation entre l'utilisation empirique de la plante et la connaissance scientifique et plus particulièrement biologique de ces dernières.

En guise de cette étude visant à réaliser au préalable une étude bibliographique sur la plante *E. spinosus* de la région de Tlemcen qui a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique.

Pour pallier ce manque d'informations, notre étude s'est focalisée dans un premier temps sur une enquête ethnobotanique, des analyses qualitatives et quantitatives et d'évaluer les activités biologiques de cette plante entre autre l'activité antioxydante, antibactérienne, antifongique ainsi que l'activité anti-hémolytique vis-à-vis des érythrocytes humains.

L'étude de l'enquête ethnobotanique dans la région de Tlemcen a montré les différents usages de la plante *Echinops spinosus* ainsi que son mode d'utilisation.

Une corrélation a été établie entre l'âge, le sexe ainsi que le mode d'utilisation de la plante *E. spinosus*.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des sucres réducteurs, des tanins, des flavonoïdes, des coumarines et des quinones.

Le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins à partir des extraits aqueux et hydro-alcooliques a révélé des quantités de : 852mg EAG/100gMS, 128mg EC/100g MS, 1910 mg EC/100g MS respectivement.

Une corrélation positive entre la teneur en polyphénols et les flavonoïdes ainsi que les tanins a été établie pour la plante *Echinops spinosus*.

L'évaluation de l'activité antioxydante par les deux méthodes à savoir la réduction du fer (FRAP), et le piégeage du radical libre DPPH, montre que l'extrait acétate d'éthyle des tanins de la partie aérienne présente une très forte capacité de réduction de fer par le test de FRAP, ainsi qu'une faible concentration par la méthode de piégeage du radical libre DPPH soit une $IC_{50}=8,25 \mu\text{g/mL}$, ceci fait penser que les tanins peuvent être retenus comme médicament dans la prévention de pathologies dans lesquels des radicaux libres sont étroitement impliqués tel que l'athérosclérose.

Les résultats de l'activité antibactérienne sont issus d'une méthodologie que nous avons adoptés en deux étapes. La première consiste en une évaluation qualitative en utilisant la méthode de disques sur milieu solide dans le but de présélectionner les extraits possédant une activité antibactérienne sur l'ensemble des souches de référence. Le deuxième essai représente une évaluation quantitative par la

détermination de la CMI et la CMB des extraits actifs en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide.

La méthode de dilution en milieu liquide ou la détermination de la CMI est évaluée, cette dernière a montré une efficacité antibactérienne effective de quelques extraits vis-à-vis l'ensemble des souches bactériennes testées.

Les valeurs de CMI rapportées se situent entre 0,331 mg/mL et 50 mg/mL ce qui témoigne une activité non négligeable des extraits testés avec un effet minimal pour l'extrait acétate d'éthyle des tanins (CMI=0,331 mg/mL) et l'extrait acétate d'éthyle des flavonoïdes (CMI=0,875 mg/mL) de la partie aérienne vis-à-vis les souches *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* respectivement. Ces résultats sont très prometteurs. De plus, notre étude a mis en évidence l'activité antifongique d'*Echinops spinosus* pour tous les extraits testés vis-à-vis les souches *Candida albicans*, afin de vérifier son utilisation en médecine traditionnelle par la population de Tlemcen pour le traitement des candidoses buccales et vaginales. Les résultats obtenus par les deux méthodes à savoir la méthode des disques et la méthode de dilution en milieu liquide, nous ont confirmé les résultats obtenus lors de l'enquête ethnobotanique.

L'essai des dilutions en série dans les microplaques de 96 puits a révélé des valeurs de CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) allant de 0,156 mg/mL à 120mg/mL sur les souches de référence *Candida albicans* ATCCIP444, ATCC10231, ATCC 26790. L'extrait n-buthanol des flavonoïdes de la partie aérienne a montré l'effet antifongique le plus prononcé sur la souche *Candida albicans* ATCCIP444 avec une CMI et une CMF égale à 0,156 mg/mL.

Les résultats des CMI obtenus sur l'activité antifongique sont plus ou moins compatibles avec les résultats trouvés avec ceux de la méthode de diffusion sur milieu solide.

Dans l'industrie de tannage, les tanins sont combinés sous forme de complexes aux protéines et rendent imputrescibles les peaux, à cause de leurs nature, les tanins sont des antifongiques et des antibactériens.

Ils sont utilisés pour la protection des filets de pêche contre la prolifération des germes producteurs de cellulose qui sont des enzymes responsables de la destruction de la cellulose des filets (**Solim Igor, 2002**).

Concernant l'activité hémolytique, le test d'hémolyse n'a révélé aucune fuite de l'hémoglobine vis-à-vis les érythrocytes humains pour l'extrait aqueux jusqu'à 120

min d'incubation à 37°C sous agitation continue tandis que pour d'autres, il y'a une fuite d'hémoglobine qui peut être due aux éclatements des érythrocytes lors de la manipulation ou la présence des traces de solvants dans les extraits.

En effet, la présence des effets antagonistes des extraits reflète la nature hétérogène du produit et indique la nécessité de fractionner l'extrait, de caractériser la structure et le mécanisme des composants responsables de chaque effet.

Cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de cette plante et révèle son Intérêt dans le cadre d'une exploitation en biotechnologie.

Afin de compléter ce travail, il serait souhaitable de :

- Caractériser et isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques.
- Evaluer d'autres activités biologiques à savoir l'activité anticancéreuse, anti-inflammatoire et antidiabétique.

Au regard de ces résultats, nous pouvons conclure que ces derniers peuvent être considérés comme très prometteurs et justifient la poursuite des recherches entre autre sur l'isolement, l'identification et la purification des composants antioxydants et antimicrobiens dans les extraits actifs ainsi que d'autres activités biologiques tel l'activité anti-tumorale, anti-inflammatoire et antidiabétique.

Références bibliographiques

Adida H., Frioui E., Djaziri R., and Mezouar D., (2014). *In vitro* antibacterial activity of *Pituranthos scoparius* from Algeria. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*; 8(5): 2095-2108.

