



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



Université Aboubekr Belkaïd 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 Cellulaire et Biochimie

Option : Substances à visée thérapeutique

Par:

BENTABET-LASGAA Nesrine

Thème

**Etude phytochimique et évaluation des
activités biologiques de deux plantes *Fredolia
aretioides* et *Echium vulgare* de l'ouest Algérien**

Soutenue le:

Devant le jury composé de:

Présidente :	Mme Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Directeur de thèse :	Mr Boucherit Kebir	Professeur	Centre Universitaire de Naâma
Examineurs :	Mr Marouf Abderrazak	Professeur	Centre Universitaire de Naâma
	Mr Baba Hamed Mohammed Bey	Professeur	Université d'Oran Es-sénia
	Mme Hassaine Hafida	Professeur	Université de Tlemcen
	Mr Lahfa Farid Boucif	Maître de conférences A	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2014-2015

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail:

A mes très chers parents et ma grand mère, pour les encouragements, tendresse, amour et soutien durant mes études ; vous trouverez ici le fruit de vos sacrifices et je souhaite que j'ai réalisé l'un de vos rêve par ce modeste travail. Puisse Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur.

*A mes chères sœurs: Douniazad et chahrazad pour
leur amour et compréhension*

A mon mari Abdelwahab, pour son encouragement et son soutien constant.

A toute ma famille et ma belle famille ainsi qu'à tous mes amis.

Remerciements

Au Nom de Dieu le Très Miséricordieux – le Tout Miséricordieux – Que Dieu bénisse le Prophète Mouhammad, Imam des Bienheureux et Sauvegarde des Purifiés – ainsi que sa Noble Famille et ses Satisfaisants compagnons- Amin.

Je rends grâce à Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout.

Mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux s'adressent à mon directeur de thèse, Monsieur Boucherit Kebir, Professeur au Centre Universitaire de Naâma. Votre rigueur scientifique, votre grande générosité et votre détermination pour la recherche et l'enseignement sont connus de tous et font de vous un exemple exceptionnel à suivre. Veuillez trouver dans cet ouvrage l'expression de mes plus profonds respects et mon entière reconnaissance.

J'exprime mes plus vifs remerciements, ma reconnaissance toute particulière et ma gratitude, qui ne seront jamais concrètement exprimées à l'égard de Madame Boucherit-Otmani Zahia, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université de Tlemcen, pour l'aide précieuse et chaleureuse qu'elle m'a apporté au sein du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique. Votre dévouement pour l'enseignement, la recherche et votre rigueur scientifique ne sont plus à démontrer. Veuillez trouver par ces quelques mots Madame le Professeur, l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.

Mes remerciements vont aussi :

- A Mr. Lahfa Farid Boucif, Maître de Conférences classe A à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université de Tlemcen. Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement précis et clair. Votre rigueur scientifique, l'amour du travail bien fait et votre grande disponibilité ne sont égale qu'à votre générosité et votre modestie. Je vous remercie pour le grand honneur que vous faites en acceptant de juger ce travail.

- A Mr. Marouf Abderrazak, Professeur au Centre Universitaire de Naâma, d'avoir accepté de juger ce modeste travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse et très sincère gratitude.

- A Mr. Baba Hamed Mohammed Bey, Professeur à l'université d'Oran Es-sénia, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.
- A Mme Hassaine Hafida, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université de Tlemcen qui malgré ses multiples occupations, a accepté de juger cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

Ce travail n'aurait pu se faire sans le soutien de Mr Guellil L., Mr Bab Ali et Mr Arous S. ainsi que les membres de la réserve naturelle de Tlemcen, qui m'ont accompagné durant les sorties de cueillette des deux plantes (saharienne et locale). Je les remercie vivement pour m'avoir orientée et guidée sur terrain.

Je remercie mes collègues et amies pour leur soutien et plus précisément Adida Houria, Bachri Asma, Mezouar Dounia, Mezzarai Rabha, Ghaffour Kamila, Lahfa Imene, Brikci bakkal ouassila, Bekhti Zineddine, Rahmoun Nadjib, Belkacem Nacera, Arous sofiane, Babaahmed Samia, Benmansour Fatima Zohra, Kharbouche Hanane, Bendjalloul Meriem, Mazari Wissem, Belmir Sarra, Medjahdi Khadidja et bien sure Seghir Abdelfatteh pour leur aide et leur amitié.

Je n'oublie pas nos techniciennes de laboratoire Mme Benichou ismahane et Mme Benladgheme Rachida pour leur aide constante.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements à tous ceux qui m'ont soutenu dans la préparation de cette thèse. A tout le personnel du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, la bonne ambiance qui règne dans notre laboratoire m'a permis de travailler dans d'excellentes conditions. Merci pour tout.

Ma reconnaissance va également à tout le personnel du laboratoire vétérinaire surtout à Mr Bendimerad Khateb, Mr Berri Djamel, Mr Zekri Norredine et Mr Berixi Nabil, ainsi qu'au personnel du laboratoire de control de qualité (CAQ) de Tlemcen.

A tout le personnel administratif et technique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen.

A toute ma famille et ma belle famille, Merci pour votre soutien et vos encouragements; Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

Très cordialement.

Table des matières

	Introduction générale	1
Première partie	Synthèse bibliographique	4
Deuxième partie	Matériel et Méthodes	13
1.	Matériel biologique	14
1.1.	Matériel végétal	14
1.2.	Microorganismes	14
1.3.	Globules rouges humains	16
2.	Méthodes	16
2.1.	Etude ethnobotanique	16
2.1.1.	Description des zones d'étude	16
2.1.2.	Méthode d'étude	19
2.2.	Analyses phytochimiques	20
2.2.1.	Screening phytochimique	20
2.2.2.	Quantification et caractérisation des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins par méthode spectrophotométrique	22
2.3.	Préparation des extraits végétaux	26
2.3.1.	Préparation des extraits bruts d' <i>Echium vulgare</i> et de <i>Fredolia aretioides</i>	26
2.3.2.	Extraction sélective des flavonoïdes des deux parties d' <i>Echium vulgare</i> (Fraction acétate d'éthyle et n-butanol)	26
2.3.3.	Extraction des tanins des deux parties de <i>Fredolia aretioides</i>	28
2.3.4.	Rendement des extraits secs	29
2.4.	Analyses biologiques	29
2.4.1.	Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits	29
2.4.2.	Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures	30
2.4.3.	Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des moisissures	31
2.4.4.	Evaluation de l'activité antioxydante	31
2.5.	Propriétés de conservation du produit cosmétique par les extraits de <i>Fredolia aretioides</i> et <i>Echium vulgare</i>	34
2.5.1.	Réalisation d'un shampoing	34
2.5.2.	Propriétés de conservation des extraits	35

2.6.	Evaluation de l'activité hémolytique des extraits des plantes étudiées vis-à-vis des globules rouges humains	40
2.6.1.	Préparation de la suspension érythrocytaire	40
2.6.2.	Mesure de la fuite de l'hémoglobine	40
Troisième partie	Résultats et interprétation	41
1.	Etude ethnobotanique	42
1.1.	Classes d'âge	42
1.2.	Sexe d'appartenance	43
1.3.	Niveau de scolarisation	43
1.4.	Domaines d'indication thérapeutique	45
1.5.	Parties utilisées	45
1.6.	Mode de préparation	45
2.	Analyses phytochimiques	47
2.1.	Tests phytochimiques	47
2.1.1.	Tests phytochimiques des extraits de <i>Fredolia aretioides</i>	47
2.1.2.	Tests phytochimiques des extraits d' <i>Echium vulgare</i>	49
2.2.	Quantification et caractérisation des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins par méthode spectrophotométrique	51
2.2.1.	Détermination de la teneur en polyphénols	51
2.2.2.	Dosage des flavonoïdes totaux	53
2.2.3.	Dosage des tanins	53
2.3.	Rendements en extraits secs	55
3.	Analyses biologiques	57
3.1.	Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits d' <i>Echium vulgare</i>	57
3.1.1.	Méthode de diffusion des disques	57
3.1.2.	Méthode de la microdilution en milieu liquide	59
3.2.	Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de <i>Fredolia aretioides</i>	61
3.2.1.	Méthode de diffusion des disques	61
3.2.2.	Méthode de la microdilution en milieu liquide	63
3.3.	Evaluation de l'activité antifongique des extraits d' <i>Echium vulgare</i> et de <i>Fredolia aretioides</i>	65
3.3.1.	Méthode de diffusion des disques	65

3.3.2.	Méthode de la microdilution en milieu liquide	67
3.4.	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Fredolia aretioides</i>	69
3.4.1.	Méthode de réduction de fer (FRAP: <i>Ferric reducing antioxidant power</i>)	69
3.4.2.	Méthode du piégeage du radical libre DPPH [•] (2,2-diphenyl 1-1picrylhydrazyl)	71
3.5.	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits d' <i>Echium vulgare</i>	74
3.5.1.	Méthode de réduction de fer (FRAP: <i>Ferric reducing antioxidant power</i>)	74
3.5.2.	Méthode du piégeage du radical libre DPPH [•] (2,2-diphenyl 1-1picrylhydrazyl)	76
4.	Propriétés de conservation d'un produit cosmétique par les extraits	78
4.1.	Extrait acétate d'éthyle des racines de <i>Fredolia aretioides</i>	79
4.2.	Extraits n-butanol et acétate d'éthyle des racines d' <i>Echium vulgare</i>	81
5.	Evaluation de l'activité hémolytique des extraits des plantes vis-à-vis des globules rouges humains	83
Quatrième partie	Discussion générale	86
Cinquième partie	Conclusion et perspectives	94
Sixième partie	Références bibliographiques	97
	Annexes	108

Liste des tableaux

- Tableau N°1:** Microorganismes utilisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.
- Tableau N°2:** Questionnaire portant sur le malade, la plante étudiée et son utilisation par la population.
- Tableau N°3:** Formulation de base d'un shampoing.
- Tableau N°4:** Liste des microorganismes utilisés par l'ISO 11930, les recommandations du comité scientifique de la sûreté du consommateur (SCCS), le Schülke Koko, la pharmacopée européenne, la pharmacopée des états unis et l'association des nations sud-est asiatique.
- Tableau N°5:** Nombre de microorganismes et quantité d'inoculum, utilisés dans le challenge test.
- Tableau N°6:** Répartition de la fréquence d'utilisation de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare* par classe d'âge.
- Tableau N°7:** Répartition de la fréquence d'utilisation de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare* par sexe.
- Tableau N°8:** Répartition de la fréquence d'utilisation de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare* selon le niveau d'études.
- Tableau N°9:** Répartition des différentes parties utilisées de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare*.
- Tableau N°10:** Répartition des différents modes de préparation de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare*.
- Tableau N°11:** Caractérisation des groupes chimiques dans les extraits des racines, des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides*.
- Tableau N°12:** Caractérisation des groupes chimiques dans les extraits des racines, des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare*.
- Tableau N°13:** Teneurs en polyphénols dans les extraits hydro-méthanoliques des racines, des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare*.

- Tableau N°14:** Tanins condensés et hydrolysables des racines, des tiges et des feuilles de *Fredolia aretioides* (en %).
- Tableau N°15:** Tanins condensés et hydrolysables des racines, des tiges et des feuilles d'*Echium vulgare* (en %).
- Tableau N°16:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des racines d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.
- Tableau N°17:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.
- Tableau N°18:** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits des racines d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.
- Tableau N°19:** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.
- Tableau N°20:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des racines de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.
- Tableau N°21:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.
- Tableau N°22:** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits des racines de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.
- Tableau N°23:** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.
- Tableau N°24:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits d'*Echium vulgare* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.
- Tableau N°25:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.

- Tableau N°26:** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits d'*Echium vulgare* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.
- Tableau N°27:** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.
- Tableau N°28:** Valeurs des IC₅₀ des extraits des deux parties de *Fredolia aretioides*.
- Tableau N°29:** Valeurs des IC₅₀ des extraits des deux parties d'*Echium vulgare*
- Tableau N°30:** Critères d'acceptation du produit cosmétique selon les normes de la pharmacopée européenne.
- Tableau N°31:** Propriétés de conservation du shampoing par l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* : test de challenge
- Tableau N°32:** Propriétés de conservation du shampoing par l'extrait n-butanol et l'extrait acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* : test de challenge.

Liste des figures

- Figure N°1:** Les différentes parties d'*Echium vulgare*.
- Figure N°2:** Morphologie de *Fredolia aretioides*.
- Figure N°3:** Situation géographique de la zone d'étude "Béchar".
- Figure N°4:** Situation géographique de la zone d'étude "Tlemcen".
- Figure N°5:** Réaction entre la vanilline et les tanins condensés.
- Figure N°6:** Protocole d'extraction des flavonoïdes.
- Figure N°7:** Schéma d'extraction des tanins des parties aériennes et des racines de *Fredolia aretioides*.
- Figure N°8:** Forme libre et réduite du 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH).
- Figure N°9:** Protocole expérimental du test de challenge.
- Figure N°10:** Répartition des différentes utilisations de *Fredolia aretioides* dans la wilaya de Béchar.
- Figure N°11:** Répartition des différentes utilisations d'*Echium vulgare* dans la wilaya de Tlemcen.
- Figure N°12:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.
- Figure N°13:** Courbe d'étalonnage de la catéchine.
- Figure N°14:** Teneur en flavonoïdes totaux des racines, feuilles et tiges d'*Echium vulgare*.
- Figure N°15:** Rendements des extraits d'*Echium vulgare*.
- Figure N°16:** Rendements des extraits de *Fredolia aretioides*.
- Figure N°17:** Variation du pouvoir réducteur des extraits des racines, des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.
- Figure N°18:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH' en fonction des concentrations des extraits des racines, des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* et de l'acide ascorbique.
- Figure N°19:** Variation du pouvoir réducteur des extraits des racines, des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.
- Figure N°20:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH' en fonction des concentrations des extraits d'*Echium vulgare*.
- Figure N°21:** Effets des extraits des plantes solubilisés dans le DMSO sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les globules rouges humains.