Affif chaouch, (2015). Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région de Tizi- Ouzou – Algérie.

Agban A., Gbogbo KA., Amana EK., Tegueni K., Batawila K., Koumaglo K., Akpagana K., (2013). Évaluation des activités antimicrobiennes de *Tridax procumbens* (asteraceae), *Jatropha multifida* (euphorbiaceae) et de *Chromolaena odorata* (asteraceae). *Eur. Sci. J.*, 9(36): 278-290.

A.K. Jäger, University of Copenhagen, Copenhagen O, Denmark, (2016). Screening selected Vietnamese plants used to treat diabetes for PTP1B inhibitory activity. Article in *Planta Medica* : 81(S01):S1-S381 . DOI: 10.1055/s-0036-1596864.

Akroum S., (2010). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université Mantouri de Constantine-Algérie.

Alaoui J ,Moulay A, (2002). Echinops extract with anti-cancer activity .Patent N° : US 6,395 312 B

Alexandra Loukas, Rie Suzuki, Karissa, D. Horton (2006). Examining School Connectedness as a Mediator of School Climate Effects. DOI: 10.1111/j.1532-7795.2006.00504.x

.Alilou H., Bencharki B., Hassani Lalla Mina Idrissi et Barka N., (2014). Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *Olorus*. *Afrique SCIENCE* : 10 (3) 316 - 328. 316 ISSN : 1813-548.

Amégninou Agban, (2013). Evaluation des activités antimicrobiennes de *Tridax procumbens* (Asteraceae), *Jatropha multifida* (euphorbiaceae) et de *Chromolaena odorata* (asteraceae). and fungi. *Phytother Res.*, 13(4): 349-51.

Anderson, (2001). A new method for non parametric multivariate analysis variance. *australian ecology* 26:32-46

ANDI, (2013). Agence nationale de developpement de l'investtissement

Ardestani and yazdanparast(2007).Antioxidant and free radical Scavenging Potential of *Achillea santolina* extracts .*Food chemistry*.104,21-29

Azzi et Boumellah., (2002). Effets antidiabétiques des alcaloïdes totaux et des extraits chloroformique et éthanolique des glycosides cucurbitacines des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) « Handal », famille des cucurbitacées, sur des rats Wistar normaux et rendus diabétiques par Streptozotocine. Thèse de magister.

Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F.Z., Benmehdi H. and Belkacem N.,(2012). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria, *J. Med. Plants. Res* ; 6 (10): 2041-2050.

Babayi H., Kolo I., Okogum JI., (2004). The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistry*, 16 (2) : 102-5.

Bakkali (2008). Biological effects of essential oils. Volume 46 ,issue .Elsevier.

Bakchiche Boulanouara, Gherib Abdelaziza, Smail Aazzab, Custodia Gagob, M. Grac, Miguel., (2014). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. Faculté de Technologie, Université Amar Telidji-Laghouat, B.P 37G, Laghouat 03000, Algeria b Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia, DQF, Edifício 8, Centro de Biotecnologia Vegetal, IBB, Campus de Gambelas, 8005. *Industrial Crops and Products. Industrial Crops and Products* 46 85– 96.

Bammou M., Daoudi A., Sellam K., El rhaffari L, Ibijbijen J., and Nassiri L., (2015). Étude Ethnobotanique des Astéracées dans la Région Meknès-Tafilalet (Maroc). Ethnobotanical Survey of Asteraceae Family used in Meknes-Tafilalet Région. *International Journal of Innovation and Applied Studies. Barcelona.*

Barbouche Naima, Hajjem Béchir, Lognay Georges, Ammar Mohamed (2001). Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.) *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (2), 85–90.

Basile A. Yapi., (2015). Etude botanique , évaluation de l'activité antifongiques des feuilles de *Acanthospermum hispidum* DC., (Asteracea) sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans* et étude de la toxicité sur les cellules humaines.

Benaradj A., Medderbal K., Benabdelli, K., (2010). Remontée biologique du parcours steppique à *Lygeum spartum* après une durée de mise en défense dans la steppe sud-oranaise de Naâma (cas de la station de Touadjeur).

Benariba N., Zerriouh B.H., Djaziri R., Boucherit K., Louchami K., Sener A., and Malaisse W., (2009). Antihyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* see aqueous extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Reference : Metabolic and functional research on diabetes;* 2 : 71-77.

Benariba N., Djaziri R., Bellakhdar W., Belkacem N., Marcel K.N., Malaisse W.J., Sener A.,(2012). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine:* 1-5

Benkhnigue, (2011). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* 53: 191-216.

Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie, *Phytothérapie* ; 12 (6) : 364-371.

Bellakhdar J., (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle Médecine arabe ancienne et savoir populaires. Paris: Ibis Press.

Bernard Boullard, (2001). Plantes médicinales du monde: croyances et réalités ESTEM,

ISBN : 2843711177, 9782843711176. Amazon France.

Bouayad J., Rammal H., Dico A.,(2007). Chlorogenic acid,a polyphenol from *Prunus domestica*(*Mirabelle*)with coupled anxiolytic and antioxidant effects.*J.Neurol.Sci*262.77-84.

Boris Lègba,¹ Victorien Dougnon,² Angèle Ahoyo,² Jerrold Agbankpè,² Gildas Hounmanou,² Alidah Aniambossou,² Edna Hounsa,² Kafayath Fabiyi,² Affoussath Amadou,² Phénix Assogba,² Honoré Bankolé,² Jacques Dougnon,² Lamine Baba-Moussa¹. (2017). Exploration of the antibacterial and chemical potential of some Beninese pharmacopoeia traditional plants . *Microbiologia Medica* ; volume 32 ; 6998

Boizot N., Charpentier J. P., (2006).Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier.le cahier des techniques de l'inra pp79-82

Bobrov, E.G., (1997). *Echinops* L. Pp. 1–70 in: Shishkin, B.K. & Bobrov, E.G. (eds.), *Flora of the USSR*, vol. 27. Dehra Dun: Bishen Singh, Mahendra Pal Singh., Koenigstein: Koeltz Scientific Books.