Liste des abréviations

AlCl₃	: Chlorure d'aluminium
AmB	: Amphotéricine B
ATCC	: American Type Culture Collection
BHA	: Butylhydroxyanisole
BHT	: Butylhydroxytoluène
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO	: Diméthyl sulfoxyde
DPPH	: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra-acétique
EP	: Pharmacopée Européenne
FeCl₃	: Chlorure de fer
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
IC₅₀	: Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH
IP	: Institut Pasteur
MeOH	: Méthanol
mg EAG/g	: mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche
mg ECQ/g	: mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche
MNHN	: Muséum National d'Histoire Naturelle
M.S	: Matière sèche
NaCl	: Chlorure de sodium
NaNO₂	: Nitrite de sodium
NaOH	: Hydroxyde de sodium
NCCLS	: National Clinical Committee Laboratory Standards
NH₄OH	: Hydroxyde d'ammonium
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SOD	: Superoxyde dismutase
UFC	: Unité Formant Colonie

Introduction générale

L'utilisation des plantes en thérapeutique (phytothérapie) est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent.

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique, mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmises de génération en génération (oralement ou par écrit) **(Adjanohoun et coll., 2001)**.

Actuellement l'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'environ 80% des habitants du monde ont recours à la médecine traditionnelle à base de plante en tant que soins de santé primaire **(OMS, 2012)**.

Sachant qu'une plante peut contenir plusieurs milliers de substances différentes, on peut se rendre compte de la richesse naturelle du règne végétal.

Dans le contexte socio-économique des pays en développement, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates et de faible prix qui s'ajoutent à une efficacité scientifique prouvée et une acceptabilité culturelle optimale.

Ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressent aux composés des plantes qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les molécules issues des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments; sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel **(Berube et Gagnon, 2006)**.

La valorisation de ces plantes passe inévitablement par des criblages phytochimiques et par l'extraction et l'étude de leurs caractéristiques physico-chimiques. Les activités antimicrobiennes et antioxydantes ont été rapportées par plusieurs travaux. Dans la plupart des cas, ces activités sont attribuées à leurs compositions chimiques.

Partant de ces données, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques de deux plantes de l'ouest Algérien, *Echium vulgare* et *Fredolia aretioides*. Ces deux plantes sont connues pour leurs usages traditionnels et fréquents chez nos populations.

En effet, *Echium vulgare* est recommandée pour une large gamme d'applications médicales, tel que le traitement des rhumes, toux, fièvres, maux de tête, rétention d'eau, les calculs rénaux, l'inflammation, la douleur, la promotion de la cicatrisation des plaies, le traitement de la peau et des furoncles rougie et la mélancolie [(Chiej, 1984) ; (Cox, 1985)]. De plus, Tabata et coll., (1975), ont trouvées que les pigments naphthoquinoniques, shikonines et alkannins d'*Echium vulgare* agissent comme agents antimicrobiens contre les bactéries lactiques et contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Sarcina lutea*.

De même, *Fredolia aretioides* est très utilisée en médecine traditionnelle comme antirhumatismal, diurétique, Hypoglycémiant et un antidote au poison [(Khedache, 1999) ; (El Mansouri, 2011)]. Parmi les 52 plantes indigènes Algériennes étudiées par Rached et coll., (2010), l'extrait aqueux des racines de *Fredolia aretioides* présente une bonne activité antioxydante.

Nous avons axé notre travail sur l'étude de ces plantes, tant d'un point de vue ethnobotanique que chimique et les activités biologiques des extraits qui en sont issus. Pour cela nous avons réalisé :

- Une recherche ethnobotanique sur *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare* ;
- Identifier les différents groupes chimiques présents dans les feuilles, les tiges et les racines des deux plantes ;
- Déterminer le pouvoir antibactérien et antifongique (*in vitro*) des extraits obtenus à partir des deux plantes ;
- Déterminer l'activité antioxydante des extraits des deux plantes par la méthode de FRAP et de DPPH ;
- Evaluer le potentiel des extraits de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare* dans la conservation d'un produit cosmétique élaboré au sein du laboratoire selon les recommandations internationales de la préparation des produits cosmétiques ;
- Etudier l'activité hémolytique de certains extraits des deux plantes vis-à-vis des globules rouges humains.

Première partie
Synthèse bibliographique

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaire des millénaires jusqu'à la récente civilisation Chinoise, Indienne et du Proche-Orient. Elle est devenue certainement un art **(Hamburger et coll., 1991)**.

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seul un nombre relativement petit d'espèces de plantes ont été étudiées sur les plans phytochimiques et pharmacologiques, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à des milliers de constituants différents.

Récemment, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques, ont conduit les scientifiques à chercher des substances naturelles dotées d'activité antimicrobienne et antioxydante. Les principales difficultés qui accompagnent le traitement des maladies par les médicaments conventionnels sont leur inaccessibilité en particulier à cause de leur coût élevé, la résistance progressive de l'agent pathogène vis-à-vis des substances actives et la manifestation d'effets secondaires sévères voir même toxiques dans certains cas.

Sans énumération exhaustive de cas, plusieurs résistances ont été rapportées, en particulier celle du *Plasmodium falciparum* face aux médicaments standards antipaludiques **[(Kraft et coll., 2002) ; (Portet et coll., 2007)]**.

Des suspicions de résistance des parasites de la bilharziose contre le praziquantel sont rapportées **(Soliman et Ibrahim, 2005)**. En terme de contre effet, le métronidazole provoquerait des maux de tête et des nausées ; il serait même cancérigène **(Calzada et coll., 2006)**. De même, la leishmaniose, un des problèmes importants de santé publique selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) entraînant une morbidité et une mortalité significatives, est cliniquement traitée par les composés de l'antimoine pentavalent qui seraient toxiques et présenteraient des effets secondaires **[(Iranshahi et coll., 2007) ; (Filho et coll., 2008)]**.

Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales est orienté vers l'obtention de phytomédicaments. Ces plantes médicinales sont essentiellement utilisées sous deux formes, soit complexe contenant un large spectre de constituants (infusion, décoction, huiles essentielles et extraits des teintures) soit pure, chimiquement définie comme principe actif.

Avant la 2^{ème} guerre mondiale, une série de produits naturels de source végétale, sont devenus des agents chimiques utilisés jusqu'à ce jour comme la quinine (*Cinchona ledgeriana*), la morphine et la codéine (*Papaver somniferum*) et bien d'autres agents à activités diverses.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules d'origine végétale douées d'une activité biologique, il est donc préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le hasard, mais de le circonscire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier. Une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales.

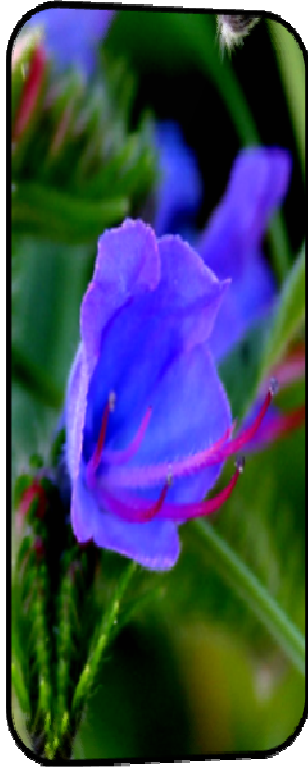
La flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique **(Dupont et Guignard, 2007)**. La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique Algérienne et aura un impact économique certain. Cette flore regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques. C'est le cas de *Citrullus colocynthis*, *Juniperus phoenicea*, *Rosmarinus officinalis*, *Peganum harmala*, *Tetraclinis articulata*, *Zizyphus lotus*... qui présentent des propriétés biologiques intéressantes **[(Bnouham et coll., 2002) ; (Gonzalez-Tejero et coll., 2008)]**.

Plusieurs travaux ont fait l'objet de publications dans le cadre du programme de notre laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physicochimique, Synthèse et Activité Biologique de l'université de Tlemcen, et qui sont destinés à la valorisation de la flore Algérienne afin de développer de nouveaux composés ou principes actifs à intérêts thérapeutiques et ceci sur des plantes locales dont *Citrullus colocynthis*, *Punica granatum*, *Lawsonia inermis*, *Cinnamomum cassia* et *Ficus carica*. Parmi ces activités, l'activité antidiabétique étudiée chez des rats Wistar *in vitro* sur des cellules isolées et *in vivo* chez les rats normaux et rendus diabétiques par la streptozotocine [(Benariba et coll., 2009) ; (Belkacem et coll., 2010)]. L'activité antioxydante *in vitro* (Benariba et coll., 2012), antimicrobienne *in vitro* sur des souches bactériennes et de levures [(Marghache et coll., 2012) ; (Rahmoun et coll., 2013)] et pharmaco-toxicologiques (Azzi et coll., 2012) sont réalisées.

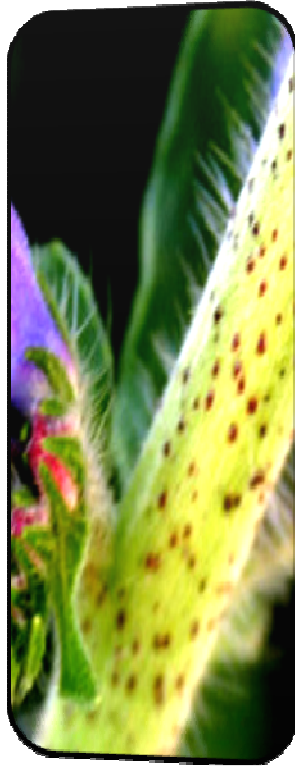
Sachant que les métabolites secondaires des plantes manifestent un spectre de propriétés pharmacologiques, la maîtrise totale et parfaite des différentes propriétés de ces plantes passe par la détermination de l'ensemble des groupes physico-chimiques capables d'engendrer un ou plusieurs effets pharmacologiques, est aujourd'hui un objectif qui occupe un ordre de première place [(Wollgast et Anklam, 2000) ; (Gómez-Caravaca et coll., 2006)].

Notre choix à porté sur l'étude de deux plantes médicinales, *Echium vulgare* appelée communément la vipérine vulgare et *Fredolia aretioides* (Chénopodiacée) plante endémique du Sahara Algérien.

Echium vulgare est appelée communément le chardon bleu, la vipérine, la langue d'oie ou l'herbe piquante (Darbyshire et coll., 2000). Elle appartient à la famille des borraginacées qui sont des plantes dicotylédones, herbacées et vivaces. *Echium vulgare* (du grec *echis* qui signifie vipère) est une plante bisannuelle, verte, de 30 à 80 cm de longueur qui peuple les terres non cultivées, terrains caillouteux et les zones côtières. La plante est entièrement recouverte de poils raides. Elle possède une tige dressée, ordinairement très rameuse portant des feuilles hispides de 2 à 25 cm de longueur. Sa longue panicule en forme d'épi regroupe des fleurs de couleurs bleues ou violacées (Bock, 2012) (figure N°1).



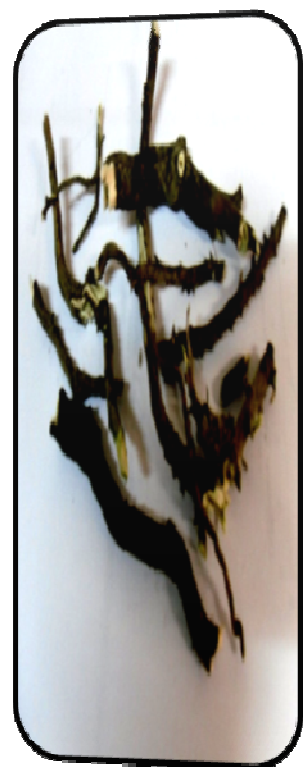
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure N°1: Les différentes parties d'*Echium vulgare*. La fleur (a), la tige (b), les feuilles (c) et les racines (d).

Les propriétés médicinales de la vipérine rappellent fortement celles de la Bourrache (*Borago officinalis*), riche en mucilage à fructosanes et en alcaloïdes hépatotoxiques. On utilise les sommités fleuries et les feuilles sous forme d'infusion pour bénéficier de leurs propriétés astringentes, émoullientes, expectorantes, sudorifères et on en use pour prévenir les bronchites et la grippe (**Boullard, 2001**).

Les racines d'*Echium vulgare* sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des fissures sur les mains, ainsi que pour les cicatrifications des plaies à l'instar de l'allantoïne (**Sezik, 1997**). Appliquées en cataplasme ou en pansement, ses racines sont des baumes efficaces contre les brûlures et les furoncles (**Tanaka et coll., 1986**).

EI-Shazly et ses collaborateurs (1999) isolent 18 types d'alcaloïdes de pyrrolizidine de la vipérine, avec échimidine (49,8%), 3'-acetyléchimidine (10,2%) et un isomère échimidine (20,9%) constituant la grande partie de la teneur totale en alcaloïdes de la plante.