Bouchet et coll., (1998). Semi-analytic modelling of galaxy evolution in the IR/submm range.

Boudjelal Amel., (2013). Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie.

Boudjouref M., (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L.

Boullard B., (2001). Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Paris, ESTEM, 636P.

Boussoussa (2016). Influence de la composition du milieu de culture sur la production de métabolites secondaires et les activités antioxydantes et antibactériennes des extraits produits à partir de cultures *in vitro* de *Clidemia hirta* L.

Bouzouita N ., Kachouri F., Ben halima M., Chaabouni MM.,(2008) . composition chimique et activité anti oxydante,antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* .société chimique de Tunisie. 119_125

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie ,phytochimie, plantes medicinales -3eme édition .technique et documentation .Paris.pp :227-310-312-313-314.494.

Bruneton., (2009). J., *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4e Ed.* Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris, 1288.

Budzyńska A1., Wieckowska-Szakiel M., Kalemba D., Sadowska B., Rózalska B., (2009).The optimization of methods utilized for testing the antibacterial activity of essential oils. *Med Dosw Mikrobiol.*, 61(3):281-7.

Butler MS., (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *J., Nat Prod*;

67(12): 2141-53. cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 371:654–8.

Chandana (2008). Localization of the membrane –anchored MMP-regulator RECK at the neuromuscular junction .journal of neurochemistry .volume 104. issue 2.

Chaouki Selles, Mohammed El Amine Dib, Nassim Djabou , Fawzia Beddou , Alain Muselli et coll., (2013). Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian *Anacyclus pyrethrum* L. through the vegetative cycle, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*.

Chahmi N., Anissi J., Jennan S., Farah A., Sendide K., El Hassouni M., (2015). Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 5, 3, 228–233.

Chikhi I., Allali H, Dib M., (2013). Antioxidant activities and phytochemical study of extracts of two phagnalons species growing in Algeria. *Internat J. Trad. Herbal Med.*, ISSN: 3:49–53.

Ciulei, I. (1982). Methodology for Analysis of Vegetable Drugs. Practical Manual on the Industrial Utilisation of Medicinal and Aromatic Plants. Bucharest, Romania, 1-62.

CLSI,(2009).The clinical and laboratory standards Institute. Method for antifungal Disc Diffusion Susceptibility testing of yeasts,Approved Guideline –Second Edition .

Cuendet M., (1999).Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxyants à partir d'une plante d'indonesie :Fagraea blumei(Loganiaceae)et de trois plantes d'altitude ;*Bartsia alpina* (scrophlariaceae).Loiseleuria procumbens(Ericaceae) et *Campanula barbata*(*Campanula barbata*).*Campanulaceae*.Thèse de doctorat.Faculté des sciences de l'université de Lausanne, P24.

Coulibaly K., Zirihi Guédé N., Amari A.S.G., (2010). Evaluation de l'activité anticandidosique des extraits hydro-alcooliques d'écorces de huit espèces ligneuses commerciales, de la forêt de Mopri, Tiassalé (Côte d'Ivoire). *Ethnopharmacologia*, N°46: 81-86.

Cowan M. M., (1999). Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564–582.

Cushnie TP., Hamilthoh VES, Lamb A.J., (2003). Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoïds and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.*, 158(4): 281-9.

Dadi PK., Ahmad M., Ahmad Z., (2009). Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.*, 45 (1): 72-9.

Daglia M., (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2): 174-181.

De-Graft Aikins, (2007). *Ghan's neglected chronic diseases epidemic a developmental challenge.* *Ghana Med. J* 14(4); 154-159 .

Deliu, I., Bejan, C., Vişoiu, E., & Soare, L. C. (2013).THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF

SOME EXTRACTS OF FERN GAMETOPHYTES. EDITORIAL BOARD, 10

De Freitas MV., Netto RM., da Costa Huss JC., de Souza TM., Costa JO., Firmino CB., (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol., In Vitro*; 22: 219-224.

De Jager, C. & Nieuwenhuijzen H., (2016). A new determination of the statistical relations between stellar spectral and luminosity classes and stellar effective temperature and luminosity. *J. Astronomy and Astrophysics (ISSN: 0004-6361)*, vol. 177, no. 1-2, p. 217-227. A&A. 177.217D.

Diallo D., Doumbo O., Plowe C., Wellems T., Emanuel E., Hurst S.,(2005). Community permission for medical research in developing countries. *Clin Infect Dis.*, 41:255–9.

Didrak M., (1999). Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, *Salvia sp.* and *Phlomis sp.* *J. Biol.*, 23: 241-8.

Dixon RA., (2005). Engineering of plant natural product pathways. *Curr., Opin., Plant Biol.*,8:329–36.

Djemai zoughlache soumia, (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus*. Magister en biologie. Université-el hadj lakhder –Batna.

El demerdash (2005) .Stannous chloride induces alterations in enzyme activities .lipid peroxydation and histopathology in male rabbit ;antioxidant role of vitamin C.,*Food Chem.,Toxicol.*,:43-1743-1752.

El ouali (2010).Inventaire et répartition saisonnière des Culicidae dans le centre du Maroc .volume 62

El Hilah Fatima, Fatiha Ben Akka, Jamila Dahmani, Nadia Belahbib, Lahcen Zidane. (2015). Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des infections du système respiratoire dans le plateau central marocain. *Journal of Animal & Plant Sciences*. Vol.25, Issue 2: 3886-3897.

Elisée Kporou Kouassi , Sitapha Ouattara, Cendrine Seguin, Sylvie Fournel, Benoit Frisch, (2018). Etude De Quelques Propriétés Biologiques De *Ocimum Gratissimum L.*, Une Lamiaceae Recoltee A Daloa (Côte d'Ivoire) . *European Scientific Journal* edition Vol.14, No.3 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431

Engels C., Schieber A., Gänzle MG., (2011). Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica L.*). *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7): 2215-2223.

Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M., (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*; 68: 939-953.

Fabricant D.S.,Farnsworth N.,R., (2001).The value of plants used in traditional medicine for drug discovery environ.health perspect;109,69-75.