Une deuxième catégorie de substances potentiellement toxiques trouvées dans la plante *Echium vulgare* est représentée par les pigments naphthoquinoniques, shikonines et alkannins (**Lin et coll., 1980**).

Ces pigments agissent comme agents antimicrobiens contre les bactéries lactiques et contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Sarcina lutea* [(**Sherbanivs'kii, 1971**) ; (**Tabata et coll., 1975**)]. Ils permettent également de réduire l'enflure dans les tissus blessés. Ils ont également une activité anti-tumorale (**Papageorgiou, 1980**). Un criblage biologique de divers extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de plantes médicinales réalisé par l'équipe de **Karakas en 2012**, a révélé que *Echium vulgare* possède une activité anticancéreuse.

Les travaux effectués par **Chaouche en 2012** sur *Echium pycnanthum pomel*, ont montré que les extraits bruts des racines et des feuilles, ainsi que les extraits spécifiques des flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle), des saponines et des tanins des feuilles ont une bonne activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Peu de travaux scientifiques sur *Echium vulgare* sont publiés. La population Algérienne la confond avec la Bourrache (*Borago officinalis*) et l'utilise de manière identique. La chimie et les différentes activités biologiques de l'espèce restent insuffisamment étudiées ainsi que l'application de ces activités dans la conservation des produits cosmétiques.

Par ailleurs, les sols sahariens composés d'un substrat minéral développent une activité microbienne. Ainsi certaines plantes médicinales sahariennes possèdent des molécules antibactériennes et antifongiques à spectre d'action intéressant **(Bouhadjera et coll., 2005)**.

Compte tenu de la variété et de la richesse de cette flore du Sahara Algérien, ainsi que du nombre restreint de plantes locales ayant fait l'objet d'investigation clinique, il nous a semblé intéressant d'étudier une de ces plantes déjà utilisée en médecine traditionnelle à savoir *Fredolia aretioides*. Elle est appelée communément le Chou-fleur du Sahara ou Chou-fleur de Bouâmama. C'est un sous arbrisseau nain, formant des coussinets très denses, fortement hémisphériques, pouvant atteindre 2 m de diamètre. Les feuilles sont nombreuses, très serrées et coriaces, devenant blanchâtres par la dessiccation. Les fleurs solitaires et sessiles portent 5 étamines et un ovaire ovoïde atténué en un style court **(figure N° 2)**.

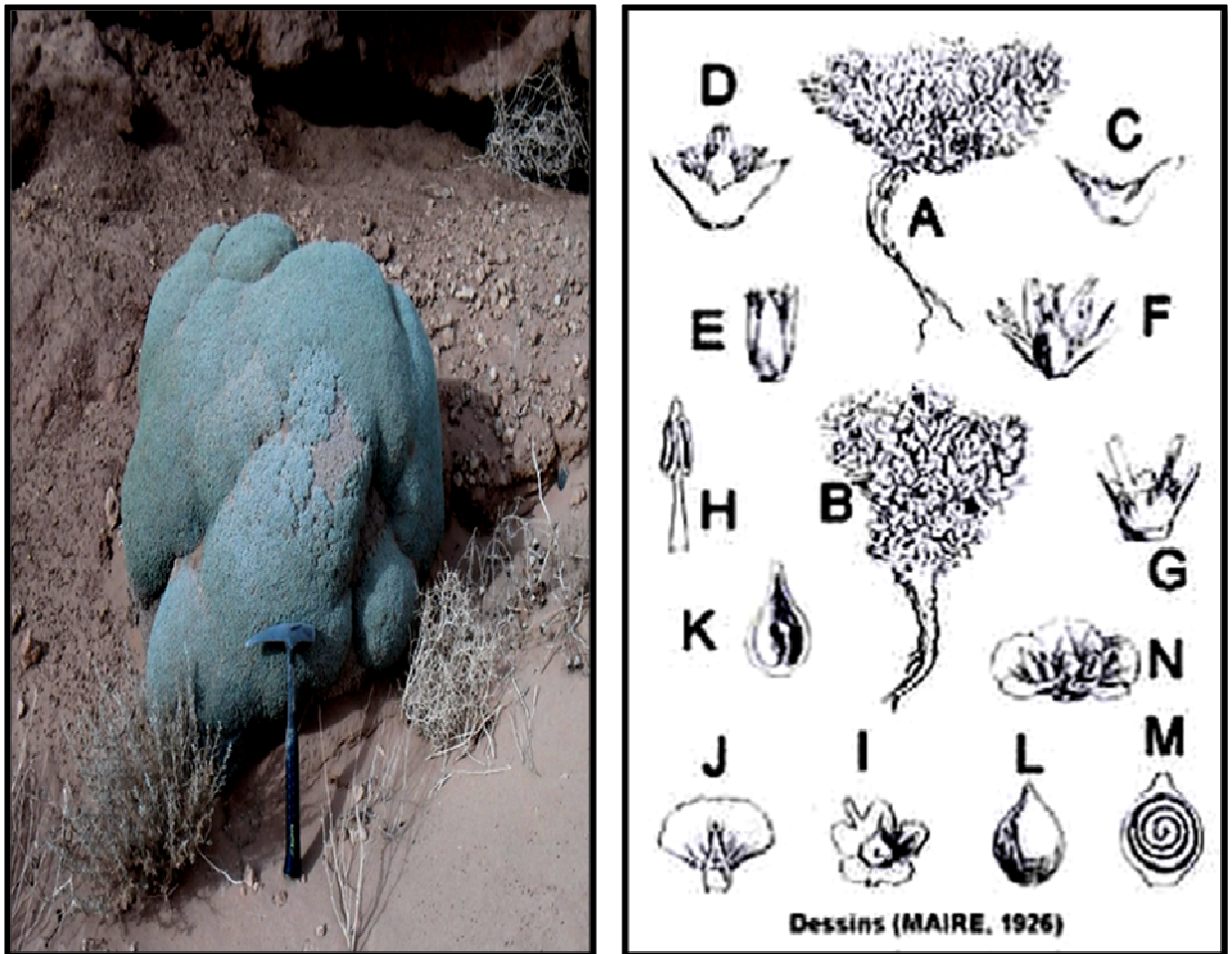


Figure N°2: Morphologie de *Fredolia aretioides*

A. Plante fleurie ; B. Plante fructifère ; C. Feuilles ; D. Sommité fleurie d'une tige ; E. Fleure fermée ; F. Fleure étalée ; G. Anneau staminal ; H. Etamine (face interne) ; I. Nectaires (vue de dessus) ; J. Sépales ; K. Graine (section longitudinale) ; L. Akène (vue de dos) ; M. Akène (section longitudinale) ; N. Calice fructifère.

La floraison a lieu en automne. Le fruit comprimé dorsalement, est un akène entouré par de petites ailes transparentes du périanthe persistant. *Fredolia aretioides* est une plante endémique (**Moali et coll., 2011**). Elle colonise actuellement, une portion très restreinte du Sahara Nord-occidental Algérien. Dans la Wilaya de Béchar, elle constitue des peuplements sur les regs de Béni-Ounif, Taghit, Iqli, Béni Abbès et Zéghamra. Alors que dans la Wilaya de Tindouf, la plante constitue de vastes peuplements dans la région de Tabelbala, dans la Hamada de Tindouf et du Drâa.

Cette plante est très utilisée en médecine traditionnelle. Les feuilles sont préparées sous forme d'infusion ou décoction tandis que les racines sous forme de décoction.

De rares travaux scientifiques sur la plante dans le contexte écologique, botanique et scientifique ont été réalisés. L'inventaire des plantes médicinales antidiabétiques réalisées par l'équipe de **Bnouham en 2002** au Maroc, montre que l'utilisation de la poudre de la partie aérienne de *Fredolia aretioides* présente des effets hypoglycémiants.

Fredolia aretioides appartient à la famille des chénopodiacées dont plusieurs espèces contiennent des composés chimiques doués de propriétés fongicides (**Boughalleb et coll., 2009**). L'étude *in vitro* de l'activité antioxydante des plantes du genre *Salsola* (appartenant à la famille des *Chénopodiacées*) a révélé une importante activité antioxydante des extraits d'alcaloïdes (**Tundis et coll., 2009**).

Plusieurs études réalisées sur quelques espèces du genre *Suaeda* (*Chénopodiacée*) comme *Suaeda fruticosa* ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus*). La plante *Suaeda villosa* présente quant à elle une activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* et de *Fusarium oxysporum* (**Al-Mohammadi et Coll., 2005**).

Deuxième partie
Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé dans le laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » LapSab, du département de Biologie - Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen.

1. Matériel biologique

1.1. Matériel végétal

Notre travail a porté sur les feuilles, les tiges et les racines de deux plantes de l'ouest Algérien. Il s'agit d'*Echium vulgare*, récoltée au mois de Mars 2012 de la région de Remchi, située à 21 km au nord-ouest de la ville de Tlemcen et de *Fredolia aretioides* récoltée en Décembre 2011 de la Wilaya de Béchar, située au sud-ouest Algérien.

Les deux plantes sont séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité dans une étuve à 25 °C pendant une semaine. Elles sont ensuite broyées et les poudres obtenues sont conservées à +4°C dans des flacons hermétiques à l'abri de la lumière.

1.2. Microorganismes

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits des plantes étudiées, nous avons utilisé neuf bactéries (Quatre à Gram positif et Cinq à Gram négatif), deux levures appartenant toutes au genre espèce *Candida albicans* et un champignon filamenteux *Aspergillus flavus* (**tableau N°1**).

Ces souches sont disponibles au sein de notre laboratoire LapSab. Elles sont entretenues par des repiquages successifs et réguliers sur gélose nutritive pour les bactéries et sur gélose Sabouraud pour les levures et les champignons puis conservées à +4°C.

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

Bactéries à Gram positif	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Staphylococcus aureus mrsa</i> ATCC 43300
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25212
Bactéries à Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603.
Levures	<i>Candida albicans</i> IP 444
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Moisissure	<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294

1.3. Globules rouges humains

Pour l'évaluation de l'activité hémolytique, nous avons utilisé un modèle universel de cellules animales, le globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain.

2. Méthodes

2.1. Etude ethnobotanique

Les enquêtes ethnobotaniques contribuent, de leurs parts, à rassembler et constituer une source d'information très précieuse, prête à être exploitée sur le plan scientifique.

Dans ce sens, une étude ethnobotanique se propose de mettre en évidence la place de la phytothérapie dans le système de soin traditionnel au niveau de la ville de Bechar, située dans le sud ouest Algérien et de la ville de Tlemcen localisée au nord ouest Algérien.

C'est dans cette optique que nous avons essayé de:

- Recueillir l'ensemble des informations sur les applications thérapeutiques et traditionnelles locales de nos deux plantes.
- Déterminer l'ensemble des maladies traitées.

2.1.1. Description des zones d'étude

a. Béchar

La wilaya de Béchar est considérée comme la plus grande wilaya du sud-ouest Algérien située dans l'ouest du Sahara Algérien.

Elle correspond à une partie de l'ancien département de la Saoura dont elle était le chef-lieu. Elle s'éloigne de 1150 km au sud-ouest de la capitale Alger, et 852 km de la wilaya de Tindouf et à environ 80 km à l'ouest de la frontière marocaine **(figure N°3)**.

La wilaya de Béchar se situe au sud-ouest du territoire national. Elle est limitée :

- à l'est par la Wilaya d'Adrar,
- à l'ouest par le Royaume du Maroc,
- au nord par les Wilayas de Naâma et d'El Bayadh,
- et au sud par les Wilayas de Tindouf et d'Adrar.

La wilaya de Béchar s'étend sur une superficie de 164 881 Km² pour une population estimée à 279851 habitants (2009), soit une densité de 1,73 habitants/Km².

Le territoire de la wilaya de Béchar est formé de cinq (5) principaux reliefs, les montagnes, les oueds, les regs, les vallées et les ergs.

La Wilaya de Béchar est caractérisée par un climat de type désertique continental. Nous y distinguons deux types de zones:

- La zone de transition : délimitée par Béni Ounif au nord et le parallèle d'Igli au sud, très chaude en été (+ 45°C) et froid rude en hiver (2°C à 3°C). Les précipitations sont de l'ordre de 60 mm/an. Les vents de sable sont fréquents et souvent violents (100 km/h).

- La zone désertique : s'étend au delà de Béni Abbès. Les précipitations sont de l'ordre de 40 mm/an. Les vents de sable sont très fréquents.