- Flamini G., Cioni, PL., Puleio, R., Morelli, I., Panizzi, L., (1999).** Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1573(199906)13:4<349::AID-PTR446>3.0.CO;2-Z.
- Fraisse D., Felgines C., Texier O., Lamaison J., (2011).** Caffeoyl Derivatives : Major antioxidant O compounds of some Wild Herbs of Asteracea Family. *Food Nutr., Sci., 2:181–92.*
- Frédéric Derbré., (2016).** Single Muscle Immobilization Decreases Single-Fibre Myosin Heavy Chain Polymorphism : Possible Involvement of p38 and JNK MAP Kinases.
- Friedman M., Henika PR., Levin CE., Mandrell RE., Kozukue N., (2006).** Antimicrobial activities of tea catechins and the aflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 69(2): 354-361.
- Forey BA, Lee PN, Fry JS., (1998).** Updating UK estimates of age, sex and period specific cumulative constant tar cigarette consumption per adult.. 53(10):875-8.
- Garnatje (2004).** Genome size in Echinops L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): Karyological, ecological and phylogenetic implication. *J biology in the cell* 96(2), 117-24
- Galeotti F., Barille E., Curir P., Dolci M., and Lanzotti V., (2008).** Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry. letters.* 1: 44- 48.
- Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna, A. & Vilatersana, R., (2002).** Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Molec. Phylog. Evol.* 22: 51–64.
- Gayathri (2015).** Assessment of in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity of *Sphaeranthus amaranthoides*. *pharmacognosy*. DOI:10.4103/0974-8490.150554
- Gehin A., Guyon C., Nicod L., (2006).** Glyphosate –induced antioxidant imbalance in HaCaT: the protective effect of vitamins C and E. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 22; 27-34.
- Gérin M., (2002).** Solvants industriels : santé, sécurité, substitution. Paris : Masson. xviii, 257 p.
- Guide (2009).** Guide illustré de la flore algérienne. wilaya d'alger.
- Gescher S., et coll., (2011).** Entwicklung der kommunalen Spielräume. Qualitative Bewertung der öffentlichen Spielflächen in Gescher und Hochmoor.
- Ghedadba., (2015).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L.
- Guide(2009).** Guide illustré de la flore algérienne .wilaya d'alger.
- Hostettman (2002).** Les plantes médicinales ; l'usage traditionnel aux médicaments modernes. Institut de pharmacognosie et phytochimie, université de Lausanne, Switzerland.

Hubert (2006).Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de toulouse, école doctorale des sciences écologiques,vétérinaire,agronomique,et bioingénieries,spécialité :qualité et sécurité des aliments. P174 .

Halla N., (2014). Evaluation de l'activité antifongique et antibactérienne et de la cytotoxicité de quatre conservateurs : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II et Bromure de N-cétyl-N, N, N-triméthylammonium. Magister en biologie. Université Abou bekr belkaid.Tlemcen.

Hamza Chérif I et Chenini FZ., (2006). Contribution à l'étude de l'effet antidiabétique de l'extrait de saponosides de *Berberis vulgaris* sur des hépatocytes isolés de rats Wistar . Mémoire DES, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de l'Univers et de la Terre. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaïd.

Harborne J B.,and Williams, C,A, (2000).Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*,55(6),481-504.

Huang Y., (2005). Cystine-glutamate transporter *SLC7A11* in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.*, 65(16):7446–7454;doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4267.*Intercult Ethnopharmacol.*,1(2) :101-104.

Irobi O.,N., (1997). Antibiotic properties of ethanol extract of *Chromolaena odorata* (Asteracea).*Phytochemistry. Vol; 35.2,111-115*, ISBN: 28437111779782843711176.

ISERIN P., (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2ème Edition, Paris : 14,275.

Jayasuriya DC, Jayasuriya S., (2002). Legislation and regulation of traditional systems of medicinal systems practitioners and herbal products. In R.R.Chaudhury U.M.Rafei.Traditional medicinal Asia (pp 195-208). New delhi. World Health Organisation.

Jones EJ., Bishop PA., Richardson MT., Smith JF.,(2006).Stability of a practical measure of recovery from resistance training., 20 (4):756-9.

Jürgen R., Paul S., Ulrike S., and Reinhard S., (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties— an Overview: *Forsch Komplement.med.*16: 79–90.

KRIEF Sabrina (2003).Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en ouganda activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat .

K. Badou, Y. Kouassi, E. Messou, Y. Koffi, J. Kouassi-njeundo, M. Tanon-anoh, (2014). Dépistage des troubles de l'odorat dans le district d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *Annales françaises d'Oto-rhino-laryngologie et de Pathologie Cervico-faciale* V.131, Issue : 4, Supplement, Paris.

K. Belkacem, M. J. Goupil ., M. A. Dupret, R. Samadi, F. Baudin, A. Noels and B. Mosser

(2011). The underlying physical meaning of the $v_{\max} - v_c$ relation. Vol: 530.

K. C. Emregül, O. Atakol, M. Lebrini., (2003). Electrochemical and quantum chemical studies of new Mater. *Chem., Phys.*, 82: 188.

Kabran Guy., Roger Mida, (2012). Phénols et Flavonoïdes Totaux dans les extraits organiques de dix plantes utilisées dans la Tradithérapie du Cancer du sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*. ISSN: 1450-216X. Vol., 68.

KAR A., (2007). Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie. Ed 2: New Age. *International Publishers.*, p: 1-30.

Karagozler A.,Erdag B., Calmaz Emek Y.,(2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate* ,food chemistry , 111;400-407.

Karumi Y., Onyeyili P.A.,oyugbuaja V. O., (2004).identification of active principals of *M.Balsamia* (Balsam Apple)leaf extract.*J.Med.Sci.*,4(3);179-182.

Kirby (1996).community reinforcement training for family and significant others drug abusers ;a unilateral intervention to increase treatment entry of drug users .drug and alcohol dependance 56 ,85-96.

Kinghorn AD., (2001). Pharmacognosy in the 21st century. *J. Pharm Pharmacol.*, 53 : 135 – 148.

Koehn F. E., Carter G.T., (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Review Drug Discovery* 4: 206 - 220.

Kurita, N. and S. Koike., (1982). Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oil components. *Agric. Biol. Chem.*, 46: 159-166.

Kyeong W.Y., Anwar M., and Jong H.K., (2007). Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp. *caudata* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J., Plant. Biology*. 50 (3): 358-361.

Lahsissene H., Kahouadji A., (2009). Analyse ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques de la flore marocaine: cas de la région de Zaër.

Lehmann, (2013). LE MÉDICAMENT À BASE DE PLANTES EN EUROPE. STATUT, ENREGISTREMENT, CONTRÔLES .Thèse de Doctorat à l'Université de Strasbourg

Lebrini (2005).Synthèse et étude physicochimique de nouveaux thiadiazoles inhibiteurs de corrosion de l'acier en milieu acide .Thèse de doctorat.

Lee JY, Chang EJ, Kim HJ, Park JH, Choi SW.,(2002). Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Arch. Pharm., Res.*, 25 (3): 313-9.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY., (2003). Cocoa has more Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 51:7292–5

Liuk et coll., (2009). Continental and Oceanic Crust Recycling-induced Melt–Peridotite Interactions in the Trans-North China Orogen : U–Pb Dating, Hf Isotopes and Trace Elements in

Zircons from Mantle Xenoliths. Livre édition.

Loukkas A., (2006). Atlas des parcs nationaux algériens-Publié par le parc national de Théniet El Had Avec l'autorisation de la Direction Générale des Forêts (D.G.F.).

Maia PF & Justy R., (2009). Learning of chemical equilibrium through modeling based teaching. *International journal of science education*: 31(5)-603, 630

Mata A., T.,Proenc C.,Ferreira A.,R.,Serralheiro M.,L., M.,Nogueira J.,M.,F.,Araujo

Meridith (2015).Sensitive and critical periods during neurotypicaland aberrant neurodevelopment .A framework for neurodevelopmental disorders.*neuroscience Biobehavioral Reviews* 50,180-188

Mergheche D., Boucherit-Otmani Zahia, Merghache Salima, Chikhi Ilyas, Selles Chaouki, Boucherit Kebir (2014). Chemical composition, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of Algerian *Eryngium tricuspidatum* L. essential oil. *Natural Product, Research*, Volume 28, Number 11, 3 June, pp.795-807(13

Mohan C.,(2006).Buffers .A guide for the preparation and use of bufferd in biological systems .EMD,san Diego , California,Calbiochem :22.

Modak B., (2001). Actividad antibacteriana de flavonoïdes aislados des exudado resinosa de *Heliotropium sinnuatum*. Efecto del tipo de estructura. *Bol. Soc. Quim.*, 47 (1): 366-421.

Mohammedi Zohra (2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie.

Moreira M.,R.,Ponce A.,G.,de Valle C.,E.,and Roura S.,I.,(2005).Inhibitory parameters of essential oils to reduce foodborn pathogen. *Lebensmittel-wissenschaftund-technologie-LWT*,38:565-570.

Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y., (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Asteraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3: 79–84. *Nature*. Aug 13; 460(7257):863-8. DOI/10.1038/nature08212. *E.pub*.

Newman (2000).Forum :qualitative social research .vol 1.N⁰ 1

Ngono Ngane E. R. E., Ndifor F., Biyiti L., (2006). Antifungal activity of *Chromolaena odorata* (L) King Robinson (Asteraceae) of Cameroon. *Phytochemistry*, Vol 52. 103- 109.

Nouri Jdaidi, Brahim Hasnaoui, (2016). Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales au nord-ouest de la Tunisie : cas de la communauté d'ouled sedra. *Journal of Advanced Research in Science and Technology*. ISSN : 2352-9989. O.M.S., Organisation Mondiale de la Santé.

Okigbo RN, Mbajinka CS., Njoku CO., (2005). Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopi aethopica* and *Occinum gratissimum* L. some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, 1 (4): 392-7.

- Oloyede (2005).** Chemical Profile of Unripe of *Carica papaya* .Pakistan journal of nutrition .Volume 4.Issue 6.page N°379-381.
- Özgülven, İ.E., (1998).** Bireyi Tanıma Teknikleri. Ankara: PDREM Yayınları.
- Parejo I.,viladomat T .,F.,Bastida J.,Rosas Romero A.,Flerlage N.,Burillo J.,Codina C., (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non distilled .Mediterranean herbs and aromatic plants .J.agricol.Food.Chem,(5):6882-6884.
- P. Ahossi, T. J. Dougnon, P. KIKI et J. HOUSSIONON, (2014).** Synthèse des activités biologiques et de l'utilisation de *Tridax procumbens* en production animale et en médecine traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 8(4): 1476-1884, ISSN: 1997-342X (Online), ISSN : 1991-8631.
- Park SY, Bok SH, Jeon SM, Park YB, Lee SJ, Jeong TS., et al., (2002).** Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutr., Res.* 22: 283-295.
- Penchev., (2010).** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Doctorat de l'université de Toulouse.
- Pfaller., (2012).** Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou – Algérie. Thèse de doctorat, *Pharmacol.* 589 (1-3): 233-8.
- Poonam Sharma., Jayashri Devi Sharma., (2001).** *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology:* 74 239–243.
- Prior RL., Wu X., Schaich K., (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric., Food. Chem.*, 53: 4290-4302.
- Rajeev Singh, Pawar kumar Verma, Gagandeep Singh., (2012).** Total phenolic flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *J. Intercult ethnopharmacol.*, 1(2) :101-104.
- Ramdane farah (2018)** .*Contribution à l'étude des activités biologiques de quelques plantes médicinales du sahara algérien ; Nauplius graveolens ,Zizyphus lotus et Capparis spinosa* .Thèse de doctorat.
- Rahmoun (2013).**Antimicrobial activities of the Henna extract and some synthetic naphthoquinone derivatives. American journal of medical and biological reseach.volume 1.
- R. Paris and H. Moyses (1969).** Précis De Matière Médicinale, Masson, Paris, France.
- Renaud et colin (1934).**Thfat al –ahbab/Glossaire de la matière medicale marocaine (Publ.de l'inst.des hautes etudes marocaines,24) Paris.xxxv+218+74pp