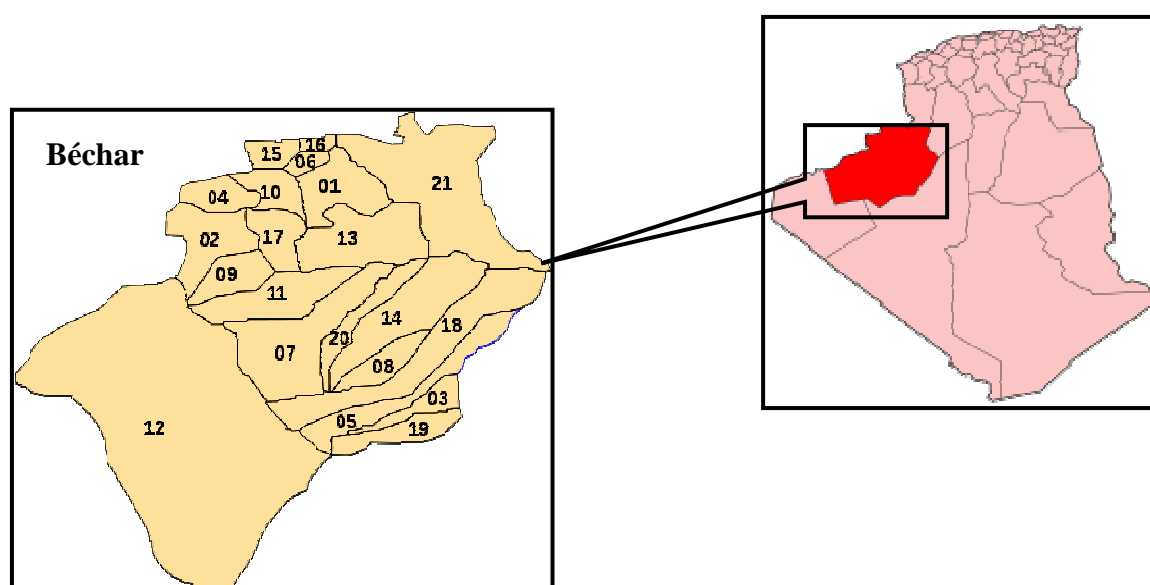


Figure N°3: Situation géographique de la zone d'étude "Béchar".

b. Tlemcen

La Wilaya de Tlemcen occupe une position de choix au sein de l'ensemble national. Elle est située sur le littoral nord-ouest du pays et dispose d'une façade maritime de 120 km. C'est une wilaya frontalière avec le Maroc, avec une superficie de 9017,69 Km².

Le Chef lieu de la wilaya est situé à 432 km à l'ouest de la capitale, Alger.

La wilaya est limitée par:

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

Conformément à la dernière organisation territoriale du pays, la Wilaya de Tlemcen regroupe actuellement 20 Daïras et 53 Communes (**ANDI, 2013**) (**figure N°4**).

La population totale de la wilaya est de 949 135 habitants, soit une densité de 106,6 habitants/Km².

Quatre zones distinguent le relief de la Wilaya de Tlemcen et qui sont: la chaîne des Traras, la zone hétérogène, les monts de Tlemcen et la zone steppique. La Wilaya de Tlemcen a un climat méditerranéen, et repose sur l'opposition entre un hiver océanique où la Wilaya est ouverte aux dépressions maritimes et un été désertique qui provoque la remontée et le stationnement d'une chaleur persistante durant toute la saison.

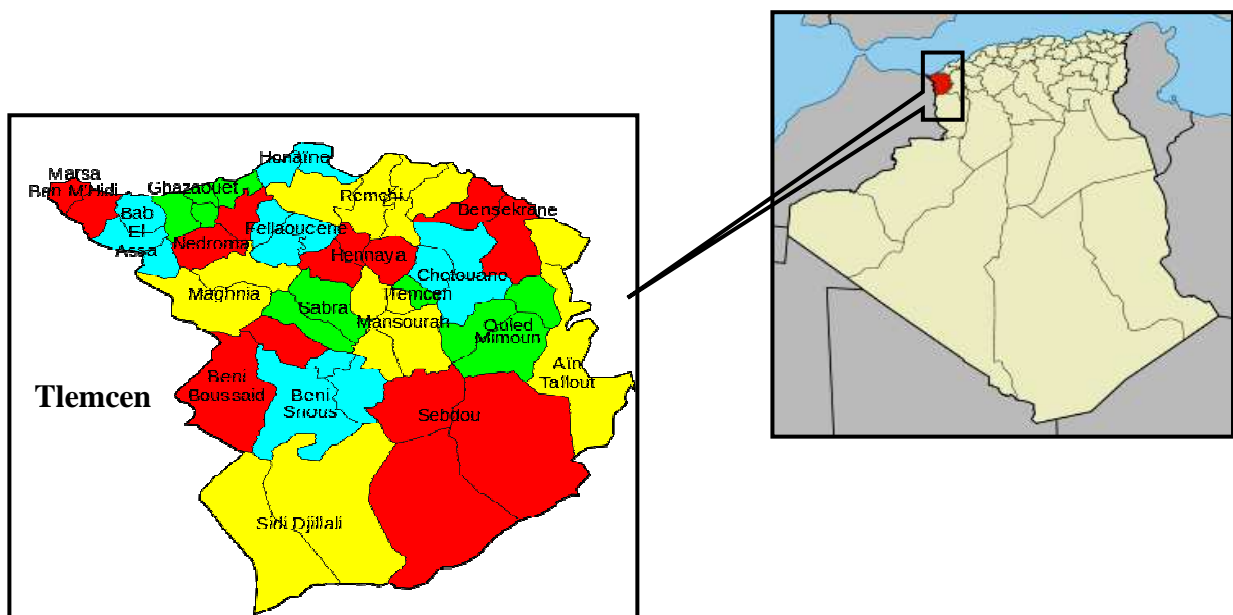


Figure N°4 : Situation géographique de la zone d'étude "Tlemcen".

2.1.2. Méthode d'étude

Les informations sont obtenues à travers des entrevues ethnobotaniques avec des personnes nées et/ou ayant vécu longtemps dans les wilayas de Béchar et de Tlemcen.

Pendant la première phase, nous avons procédé à une enquête exploratrice sans un questionnaire fermé préétabli afin de nous familiariser avec le terrain et le vocabulaire local. Pendant les réunions avec les habitants, nous avons essayé d'obtenir les informations générales sur nos plantes médicinales selon les interlocuteurs. Ensuite, nous avons invité les gens de la population locale à rassembler avec nous des échantillons des plantes et à nous renseigner sur leurs préparations et leurs indications.

La deuxième phase s'est basée sur une fiche d'enquête ethnobotanique soumise aux enquêtés au cours d'entretiens individuels. Le formulaire du questionnaire de l'enquête (**Annexe 1**) se divise en trois parties permettant de récolter des informations portant sur l'informateur, sur les plantes étudiées et sur leurs utilisations traditionnelles par cette population (**tableau N°2**).

Tableau N°2 : Questionnaire portant sur le malade, la plante étudiée et son utilisation par la population.

Informateur	Matériel végétal	Utilisation traditionnelle
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Age ▪ Profession ▪ Situation familiale ▪ Sexe ▪ Niveau académique ▪ Localité 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nom vernaculaire ▪ Nom scientifique ▪ Type de plante ▪ Usage de la plante ▪ Technique de la récolte ▪ Moment de la récolte (saison) ▪ Partie utilisée ▪ Forme d'emploi ▪ Mode de préparation ▪ Mode d'administration ▪ Méthode de conservation 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Type de maladie ▪ Résultats ▪ Toxicité ▪ Précaution d'emploi

Ce travail a duré plus de 5 mois pendant lesquels nous avons réalisé 200 entretiens avec autant de personnes différentes âgées de 18 à plus de 50 ans, réparties en 112 femmes et 88 hommes. Le temps consacré à chaque entrevue est d'environ un quart d'heure. Lors de chaque entretien, nous avons collecté toute l'information sur l'enquête et sur les plantes médicinales.

L'identification taxonomique des espèces est réalisée ultérieurement à l'aide de la littérature [(Quézel et Santa (1962-1963) ; (González-Tejero et coll., 2008) et (Moali et coll., 2011)].

2.2. Analyses phytochimiques

2.2.1. Screening phytochimique

a. Préparation des extraits végétaux

Les parties aériennes et les racines d'*Echium vulgare* et de *Fredolia aretioides* sont soumises aux tests phytochimiques. Au cours de ces tests, trois solvants de polarités différentes (eau, éthanol, éther diéthylique) sont utilisés pour l'extraction des différentes familles de composés chimiques. Chaque mélange est porté à chaud sous reflux et sous agitation continue pendant 30 min. Le mélange est ensuite filtré et les trois extraits sont soumis aux différents tests.

b. Tests phytochimiques

Nous avons caractérisé la présence des métabolites secondaires (saponosides, alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, coumarines, composés réducteurs et autres) en se référant aux techniques décrites par Bruneton (1999), Karumi et coll., (2004) et Oloyede (2005).

-Alcaloïdes : Ils sont caractérisés à partir des réactifs de Mayer et Wagner. 6 mL de chaque extrait sont évaporés à sec, le résidu est repris par 5 mL d'HCl 2N. Dans deux tubes à essai contenant 1mL du filtrat, nous avons ajouté 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner dans le second. L'apparition d'un précipité ou une turbidité indique la présence d'alcaloïdes.

-Polyphénols :

Tanins : 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 bleu-verte indique la présence des tanins.

-L'apparition d'une coloration verte foncée indique la présence des tanins catéchiques.

-L'apparition de la coloration bleu-verte indique la présence des tanins galliques.

Anthocyanes : A 1mL de l'infusé, nous avons ajouté 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% puis de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 25%. Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée en milieu basique, cela permet de conclure la présence des anthocyanes.

Flavonoïdes : Ils sont recherchés par la réaction à la cyanidine. 2 mL de chaque extrait sont évaporés et le résidu est repris dans 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué 2N. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose-orangé ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique va intensifier cette coloration qui va confirmer la présence de flavonoïdes.

Leucoanthocyanes : Nous avons effectué la réaction à la cyanidine sans ajouter les copeaux de magnésium et chauffé au bain-marie pendant 15 min. En présence des leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée.

Coumarines : 5 mL des trois extraits sont évaporés à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans l'eau chaude. Un volume de cette phase aqueuse est additionné d'une solution d'ammoniaque (NH_4OH) à 10% et un autre volume est gardé comme témoin. L'apparition de fluorescence après observation sous UV indique la présence de coumarines.

Quinones : Les substances quinoniques sont recherchées par le réactif de Bornstraëgen. 2 mL de chacun des trois extraits sont évaporés à sec. Le résidu est trituré dans 5 mL d'acide chlorhydrique 37% au 1/5. Le triturât est versé dans un tube à essai et porté ensuite au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 20 mL de chloroforme. L'ammoniaque diluée 2 fois (0,5 mL) est ajoutée à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violette confirme la présence de quinones.

-Stérols et triterpènes : Ils sont mis en évidence par la réaction de Liebermann. 5 mL des trois extraits sont évaporés. Les résidus sont dissous à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique ; 5 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés aux triturats. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.

- Saponosides : Pour rechercher les saponosides, nous avons versé, dans un tube à essai, 10 mL d'extrait. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos durant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

-Composés réducteurs : Leur détection consiste à traiter 1 mL de l'extrait avec 2 mL d'eau distillée et 2mL de liqueur de Fehling (1 mL de la liqueur de Fehling A + 1mL de la liqueur Fehling B) puis les tubes sont chauffés au bain marie à 40°C. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.

2.2.2. Quantification et caractérisation des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins par méthode spectrophotométrique

a. Préparation des extraits

L'extrait hydro-méthanolique (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.

b. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)

Nous avons utilisé le réactif de «Folin-Ciocalteu» ; c'est un mélange de complexes des acides phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdène ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue qui absorbe à 725 nm.

Le dosage de ces polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermeris et Nicholson (2006)**. 0,1 mL de l'échantillon est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% ; après agitation et incubation pendant 5 minutes, 100 μ L du réactif de Folin Ciocalteu à 1N sont additionnés. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la lecture des densités optiques est faite à 700 nm contre un blanc. 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 par pallier de 0,1.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique /g de matière végétale sèche et les teneurs en polyphénols totaux sont calculées selon la formule suivante :

$$\text{PPT} = a \times f/b$$

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

f : Facteur de dilution (x22).

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

c. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FVT)

Les flavonoïdes totaux 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 nous avons introduit successivement 500 μ L de l'extrait et 2 mL d'eau distillée. Au temps initial (0 minute), nous avons ajouté 150 μ L d'une solution de NaNO_2 (15%), après 6 minutes de repos, 150 μ L d' AlCl_3 (10 %) sont incorporés. 6 minutes après, 2 mL de NaOH à 4% sont ajoutés et le tout est complété à 5mL par l'eau distillée. La lecture est faite à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations finales de 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 et 0,8 mg/mL.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme de matière végétale sèche, selon la formule suivante :

$$\text{FVT} = a \times f / b$$

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

f : Facteur de dilution (x10).

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

d. Détermination de la teneur en tanins

- Extraction avec l'acétone/eau : A 0,5 g d'échantillon mélangé avec l'acétone/eau (70/30) à chaud sous reflux, pendant 2 x 20 minutes, nous avons ajouté du metabisulfite de sodium à 0,2 % à raison de 1 mL par 100 mL de mélange de solvant afin d'éviter les phénomènes d'oxydation dans l'extrait polyphénolique (Solution A) (**Merghem, 1995**). Chaque dosage est répété trois fois.

- Dosage des tanins condensés (Test de vanilline avec H₂SO₄) : Cette méthode de détermination du taux des tanins condensés est proposée par **Swain et Hillis (1959)**.

• Principe

Ce test est basé sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide. Il est spécifique des flavanes-3-ols (**Price et coll., 1978**) (**figure N°5**).