- Richard pearson,CJ Raxworthy,M Nakamura,A Townsend peterson (2007).**Predicting species distributions from small numbers of occurrence records.a test case using cryptic geckos in madagascar.J of biogeography 34(1)102-117.
- Rendle A. B., (1979).** The classification of flowering plants. Cambridge University Press, Vol. II, India, pp. 587.
- Rimbau V., Cristina Cerdan, Roser Vila and Josep Iglesias, (1999).** Anti-inflammatory activity of some extracts from plants used in the traditional medicine of north-African Countries. *Phytother., Res.*, 13, 128-132.
- Robards K., and Antolovich M., (1997).** Analytical chemistry of fruit bioflavonoids . A review. *Analyst*, 122(2), 11R-34R.
- Rodillon G., (1920).** La Tassekra (*Echinops spinosus*), L. Etude pharmacognosique. Thèse de doctorat. Faculté de pharmacie. Université de Nancy.
- Sanchez moreno J.,A., (2002).**Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological system.<http://doi.org/10.1106/108201302026770>.
- Seigler (1986).**Tannins from common acacia species of texas and north eastern mexico.*Economic Botany*.40(2)220-232.
- Selihi Z., Berraho M.,El ghazi K.,El Achhab Y.,Lyoussi B.,Nejjary C., (2016).**Etude descriptive des complications dégénératives du diabete de type 2;données d'inclusion de la cohort "epidiam" FEZ. *Revue marocaine de santé publique* .ISSN :2351-8472
- Sokmen (2004).**The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan(Asteraceae).*phytotherapy*.18(6)451-6,DOI:10.1002/ptr/1438.
- Sivaprya (2007).**Novel tetraselenides of mannose synthesis and mechanistic studies .*Tetrahedron Lett.*,48,2091,
- S. Debré., (2016).** Proposer des solutions efficaces et sûres en phytothérapie. *Actual. Pharm.*, 557, 47-53.
- Sun Y.,Jan,L.Y.(1998).** Transcriptional regulation of atonal during development of the drosophila peripheral nervous system.*development* 125(18):3731-3740.
- Sharifzadeh A., Jebeli Javan A ., Shokri H., Abaszadeh K ., Keykhosravy (2016).** Evaluation of antioxidant and antifungal propeties of the traditional plants against foodborne fungal pathogens pathogens . *Journal de mycology medical*. 26: 11-17.
- Side larbi K., Tir Touil Meddah B., Sonnet P., (2016).** The antibacterial effect of two medicinal plants *Inula viscosa*, *anacyclus valentinus* (asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. ISSN: 1112-9867.
- Solange I., Mussatto & Ercília M. S. Machado & Silvia Martins & José A. Teixeira**

Production., (2011). Composition and Application of Coffee and Its Industrial Residues Food Bioprocess Technol., 4:661–672. (DOI: 10.1007/s11947-011-0565-z).

Solim igor, (2002). Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'*Acacia Nilotica Var Adanson* Karagözler AA, Erdag B, Emek YC, Uygum DA. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. Food Chem., 111: 400-407.

Su Y., et coll., (2008). Human H⁺ATPase α 4 subunit mutations causing renal tubular acidosis reveal a role for interaction with phosphofructokinase-1. *Am J. Physiol. Renal. Physiol.*, 295(4):F950-8.

Susanna, A. & Garcia-Jacas, N., (2007). The tribe Cardura. In : Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.), *The families and genera* Pp. 135–158. Tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7.

Trease, G.E., Evans, W.C. (1987). Pharmacognosy. 13th edn. Brailliar Tiridel Can. Macmillian Publishers

T.P. Tim Cushnie (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. Andrew J. Lamb . School of Pharmacy, The Robert Gordon University, Schoolhill, Aberdeen AB10 1FR, UK. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.09.002>.

Talbi H., (2014). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.

Tatiana Lopez, Cyrielle Corbin a, b, Annie Falguière c , Joel Doussot a, b, d, Josiane Montguillon a, b, Daniel Hagege a, b, Christophe Hano a., b., Eric. Laine, (2016). Secondary metabolite accumulation, antibacterial and antioxidant properties of *in vitro* propagated *Clidemia hirta* L. extracts are influenced by the basal culture medium. *J. Comptes Rendus Chimie*. dx.doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.012.

Taviano M, F., Marino A., Trovato A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Guvenc A., De-Pasquale R., Miceli N., (2013). *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Junipers oxycedrus* subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "Berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29.

Thierry christiaens (2016). Different antibiotic treatments for group A streptococcal pharyngitis. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD.004406.pub4>.

Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H., Oueslati S., Soumaya B, et al. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Sci., Technol.*, 43: 632-639.

Turan Ozturk , Erdal Ertas , and Olcay Mert., (2007). Use of Lawesson's Reagent in Organic Syntheses. Department of Chemistry, Organic Chemistry, Ankara, Turkey Chem., Rev., 107(11). pp: 5210–5278. DOI: 10.1021/cr040650b.

Turkmen N., Velioglu, Y., S., Sari F., Polat, G., (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12: 484-496.

Ulanowska K., Traczyk A., Konopa G., Wegrzym G., (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.*, 184 (5): 271-8.

Upson T., M., Grayer R., J., Greenham J., R., Williams C., A., Al ghamdi F., et Chen F., (2000). leaf flavonoids as systematic characters in the *genera lavandula* and *sabaudia* .biochemical systematic and ecology ;28,991-1007.

Vermeris Nicholson (2006). phenolic compound biochemistry .Springer .Dordrecht .ISBN :101-4020-5163-8.

Wenbo Xu., Shuming Wu., Lili Zhou, and Guangxin Liang, (2013). Total Syntheses of Echinopines.

Yang et coll,(2008). hypermutability of damaged single –strand DNA formed and double strand breaks and uncapped telomeres in yeast *Saccharomyces cerevisiae* .Plos Genet4(11):e1000264

Yao kanga, (2016). Étude botanique, évaluation de l'activité anticandidosique de *Hunteria eburnea* et de sa toxicité sur les cellules humaines. Laboratoire de Botanique, Unité de Formation et de Recherche Biosciences, 22 BP 582 Abidjan 22, Université Felix. Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire. Vol., 12, N°1.

Zhang SY, Zheng CG, Yan XY, Tian WX., (2008). Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochem., Biophys., Res. Commun.*, 371:654–8.

Zheng W, Wang SY (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*, 49(11):5165-5170.

Annexe



Région :

ENQUETE ETHNOBOTANIQUE de la plante
Echinops spinosus (Tassekra) de la région de l'ouest
algérien

Questionnaire



Veillez mettre une croix sur la case correspondante :

Sexe : Homme Femme

Age :

Niveau intellectuel :

Profession :

Situation familiale :

Habitat : Centre de la ville Village

Connaissez vous la plante ? Oui j'entends parler seulement

Oui je l'ai déjà utilisé

Non jamais entendu parler

Connaissez vous le nom vernaculaire de cette plante ?

Quelle partie de la plante utilisez vous ? Partie aérienne racines

A votre avis quelle est la partie toxique de la plante ? Partie aérienne racines
Je ne sais pas

Quel est l'origine de l'information concernant l'utilisation de cette plante ?

Je me réfère aux expériences des ancêtres
Je me réfère aux herboristes
Je me réfère à moi-même (livres ,internet ,télévision)

Comment utilisez vous la plante (Mode de préparation) ?

Décoction
Infusion
Macération

Dans votre région vous utilisez cette plante pour traiter quelle maladie ?

Quel est le moment de la récolte de cette plante ?

Quelle est la dose ou la quantité utilisée ? Par pincée
Par cuillerée
Par poignée
D'une façon non précise

Quel est le lieu de récolte de cette plante ?

Montagnes
Endroits pierreux
Au bord des rivières
Autres :

Est-ce qu'elle est consommable par les animaux ? Oui Non
Aucune idée

Quelle est la partie consommée ? Partie aérienne Racines

- Quels sont les effets ressentis (efficacité du traitement) après l'utilisation de la plante ?

- Y-a-t 'il des effets secondaires ? oui non

- Quelle est la fréquence d'utilisation (nb de fois par jour) et la durée du traitement ?

- Connaissez-vous des contre-indications à l'usage de cette plante ?

Manuel de préparation

1. Liqueur de Fehling

Réactif à chaud.

○ Solution A

CuSO₄ 35 g Eau distillée 500 cc contenant 5 mL d'H₂SO₄.

Laissez refroidir puis compléter au litre avec l'eau distillée.

○ Solution B

Sels de Seignette.

150 g Eau distillée 500 mL, refroidir puis ajouter 300 mL de lessive de soude non carbonaté, compléter au litre avec l'eau distillée.

Mélanger les deux solutions à volume égal au moment de l'emploi.

2. Réactif de Valsler-Meyer

Iodure de potassium 25 g

Chlorure mercurique 6,77 g

Eau distillée 250 mL

3. Réactif de Dragendorff

Nitrate de bismuth pulvérisé 20,80 g

Iode 38,10 g

Iodure de sodium anhydre 200 g

Eau distillée 1000 mL

Agiter pendant 30 min.

4. Réactif de DPPH

1-1diphenyl 2 picril hydrazyle (2,5 mg par mL de méthanol) .

5. Matériels utilisés pour les réactions de caractérisation

Balance analytique de précision, tubes à essai de 5, 10 mL et 15 mL, entonnoir, coton, papier filtre wattman , éprouvettes, pipettes de 5 et 10 mL, erlenmeyer de 100 mL, poire, fiole, pince, bain-marie, chauffe-ballon, spatule métallique, capsule en verre, ampoule à décanter, étuve agitatrice (réglée à 37 degré Celsius), verre de montre, four électrique réglé à 100 degré Celsius.

6. Matériel technique antimicrobien

Étuve, réfrigérateur, milieu de culture, boîte de pétri, anse de platine, pipette pasteur, eau physiologique, tube stérile, disques d'antibiotiques non imprégnés, RPMI -1640.

micropipettes de 20, 100 et 1000 μ L, pipettes stérilisées, balance de précision, écouvillons, coton, microplaques 96 puits, eau distillée, tubes à vice, tubes à hémolyse,

7.Produits

Bouillon nutritif, Bouillon Muller Hinton, Bouillon sabouraud,

Gélose Nutritif, Gélose Muller Hinton, Gélose sabouraud.

Eau distillée.

○ **Protocole**

- Peser la masse nécessaire de gélose nutritive pour 250 mL d'eau distillée.
- Dissoudre le produit dans le diluant à l'aide de l'agitateur.
- Chauffer au bec jusqu'à l'ébullition.
- Laisser refroidir.

Lorsque la préparation a atteint une température inférieure à 60°C couler dans des boîtes de pétri et des tubes à vice stérilisés.

Proposition

Engagement vital

Je jure auprès d'ALLAH le tout miséricordieux,
en présence des enseignants de la faculté des sciences de la nature et
de la vie et science de la terre et l'univers (SNV/STU) ;

De consentir mes connaissances à aider et développer la recherche
scientifique et d'enseigner avec rigueur les étudiants.

De ne jamais oublier ma responsabilité tant qu'éducatrice, que je
serai fidèle à témoigner et d'assurer sincèrement ma mission envers
l'enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de l'enseignement, l'éducation et la santé
publique ma profession avec conscience.

D'honorer ceux qui ont contribué de près ou de loin dans les préceptes
de mon égard et de leurs assurer ma reconnaissance en restant toujours
fidèle.

De prouver autant qu'intellectuelle ma dignité en respectant le divin,
De développer mes connaissances, mon savoir être et mon savoir-faire
au profit de la création.

De sentir, d'apprécier, de valoriser, de promettre avec dignité mon
devoir envers l'être vivant.

De saugraiter avec méfiance, conscience et confiance
mes compétences au profit de la science.

De mépriser avec fierté si j'y manque avec dévouement d'être
toujours moi - même.

De procéder avec élégance et confiance la personne en respectant soi -
même.