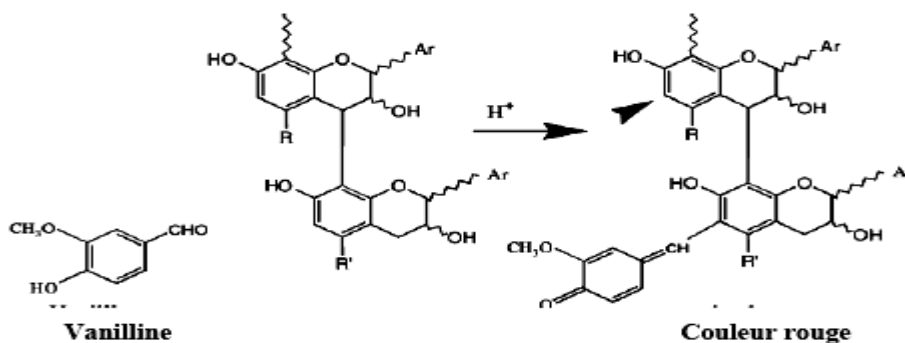


Figure N°5 : Réaction entre la vanilline et les tanins condensés (**Schofield et coll., 2001**).

- **Mode opératoire**

Solution B: [vanilline à 1 % dans 70 % d'acide sulfurique concentré].

Nous mélangeons à l'aide d'un vortex 2 mL de solution B et 1 mL de solution A.

Nous plaçons les tubes dans un bain marie pendant 15 min à 20°C et nous mesurons l'absorbance à 500 nm.

- **Expression des résultats**

$$T(\%) = 5,2 \times 10^{-2} \times \frac{DO \times V}{P}$$

$5,2 \times 10^{-2}$: Constante exprimé en équivalents de cyanidines.

DO : Densité Optique.

V : Volume de l'extrait utilisé.

P : Poids de l'échantillon.

- Dosage des tanins hydrolysables :

- **Principe**

La méthode est basée sur une réaction avec le chlorure ferrique. Le mélange de l'extrait tannique avec le réactif (FeCl_3) provoque la coloration rouge violette du complexe d'où la formation des ions (Fe^{3+}) (**Mole et Waterman (1987)**).

- **Mode opératoire**

Nous avons préparé le réactif C (FeCl_3 à 0,01M dans du HCl à 0,001M) puis nous avons mélangé dans des tubes 1 mL de solution A et 3,5 mL de réactif C.

L'absorbance est mesurée à 660 nm, 15 secondes après l'addition du réactif C.

- **Expression des résultats**

$$T\% = \frac{DO \times M \times V}{\zeta_{mole} \times P}$$

DO : Densité Optique.

ζ : 2169 de l'acide gallique.

M : 300.

V : Volume de l'extrait utilisé.

P : Poids de l'échantillon.

2.3. Préparation des extraits végétaux

2.3.1. Préparation des extraits bruts d'*Echium vulgare* et de *Fredolia aretioides*

L'extrait aqueux et l'extrait hydrométhanolique (70%), sont préparés par dissolution de 1 g de la matière végétale dans 10 mL de solvant. Après 5 minutes de chauffage, une macération de 24 h sous agitation continue à température ambiante est réalisée, puis le mélange est filtré. L'opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant toutes les 24 heures. Les trois fractions filtrées sont regroupées et évaporées à sec (**Upson et coll., 2000**).

2.3.2. Extraction sélective des flavonoïdes des deux parties d'*Echium vulgare* (Fraction acétate d'éthyle et n-butanol)

Les résidus secs des deux parties de la plante obtenus par la même procédure d'extraction de l'extrait méthanolique 70% sont traités à l'eau bouillante pour dissoudre les flavonoïdes. La phase aqueuse est filtrée et extraite dans un premier temps deux (02) fois par l'acétate d'éthyle (v/v) dans une ampoule à décanter. Nous récupérons ainsi la phase acétate d'éthyle, qui va être évaporée à sec (extrait acétate d'éthyle). La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est traitée deux (02) fois avec le n-butanol et nous récupérons ainsi la phase n-butanol qui est évaporée à sec (extrait n-butanol) (**figure N°6**).

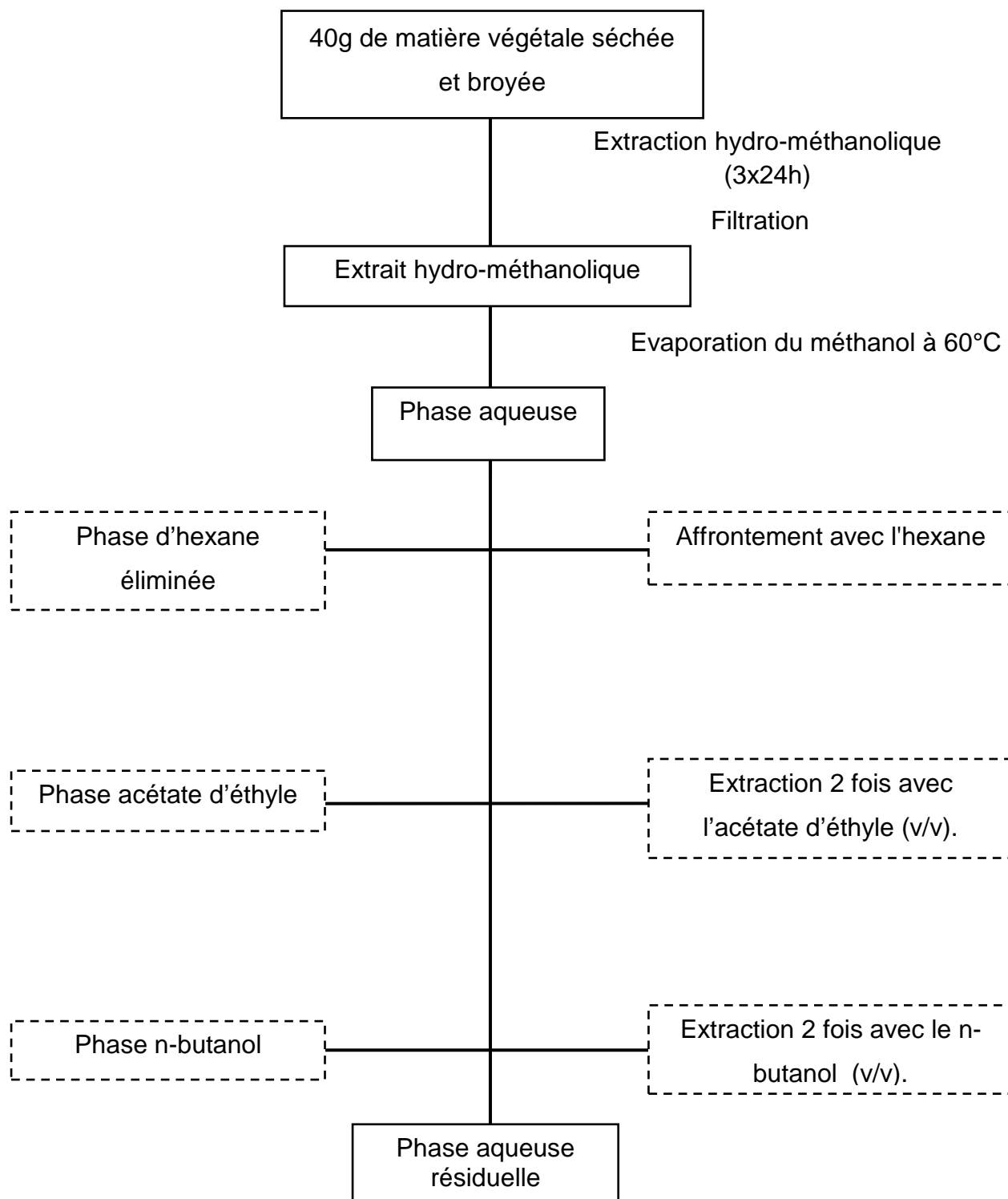


Figure N°6 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.

2.3.3. Extraction des tanins des deux parties de *Fredolia aretioides*

L'extraction des tanins des feuilles, des tiges et des racines de *Fredolia aretioides*, est réalisée selon la méthode de **Zhang et coll., 2008**. Les broyats de la matière végétale (2,5 g) sont extraits par 50 mL du mélange acétone/eau (35/15 : v/v) durant trois jours à température ambiante. La solution obtenue est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type bouché R-200 pour éliminer l'acétone, puis 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 3 phases obtenues sont réunies. La phase aqueuse restante est traitée trois fois par le n-butanol. Les phases acétate d'éthyle et n-butanol sont évaporées à sec, afin de récupérer des extraits sous forme de poudre (**figure N°7**).

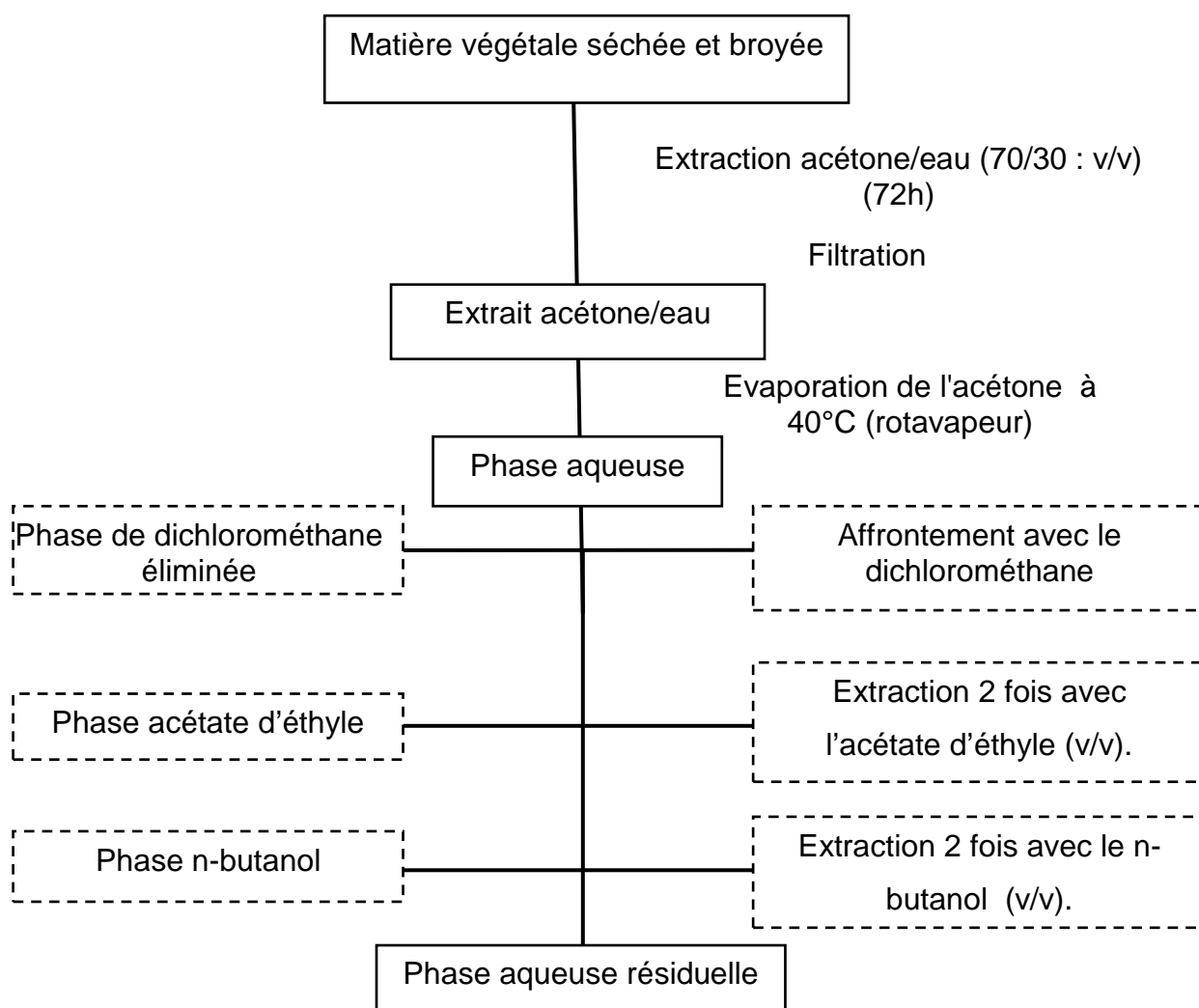


Figure N°7: Schéma d'extraction des tanins des parties aériennes et des racines de *Fredolia aretioides* (Zhang et coll., 2008).

2.3.4. Rendements des extraits secs

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec en calculant le rapport entre le poids de l'extrait sec (poudre) en gramme et le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme selon l'équation suivante:

$$\text{rendement} \quad \% = \frac{m_0}{m_1} \times 100$$

m_0 : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé ;
 m_1 : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

2.4. Analyses biologiques

2.4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits

L'activité antibactérienne des extraits des deux plantes est évaluée par deux méthodes de référence:

- La technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques);
- La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Il faut noter que le DMSO dans lequel sont solubilisés les extraits ne présente aucune toxicité vis-à-vis des bactéries testées.

a. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques) (EUCAST, 2003)

L'obtention de l'inoculum final s'effectue de la manière suivante :

Chaque culture bactérienne est ensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique.

Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre «SPECORD 200 PLUS» à une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,1 l'équivalent de 10^8 UFC/mL.

L'inoculum ainsi préparé est dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau physiologique. La densité optique finale obtenue de l'inoculum doit être équivalente à 10^6 UFC/mL. Les boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton gélosé sont ensemencées par

inondation (**EUCAST, 2003**). Des disques de 6 mm de diamètre préparés en extemporané sont stérilisés par autoclavage, puis imprégnés des extraits à tester dissous dans le DMSO (20µL pour chaque disque). Les disques sont placés aseptiquement sur la gélose préalablement inoculée. Les disques témoins sont imprégnés par 20 µL de DMSO. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques. L'absence de croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque, dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre (**Joffin et Leyral, 2006**).

b. Méthode de la microdilution en milieu liquide

La microplaque à 96 puits permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits végétaux. Dans les puits des colonnes 1 à 12, nous introduisons à 100µL de bouillon Muller Hinton (MHB), puis nous ajoutons 100µL de l'extrait végétal dans le 2^{ème} puits (qui servira de témoin négatif) et 100µL dans le 3^{ème} puits, ensuite, nous procédons à des dilutions de 100µL de puits à puits à partir du 3^{ème} puits, à l'aide d'une micropipette. Le facteur de ½ est pris en considération dans le calcul des concentrations des produits à tester. Ensuite, nous additionnons 100µL de l'inoculum (10⁶UFC/mL) dans les 96 puits sauf ceux de la colonne 2 (témoin négatif), le puits 1 servira de témoin positif (100µL du bouillon et 100µL de l'inoculum). La microplaque est couverte et incubée à 37°C de 18 à 20 heures. La lecture est effectuée 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. Nous avons utilisé comme antibiotique de référence la gentamycine (**EUCAST, 2003**).

2.4.2. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures

L'évaluation de l'activité des extraits vis-à-vis des levures est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide recommandée par CLSI (**Espinel-Ingroff, 2007**).

Nous avons utilisé le milieu Mueller Hinton additionné de 2% de glucose et de 0,5 µg/mL de bleu de méthylène. L'inoculum équivalent au 0,5 McFarland est préparé selon les mêmes étapes que celles décrites pour les bactéries sauf que l'absorbance est de l'ordre de 0,12 à 0,15 à une longueur d'onde de 530 nm équivalent à 1-5 10⁶ UFC/mL. L'ensemencement est effectué par inondation.

Les disques immergés par les produits à tester sont déposés après séchage de la boîte. Ces dernières sont incubées à 35°C pendant 24h. La lecture est réalisée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

L'étude de la CMI des levures est réalisée de la même manière que celles des bactéries, sauf que le milieu de culture utilisé est le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640. L'inoculum est ajusté à une absorbance de l'ordre de 0,12 à 0,15 lue à 530 nm.

2.4.3. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des moisissures

L'évaluation de l'activité des extraits vis-à-vis des moisissures est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide recommandée par **CLSI (2009)**.

L'étude de la diffusion sur milieu gélosé est réalisée de la même manière que celle des levures, sauf que l'inoculum équivalent à 0,5 McFarland est préparé à partir d'une conidie ou la suspension de sporangiospore obtenue à partir des cultures de sept jours développées sur l'agar de dextrose de pomme de terre à 35°C. Les conidies sont récupérées en mouillant une boucle avec du Tween 20 et en la transférant dans 3 mL d'eau physiologique stérile.

La DO est de 0,08 à 0,10 à 625 nm, ce qui correspond à un inoculum équivalent à 0,4-5 10⁶ conidies/mL.

L'évaluation de la CMI est effectuée de la même façon que celle des levures (**Espinel-Ingroff et coll., 2007**).

2.4.4. Evaluation de l'activité antioxydante

a. Réduction du fer : FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

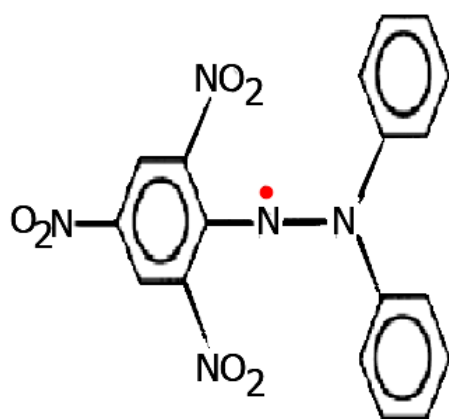
Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ en ferrocyanure de potassium (Fe²⁺) (**Oyaizu, 1986**).

Le protocole expérimental suivi est celui de **Karagözler et coll., 2008**. 1mL de l'extrait à différentes concentrations diluées dans l'eau distillée est mélangé avec 2,5 mL d'une solution de tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%, puis nous plaçons les tubes dans un bain-marie à 50°C pendant 20 minutes. Après refroidissement à température

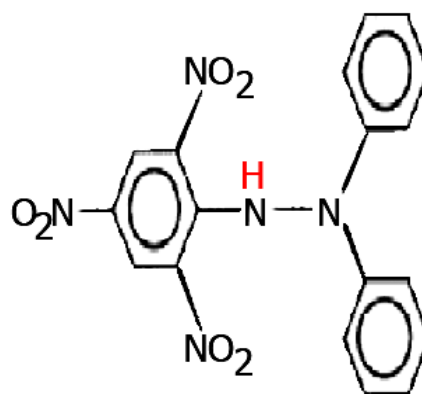
ambiante, 2,5mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Nous prélevons 2,5mL des surnageants auxquels nous ajoutons 2,5mL d'eau distillée. Nous additionnons ensuite au mélange 500 μ L d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) à 0,1% fraîchement préparée. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions expérimentales.

b. Test de piégeage du radical libre DPPH \cdot (2,2-diphényl 1-1-picrylhydrazyl)

Le 2,2-Diphényl-1-1picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 514-518 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH \cdot est réduit et change de couleur en virant au jaune (**figure N°8**).



DiPhenyle1PicrylHydrazyle
(radical libre)



DiPhenyle1PicrylHydrazyle
(radical réduit)

Figure N°8 : Forme libre et réduite du 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Molyneux, 2004).

Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH.

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno et coll., 1998**. Un volume de 50 µL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,95 mL de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/L) fraîchement préparée. Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 50 µL de méthanol avec 1,95 mL d'une solution méthanolique de DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc pour chaque concentration qui contient 50 µL de l'extrait et 1,95 mL de méthanol.

Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante :

$$\boxed{[(A1 - A2) / A1] \times 100}$$

A1 : représente l'absorbance du contrôle sans extrait.

A2 : représente l'absorbance après l'addition de l'extrait.

- **Calcul des concentrations inhibitrices à 50% " IC₅₀ "**

La concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions en utilisant le logiciel Sigma-plot [(Bertoncelj et coll., 2007) ; (Marxen et coll., 2007) ; (Fabri et coll., 2009) ; (Scherer et Godoy, 2009)].

2.5. Propriétés de conservation du produit cosmétique par les extraits de *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare*

2.5.1. Réalisation d'un shampoing

La mise au point d'un shampoing résulte d'un judicieux équilibre entre la base lavante, formée de l'association de plusieurs tensioactifs, qui constitue le cœur de la formule, et tous les autres composants (stabilisateurs de mousse, épaississants, nacrants et opacifiants, correcteurs de pH, conservateurs, additifs) qui lui confèrent ses qualités physiques et cosmétiques et peuvent, selon les besoins, en modifier les performances (**tableau N°3**).

Tableau N°3 : Formulation de base d'un shampoing

Ingrédients	Quantité (%)	Fonction
Laurylsulfate d'ammonium,	10–20	nettoyant primaire (tensioactif)
Lauramide diéthanolamine (DEA)	3–5	Stabilisateur de mousse
Chlorure de sodium	0,5–1,5	épaississant
Disodium EDTA ou extrait végétal	0,3 à 1%	conservateur
Eau	Ad 100	diluant

Ad 100 veut dire amener la solution à 100 %

La fabrication se fait en quatre étapes :

Nous avons stérilisé dans un premier temps tous les ustensiles utilisés lors de la manipulation puis nous avons pesé nos tensioactifs détergents et moussants et nous les avons mis dans un récipient (Phase 01).

Dans un deuxième temps, nous avons pesé et mélangé l'eau et l'agent épaississant. Le mélange est placé au bain-marie à 40°C. Nous agitons doucement jusqu'à dissolution totale du NaCl (Phase 02).

Nous avons dans un troisième temps versé petit à petit la phase 02 dans la phase 01 en agitant lentement entre chaque ajout pour obtenir un mélange homogène.

Dès lors que la préparation contient de l'eau, le conservateur devient indispensable. Ici nous avons utilisé l'extrait de l'une des deux plantes *Echium vulgare* et *Fredolia aretioides* (1^{ère} formulation), le conservateur EDTA 2mM (2^{ème} formulation) et les deux en même temps (3^{ème} formulation). Le pH de cette préparation est d'environ 4,5-6.

2.5.2. Propriétés de conservation des extraits

a. Choix des microorganismes

Les procédés de conservation des produits cosmétiques sont variables, seule l'utilisation de différents types de micro-organismes est déterminée. Les essais ISO 11930, la Ph. Eur (European Pharmacopeia), l'USP (United States Pharmacopeia) et l'ASEAN (Association of Southeast Asian Nations) n'utilisent que des micro-organismes pathogènes, qui diffèrent partiellement des recommandations du SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) qui utilisent des germes spécifiques supplémentaires connus pour induire une détérioration des produits cosmétiques (tableau N°4) (Wolfgang et Mayer, 2012).

Tableau N°4: Liste des microorganismes utilisés par l'ISO 11930, les recommandations du comité scientifique de la sûreté du consommateur (SCCS), le Schülke Koko, la pharmacopée européenne, la pharmacopée des états unis et l'association des nations sud-est asiatique.

ISO 11930	SCCS	schülke KoKo Test	Ph. Eur. 7	USP 35	ASEAN
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 (CIP 82.118; NCIMB 8626; NBR 13275; KCTC 2513)</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (CIP 4.83; NCIMB 9518; NRBC 13276; KTC 3881; NCTC 10788)</p> <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (CIP 53.126; NCIMB 8545; NBRC 3972; KCTC 2571; NCTC 12923)</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (IP 48.72; NCPF 3179; NBRC 1594; KCTC 7965)</p> <p><i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 (IP 1431; IMI 149007; NBRC 9455; KCTC 6196)</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> of an official reference stock in the EU</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> of an official reference stock in the EU</p> <p><i>Candida albicans</i> of an official reference stock in the EU</p> <p>specific germs which are known to lead to spoilage of cosmetic products</p>	<p><i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028</p> <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 11229</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027</p> <p><i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 17397</p> <p><i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633</p> <p><i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231</p> <p><i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404</p> <p><i>Penicillium pinophilum</i> ATCC 36839</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027; NCIMB 8626; CIP 82.118</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538; NCTC 10788; NCIMB 9518; CIP 4.83</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231; NCPF 3179; IP 48.72.</p> <p><i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404; IMI 149007; IP 1431.83</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027</p> <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 11229</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231</p> <p><i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027; CIP82.118; or equivalent</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (NCIMB 9518; CIP 4.83; NCTC 10788)</p> <p><i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048</p> <p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (NCPF 3179; IP 48.72)</p> <p><i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 (IMI 149007; IP 1431.83)</p>

b. Culture des micro-organismes d'essai selon les normes de la Pharmacopée européenne

L'ensemble de la procédure de la préparation de l'inoculum est effectuée selon les normes proposées dans le dernier projet de la commission de la **Pharmacopée européenne (EP), 2005**.

Les boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive sontensemencées sur la surface par des bactéries puis incubées à 30-35°C pendant 18-24h. La culture des levures et des champignons est réalisée sur de la gélose Sabouraud dextrose sans addition d'antibiotiques. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 20-25°C pendant 48 h pour les levures et 1 semaine pour les champignons.

c. Préparation de l'inoculum

Des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive ou Sabouraud sontensemencées par stries. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, des colonies sont transférées dans un tube contenant 10mL d'eau physiologique stérile.

L'inoculum est préparé en extemporané selon la pharmacopée européenne. Il est ajusté à 10^8 microorganismes/mL par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm pour les bactéries et les champignons et à 530 nm pour les levures.

d. Inoculation des échantillons

Le nombre de microorganismes utilisé et la quantité de l'inoculum, sont regroupés dans le **tableau N°5**. La concentration cellulaire de départ est fixée à 10^6 UFC/mL pour tous les tests.

Tableau N°5: Nombre de microorganismes et quantité d'inoculum, utilisés dans le challenge test.