Vis en harmonie, vis en paix.

Vis en harmonie, vis en paix.

Résumé

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques d'une espèce végétale spontanée de la famille des astéracées de la région de Tlemcen, *Echinops spinosus*.

L'enquête ethnobotanique effectuée auprès de la population de Tlemcen a montré que cette plante est très utilisée en médecine traditionnelle pour expulser le placenta chez les femmes après l'accouchement.

L'analyse phytochimique a mis en évidence la présence des tanins catéchiques, des quinones, des sucres réducteurs et des flavonoïdes au niveau des deux parties de la plante, avec une faible quantité d'alcaloïdes et une absence de saponosides.

Le rendement le plus élevé est celui de l'extrait hydro-acétonique des racines avec un pourcentage de 24 et de 21,8 pour la partie aérienne.

L'extrait brut aqueux des racines a présenté la teneur la plus élevée en phénols totaux avec un pourcentage de $852 \pm 0,01$ mg EAG/100g de MS.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage du radical libre (DPPH) a montré que l'ensemble de nos extraits possèdent des propriétés antioxydantes.

L'extrait acétate d'éthyle des tanins de la partie aérienne présente une meilleure capacité réductrice et un fort piégeage de radicaux libres ($IC_{50} = 8,25 \mu\text{g/mL}$). L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique sur gélose et en milieu liquide a révélé que le pouvoir antimicrobien des fractions des tanins et des flavonoïdes est plus important que celui des extraits bruts.

L'extrait aqueux des racines ne présente aucune activité hémolytique.

Mots clés : *Echinops spinosus*, métabolites secondaires, ethnobotanie, phytochimie, activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité anti-hémolytique.

Abstract

In order to search for new natural products, our work is devoted to the phytochemical study and evaluation of the biological activities of a plant species growing naturally in the Tlemcen region called *Echinops spinosus* belong to the Asteraceae family.

The ethnobotanical survey of the population of Tlemcen has shown that this plant is used in traditional medicine to expel the placenta in women after childbirth.

Phytochemical analysis revealed the presence of, the catechin tannins, quinones, reducing sugars, flavonoids in the two parts of the plant, with a small amount of alkaloids. However, a complete absence of saponins has been noticed.

The performance of various extracts is performed, the highest performance is that of the aqueous acetone extract of the roots with a percentage of 24 followed by the aerial part with a percentage of 21,8.

The aqueous crude extract of roots presented the highest content of total phenols with a percentage of 852 ± 0.01 mg EAG / MS + 100g.

Evaluation of antioxidant activity by the iron reduction method (FRAP) and the sequestration of free radical (DPPH) showed that all of our extracts have antioxidant properties.

The ethyl acetate extract tannins of the aerial part has better reducing capacity and a strong free radical scavenging ($IC_{50} = 8.25$ mg / mL). Other extracts, meanwhile, show interesting antioxidant powers. The evaluation of the antimicrobial activity of the extracts on bacterial strains and yeasts by the diffusion method on solid medium and method of distribution of liquid media show that the antimicrobial power of fractions of tannins and flavonoids is more important than crude extracts.

The evaluation of the anti-hemolytic activity showed that the aqueous extract of roots which is widely used in traditional medicine exhibits no cell lysis.

Keywords: *Echinops spinosus*, secondary metabolites, ethnobotany, phytochemistry, antioxidant, antibacterial, antifungal, anti-haemolytic activity.

ملخص

من أجل البحث عن المنتجات الطبيعية الجديدة، يختص عملنا في دراسة الكيمياء النباتية وتقييم الأنشطة البيولوجية لأنواع النباتات التي تنمو بشكل طبيعي في منطقة تلمسان التي تدعى القفص الشوكي والتي تنتمي إلى عائلة الأستراسيا.

وقد أظهرت الدراسة الإثنو نباتية لسكان تلمسان أنه يستخدم هذا النبات في الطب التقليدي خاصة لطرده المشيمة لدى النساء بعد الولادة. وكشف التحليل الكيميائي النباتي إلى وجود العفص، الكينونات، السكريات المرجعة، الفلافونويدات في جزأي النبتة، مع كمية صغيرة من أشباه القلويدات. في حين لوحظ غياب تام من الصابونين.

أعلى مردود للمستخلصات هو لجذور مستخلص الهيدروأستون بنسبة 24 يليه الجزء الهوائي للنبتة بنسبة 21.8. تم تحديد الفينولات الكلية، الفلافونويد والعفص التي أجريت على المستخلصات الخام المائية والميثانولية و هذا من منحنيات حمض الغاليك والكاتشين على التوالي. قدم استخراج الفينولات الكلية من جذور النبتة أعلى نسبة من إجمالي الفينولات بنسبة 852 ± 0.01 ملغ EAG / MS + 100G وهذا من المستخلص المائي.

أظهر تقييم النشاط المضاد للأوكسدة بطريقة ارجاع الحديد (FRAP) وتثبيط الجذور الحرة (DPPH) أن كل من المستخلصات لديها خصائص مضادة للأوكسدة وخاصة مستخلص استات الإثيل الذي يقدم أقوى مضاد للأوكسدة و انخفاض تثبيط للجذور الحرة ($IC_{50}=8,25\mu\text{g/mL}$). المستخلصات الأخرى بدورها تبين قدرة هامة لمضادات الأوكسدة. تظهر دراسة نشاط المقتطفات على السلاسل البكتيرية و الخمائر ان الفلافونويدات و عفص الجذور لهم قدرة مضادة للمكروبات أكثر أهمية مقارنة بما كان عليه في العينات الأخرى هذا بطريقتي التوزيع على الصلب و طريقة التوزيع على السائل.

أظهر النشاط مانع انحلال الدم ان المستخلص المائي للجذور المستعمل في الطب البديل لا يظهر اي تحلل للخلية.

الكلمات المفتاحية

المستخلصات النباتية، المركبات الثانوية، فوطوكيمياء، انتوبوتانيك، مضادات الأوكسدة، مضاد للجراثيم، مضاد للفطريات، نشاط مانع انحلال الدم.