	Echantillon cosmétique	Quantité d'inoculum	Quantité de germes dans l'inoculum	Quantité de germes dans le produit cosmétique
ISO 11930	20g ou 20mL	1%	10 ⁷ -10 ⁸ UFC/mL bactéries 10 ⁶ -10 ⁷ UFC/mL levures	- 10 ⁵ -10 ⁶ UFC/mL bactéries - 10 ⁴ -10 ⁵ UFC/mL levures
Schulke Koko test	25g	0,4% de chaque inoculum (2,4% pour 6 inoculations)	10 ⁷ -10 ⁸ UFC/mL bactéries 10 ⁶ -10 ⁷ UFC/mL levures	- 4x10 ⁴ -4x10 ⁵ UFC/mL bactéries par inoculation - 2,4x10 ⁵ -2,4x10 ⁶ UFC/mL de bactéries pour 6 inoculations - 2,4x10 ⁴ -2,4x10 ⁵ UFC/mL de levures pour 6 inoculations
Ph Eur. 7	20g	≤1%	~10 ⁸ UFC/mL	- 10 ⁵ -10 ⁶ UFC/mL
USP 35	Flacon original	0,5-1,0%	~10 ⁸ UFC/mL	- 10 ⁶ UFC/mL
ASEAN	100g	1%	~10 ⁸ UFC/mL bactéries ~10 ⁷ UFC/mL levures et champignons	~10 ⁶ UFC/mL bactéries ~10 ⁵ UFC/mL levures et champignons
CTFA/M-3	Produit final	≤1%	~10 ⁸ UFC/mL bactéries ~10 ⁷ UFC/mL levures et champignons	~10 ⁶ UFC/mL bactéries ~10 ⁵ UFC/mL levures et champignons

Le test de contrôle de la qualité microbiologique est réalisé selon les normes proposées dans le dernier projet de la commission de Pharmacopée Européenne (**EP**) (**2005**) concernant les préparations topiques. Le test de provocation d'une contamination "test challenge", est réalisé sur les trois formulations suivantes : shampoing + 1,0 % d'extrait + EDTA, shampoing+EDTA et shampoing+extrait. Ces formulations (échantillons de 20 mL) sont placées dans des récipients stériles et inoculées séparément avec des suspensions bactériennes et fongiques pour donner un niveau final d'environ 10^6 UFC/g. Les préparations sont bien mélangées pour assurer une distribution homogène des micro-organismes et incubées de 20 à 25°C. La viabilité des cellules inoculées, et leur capacité à croître sont évaluées par rapport à un contrôle de croissance qui est le shampoing sans aucun conservateur. Après un temps de contact de 0, 2, 7, 14 et 28 jours, des échantillons (1mL ou 1g) sont prélevés et comptés selon le procédé décrit ci-dessous:

Dans des tubes à essai stériles, nous mélangeons 1mL de l'échantillon avec de l'eau physiologique selon le facteur de dilution désiré (**figure N°9**). L'eau physiologique est un milieu minimum tamponnée qui contient des sels minéraux, mais pas de source de carbone. Les bactéries et les levures ne se développent pas dans ce milieu, mais restent dans un état de stase jusqu'à ce que les cellules diluées soient étalées sur des milieux contenant une source de carbone. L'opération est répétée trois fois pour chaque dilution.

Pour calculer le nombre de levures ou de bactéries par mL de l'échantillon dilué, nous avons utilisé l'équation suivante:

$$\frac{\text{Nombre d'UFC}}{\text{Volume prélevé (mL) x facteur de dilution}} \longrightarrow \text{Nombre d'UFC/mL}$$

La "Capacité conservateur (PC) " d'un produit est définie comme étant sa capacité ou sa puissance à maintenir les niveaux de contaminants microbiens faibles et acceptables lorsqu'il est inoculé par une charge microbienne fraîche. Les limites spécifiées ne doivent pas dépassées 10^3 pour les bactéries et 10^2 pour les levures par g ou mL du produit (**Pharmacopée Européenne, 2005**).

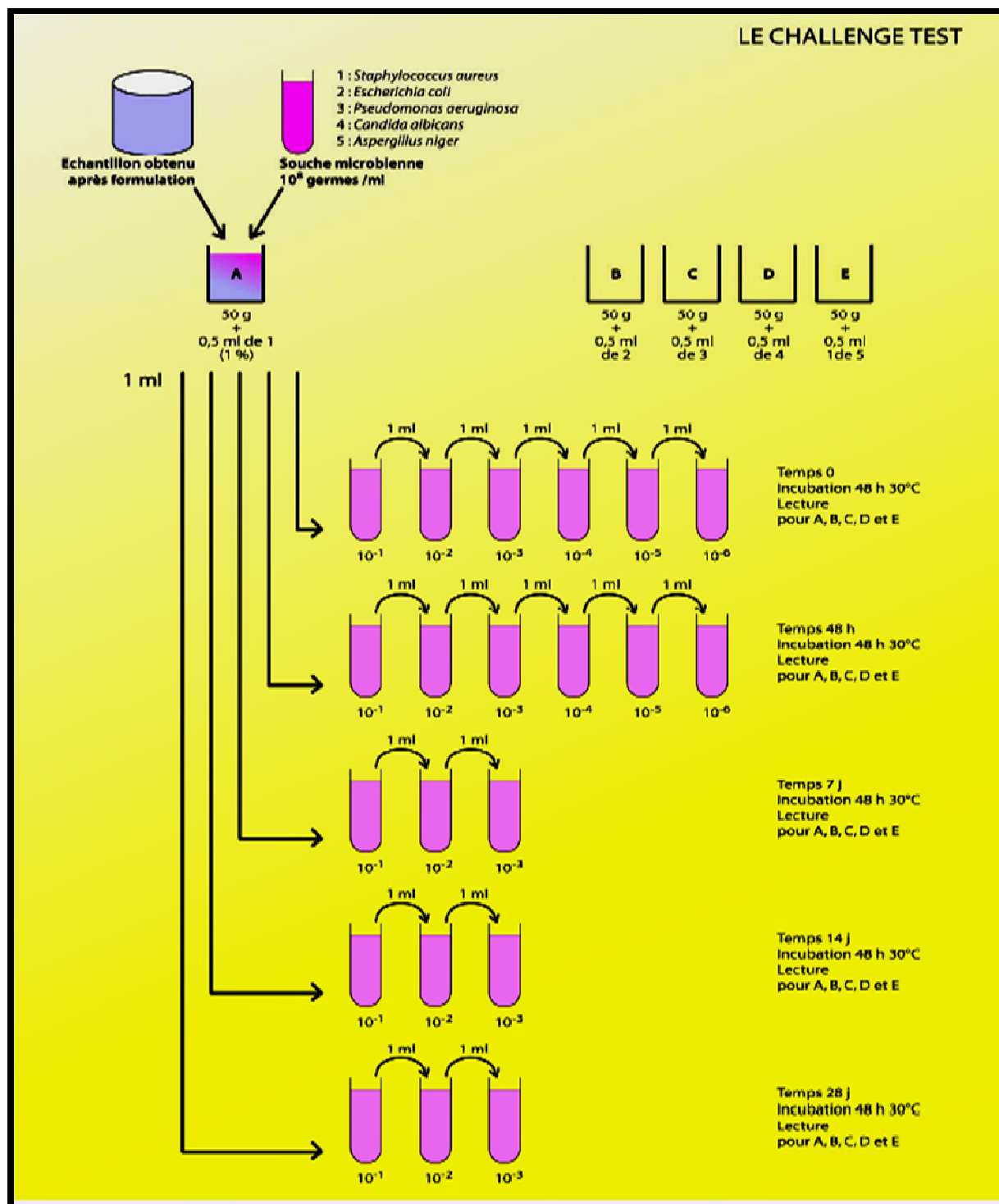


Figure N°9 : Protocole expérimental du test de challenge

2.6. Evaluation de l'activité hémolytique des extraits des plantes étudiées vis-à-vis des globules rouges humains

2.6.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec du tampon phosphate salé de sodium (PBS) 10 mM, pH 7,4 contenant 150 mM de NaCl, puis suspendu à nouveau dans ce même tampon.

2.6.2. Mesure de la fuite de l'hémoglobine

Les globules rouges humains sont suspendus dans le tampon PBS pH 7,4 10 mM, à raison de 4000 cellules/mL (0,5 mL sont mis en contact avec 9,5 mL de tampon phosphate salé de sodium (PBS) 10 mM, pH 7,4).

La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 90 minutes. Dès l'addition de l'extrait qui correspond au temps zéro de la réaction, des prélèvements de 500 µL à partir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalle régulier, auxquels nous avons ajouté 2 mL d'une solution de lavage glacée (NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM).

Après centrifugation à 4000 tours/minute pendant 5 minutes, nous avons récupéré le surnageant sur lequel nous avons dosé la fuite l'hémoglobine par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 548nm (**Spectronic GenesysTM 2PC**).

L'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges dans le tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant du Triton X-100 à une concentration de 10 % (v/v). Le tampon seul est utilisé comme contrôle négatif.

Le taux d'hémolyse est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = 100 \frac{\text{DO en présence de Triton X-100} - \text{DO en présence d'extrait}}{\text{DO en présence de Triton X-100}}$$

(Murphy *et coll.*, 1995).

Troisième partie
Résultats et interprétation

Notre travail consiste à effectuer une étude phytochimique et évaluer quelques activités biologiques de deux plantes de l'ouest Algérien (*Echium vulgare* et *Fredolia aretioides*).

1. Etude ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique est un travail de terrain qui consiste à aller à la rencontre des praticiens traditionnels pour s'enquérir de leur méthode de traitement des maladies. Cette enquête est indispensable dans la mesure où elle nous permet de nous orienter afin de sélectionner les plantes à étudier et de cibler certains tests biologiques.

Dans cette optique, un certain nombre de critères ont été pris en compte pour sélectionner les plantes de cette étude et qui portent sur les aspects suivants :

- usages de chaque espèce végétale selon les classes d'âge, le sexe et le niveau de scolarisation;
- usages attribués à chaque espèce végétale ;
- parties utilisées de chaque espèce végétale ;
- modes de préparation les plus communément mentionnés ;

1.1. Classes d'âge

Le traitement des données nous a permis d'obtenir les données représentées dans le **tableau N°6** et qui montrent qu'à l'échelle des wilayas de Bechar et de Tlemcen, les personnes d'âge supérieur à 65 ans ont une fréquence d'utilisation des plantes médicinales de 25 % et de 33% respectivement, alors qu'elle est de 7% à Béchar et 1% à Tlemcen pour les personnes de moins de 25 ans.

La connaissance des usages des plantes médicinales et leurs propriétés, est généralement acquise suite à une longue expérience accumulée et transmise d'une génération à l'autre. La transmission de cette connaissance est en danger actuellement parce qu'elle n'est pas toujours assurée (**Anyinam, 1995**). Les résultats obtenus montrent que les personnes les plus âgées ont plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges. L'expérience accumulée avec l'âge constitue la principale source d'information à l'échelle locale au sujet de l'usage des plantes en médecine traditionnelle.

Nous remarquons une perte d'information sur les plantes médicinales, ce qui s'explique aussi bien par la réduction des ressources végétales de la région que par la méfiance de certaines personnes, particulièrement les jeunes, qui ont tendance à ne plus trop croire en cette médecine traditionnelle.

1.2. Sexe d'appartenance

Dans les deux régions étudiées, les hommes et les femmes sont concernés par la phytothérapie. Cependant, les femmes ont un peu plus de connaissances sur les espèces médicinales par rapport aux hommes (56% contre 44% à Béchar et 58% contre 42% à Tlemcen) (**tableau N°7**). Ces résultats confirment les travaux ethnobotaniques réalisés à l'échelle nationale par **Azzi et ses collaborateurs (2012)**, qui ont montré que les femmes sont plus détentrices du savoir phytothérapeutique traditionnel que les hommes.

Sur le terrain d'enquête, si les femmes et les hommes se chargent équitablement de la collecte des plantes médicinales, le séchage, le stockage et la préparation des recettes pour les soins des membres de la famille, sont effectués par les femmes. L'homme se réserve la tâche de la collecte des plantes dans les zones réputées dangereuses.

1.3. Niveau de scolarisation

Dans les zones d'étude, une bonne partie des usagers de ces deux plantes médicinales sont analphabètes, avec un pourcentage de 42 % pour les usagers d'*Echium vulgare* et 49% pour ceux de *Fredolia aretioides* (**tableau N° 8**).

Ce pourcentage relativement élevé est en corrélation directe avec le niveau d'études de la population locale utilisatrice des plantes. Néanmoins, les personnes ayant le niveau de l'école primaire ont un pourcentage d'utilisation des plantes médicinales non négligeable, alors que celles ayant un niveau d'études secondaires et universitaires, utilisent très peu les plantes médicinales.

Tableau N°6 : Répartition de la fréquence d'utilisation de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare* par classe d'âge.

Plantes	Classe d'âge (%)					
	<25 ans	25-34 ans	35-44 ans	45-54 ans	55 -64 ans	> 65 ans
<i>Fredolia aretioides</i>	7	9	18	19	22	25
<i>Echium vulgare</i>	1	9	12	20	25	33

Tableau N°7 : Répartition de la fréquence d'utilisation de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare* par sexe.

Plantes	Sexe d'appartenance (%)	
	Hommes	Femmes
<i>Fredolia aretioides</i>	44	56
<i>Echium vulgare</i>	42	58

Tableau N°8 : Répartition de la fréquence d'utilisation de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare* selon le niveau d'études.

Plantes	Niveau d'études (%)			
	Analphabète	Primaire	Secondaire	Universitaire
<i>Fredolia aretioides</i>	49	26	18	7
<i>Echium vulgare</i>	42	27	21	10

1.4. Domaines d'indication thérapeutique

L'enquête ethnobotanique a révélé que la plante *Fredolia aretioides* est utilisée principalement contre les maladies de l'appareil digestif, avec un pourcentage de 38%, comme antidote au poison (29%), antirhumatismal (20%), Hypoglycémiant (10%) et pour faciliter l'accouchement (2%). Le reste des maladies (appareil urinaire et génital) est représenté par moins de 1 % (**figure N°10**).

La deuxième espèce étudiée à savoir *Echium vulgare* des prairies de Remchi, est utilisée pour le traitement de plusieurs maladies dont les rhumes et fièvres (34%), les maux de tête (23%), la promotion de la cicatrisation des plaies et le traitement de la peau (22%), la rétention d'eau (10%) , l'inflammation (7%) et contre la douleur (3%) (**figure N°11**).

1.5. Parties utilisées

Dans la région de Tlemcen, les feuilles d'*Echium vulgare* sont les parties les plus utilisées avec un pourcentage de 35 %, les fleurs (26%), viennent ensuite les tiges plus les feuilles (21%) et les parties souterraines (18%) (**tableau N°9**).

En ce qui concerne la plante *Fredolia aretioides*, les feuilles sont très utilisées par la population de Bechar (39%), suivies des tiges plus feuilles (36%) et des racines (25%).

Bien que les résultats consignés dans **le tableau N°9** montrent que l'utilisation des feuilles en plus des tiges et des racines, est représentée par un pourcentage de 75%, nous avons remarqué que sur le terrain les utilisateurs ont tendance à arracher la plante entière au lieu de s'intéresser uniquement à la partie souhaitée (principalement les feuilles). Sachant qu'il existe une relation manifeste entre la partie utilisée de la plante exploitée et les effets de cette exploitation sur son existence, ce mode de cueillette compromet sérieusement la durabilité des espèces médicinales.

1.6. Mode de préparation

L'infusion constitue le mode de préparation le plus fréquent (47 %) pour *Echium vulgare*. Elle est suivie par la préparation en décoction (25 %) et en poudre (15%). Les autres modes (jus, cataplasme, macération, teinture, fumigation et autres) représentent 13%. Par ailleurs, *Fredolia aretioides* est utilisée soit sous forme de décoction (52%) et d'infusion (38%) soit sous forme de poudre (10%) (**tableau N°10**).

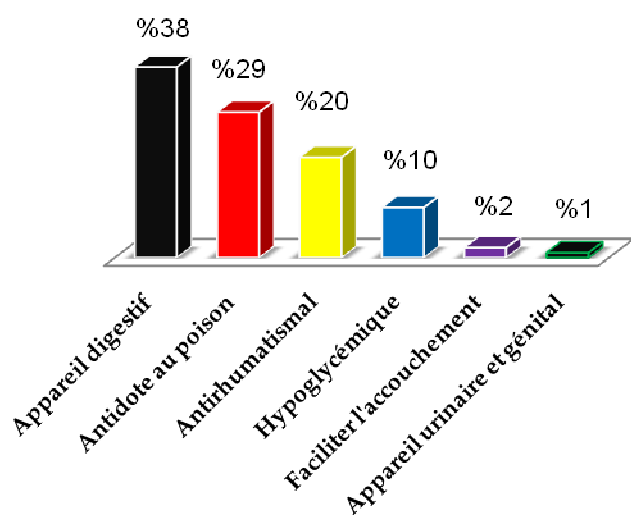


Figure N°10 : Répartition des différentes utilisations de *Fredolia aretioides* dans la wilaya de Béchar

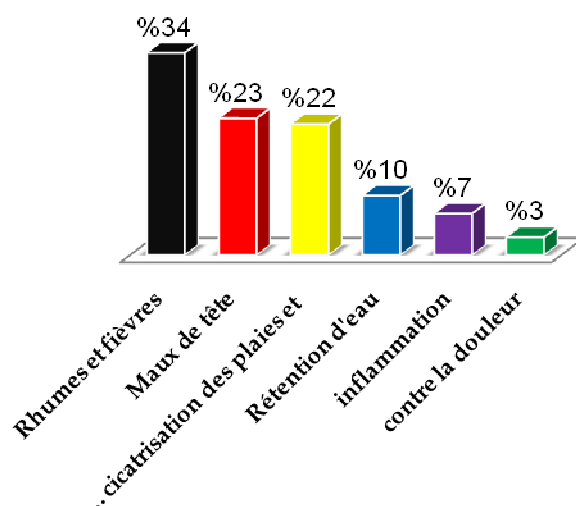


Figure N°11 : Répartition des différentes utilisations d'*Echium vulgare* dans la wilaya de Tlemcen.

Tableau N°9 : Répartition des différentes parties utilisées de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare*.

Plantes	Parties utilisées des plantes			
	Feuilles (%)	Tiges et feuilles (%)	Racines (%)	Fleurs (%)
<i>Fredolia aretioides</i>	39	36	25	/
<i>Echium vulgare</i>	35	21	18	26

Tableau N°10: Répartition des différents modes de préparation des plantes *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare*.

Plantes	Modes de préparation			
	Poudre (%)	Infusion (%)	Décoction (%)	Jus, cataplasme, macération, teinture et autres (%)
<i>Fredolia aretioides</i>	10	38	52	/
<i>Echium vulgare</i>	15	47	25	13

2. Analyses phytochimiques

2.1. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir des racines, des feuilles et des tiges des plantes *Echium vulgare* et *Fredolia aretioides*, en utilisant des solvants de polarités différentes et des réactifs spécifiques de révélation. Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de nos plantes. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

2.1.1. Tests phytochimiques des extraits de *Fredolia aretioides*

Les résultats de l'analyse phytochimique préliminaire des trois fractions d'extraits de *Fredolia aretioides* sont regroupés dans **le tableau N°11**.

Nous remarquons que dans l'extrait aqueux et éthanolique des deux parties de cette plante, la recherche des alcaloïdes et des tannins galliques s'est montrée positive. La présence de ces alcaloïdes est confirmée par une précipitation brune au contact avec le réactif de Wagner.

Les saponosides sont fortement présents dans l'extrait aqueux, et ceci dans les deux parties de la plante avec une formation de mousse dans les tubes dépassant les 3 cm de hauteur.

Les stérols et les triterpènes sont fortement présents dans l'extrait d'éther diéthylique. Ces composés, combinés avec les composés réducteurs, forment des glycosides. L'apparition d'une fluorescence sous une lumière UV indique la présence des coumarines uniquement dans les feuilles et les tiges de la plante mais à une faible intensité.

Les flavonoïdes sont présents uniquement dans l'extrait aqueux des racines. Nous remarquons aussi la présence des anthocyanes, des composés réducteurs et des quinones avec une faible intensité dans les deux parties de *Fredolia aretioides*. Une absence totale des leucoanthocyanes dans les trois solvants utilisés est enregistrée.

Tableau N°11 : Caractérisation des groupes chimiques dans les extraits des racines, des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides*

Groupes chimiques	Extrait aqueux		Extrait éthanolique		Extrait éther diéthylique	
	Feuilles et tiges	Racines	Feuilles et tiges	Racines	Feuilles et tiges	Racines
Alcaloïdes	+++	+++	+++	+++	-	+
Coumarines	++	-	++	-	++	-
Stérols et triterpènes	+	+	++	++	+++	+++
Tanins galliques	+++	+++	+++	+++	-	+
Anthocyanes	++	++	+	+	-	-
Saponosides	+++	+++	-	-	-	-
Composés réducteurs	++	++	++	+	+	+
Quinones	+	++	-	-	-	-
Flavonoïdes	-	++	-	+	-	-
Leucoanthocyanes	-	-	-	-	-	-
Réaction positive: +++		Réaction moyennement positive: ++				
Réaction douteuse: +		Test négatif: -				

2.1.2. Tests phytochimiques des extraits d'*Echium vulgare*

Les tests phytochimiques effectués sur les différentes préparations des deux parties d'*Echium vulgare* ont donné les résultats présentés dans le **tableau N°12**.

Nous remarquons que l'extrait aqueux contient des flavonoïdes, des tanins cathéchiques et des quinones en quantité importante par rapport aux autres extraits et ceci dans les racines, les feuilles et les tiges.

L'extrait aqueux contient également plus d'alcaloïdes dans les feuilles et les tiges que dans les racines. En revanche, les composés réducteurs sont beaucoup plus importants dans les racines que dans les feuilles et les tiges.

Nous remarquons aussi que dans les trois extraits, la recherche des stéroïdes et triterpènes ainsi que les coumarines, s'est montrée positive.

Il ressort de l'analyse phytochimique que trois grands groupes de composés chimiques sont présents dans *Fredolia aretioides*. Il s'agit des alcaloïdes, des tanins galliques et des saponosides. Alors que *Echium vulgare* renferme les tanins cathéchiques, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les quinones. Par contre, les leucoanthocyanes, sont absents dans les deux plantes étudiées.

Tableau N°12: Caractérisation des groupes chimiques dans les extraits des racines, des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare*

Groupes chimiques	Extrait aqueux		Extrait éthanolique		Extrait éther diéthylique	
	Feuilles et tiges	Racines	Feuilles et tiges	Racines	Feuilles et tiges	Racines
Alcaloïdes	+++	++	+	++	-	-
Flavonoïdes	+++	+++	++	++	-	-
Tanins cathéchiques	+++	+++	++	++	-	-
Composés réducteurs	++	+++	++	+	-	-
Quinones	+++	+++	-	-	-	-
Anthocyanes	++	-	+	-	+	-
Stérols et triterpènes	+	+	++	++	++	++
Coumarines	++	++	++	++	+	++
Saponosides	-	-	-	-	-	-
Leucoanthocyanes	-	-	-	-	-	-
Réaction positive: +++		Réaction moyennement positive: ++				
Réaction douteuse: +		Test négatif: -				

2.2. Quantification et caractérisation des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins par méthode spectrophotométrique

2.2.1. Détermination de la teneur en polyphénols

La courbe d'étalonnage avec l'acide gallique de la **figure N°12** nous a permis de déterminer les teneurs en polyphenols des deux plantes. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 grammes de matière végétale sèche (mg GAE/100 g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats représentés dans le **tableau N°13**, montrent que les extraits hydrométhanoliques des plantes renferment des concentrations variables en polyphenols.

Nous constatons que les extraits des racines renferment des teneurs en polyphenols plus élevées que les parties aériennes des deux plantes, 971,05 mg EAG/100g pour la plante *Fredolia aretioides* et 1159 mg EAG/100g pour la plante *Echium vulgare*, contre 741,8 mg EAG/100g dans *Echium vulgare* et 764,54 ± 0,55 mg EAG/100g dans *Fredolia aretioides*.

Il faut noter que *Echium vulgare* est relativement plus riche en polyphenols que *Fredolia aretioides*.

Cette variation quantitative et qualitative du contenu polyphénolique entre les deux plantes peut être liée aux facteurs climatiques et environnementaux comme la zone géographique, la sécheresse, le sol et les maladies (**Ebrahimi et coll., 2008**). La période de la récolte, le stade de développement de la plante, la méthode d'extraction et de quantification peuvent également influencer la teneur en phénols totaux (**Lee et coll., 2003**).

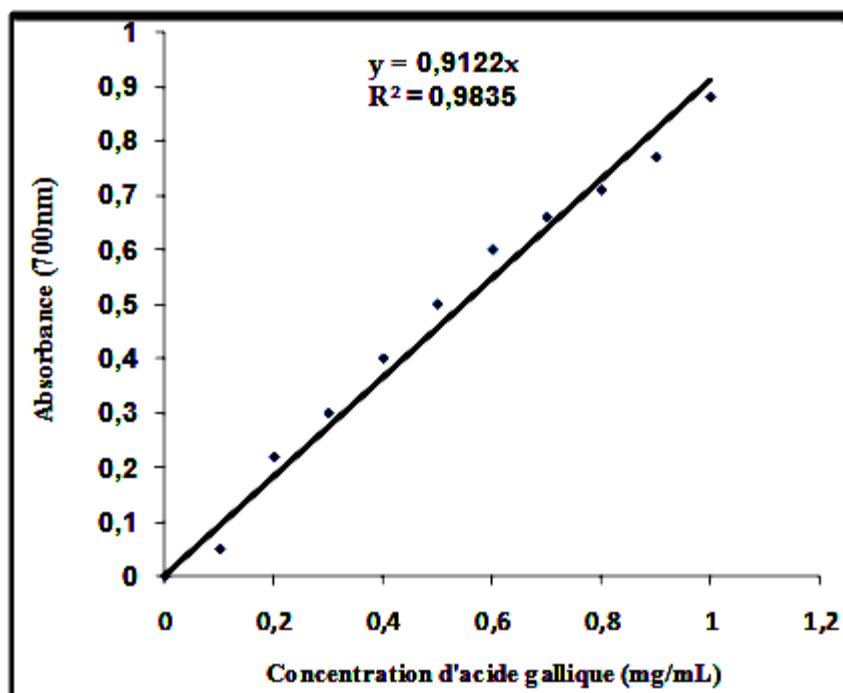


Figure N°12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau N°13 : Teneurs en polyphénols dans les extraits hydro-méthanoliques des racines, des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare*

Plantes	Teneurs en polyphénols (mg EAG/100g MS)	
	Racines	Feuilles et tiges
<i>Fredolia aretioides</i>	971,05 ± 0,83	764,54 ± 0,55
<i>Echium vulgare</i>	1159 ± 0,10	741,8 ± 0,25

2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La courbe d'étalonnage avec la catéchine de la **figure N°13** nous a permis de déterminer les teneurs en flavonoïdes totaux des racines, feuilles et tiges d'*Echium vulgare*. Les résultats obtenus sont reportés dans la **figure N°14**.

Nous remarquons que les racines d'*Echium vulgare* présentent la teneur la plus élevée en flavonoïdes soit 120 mg EC/g MS par rapport aux feuilles et tiges, dont la teneur est de 33,35 mg EC/g MS.

2.2.3. Dosage des tanins

Les résultats obtenus pour le dosage des tanins condensés et hydrolysables de *Fredolia aretioides*, sont présentés dans le **tableau N°14**.

Nous remarquons que l'extrait des racines de *Fredolia aretioides* contient plus de tanins que celui de la partie aérienne (Feuilles et tiges), avec respectivement 35,73% et 29,97%.

En revanche les feuilles et tiges d'*Echium vulgare* sont plus riches en tanins par rapport aux racines soit 31,89% et 25,40% respectivement (**tableau N°15**).

La présence de tanins suggère la capacité de cette plante à jouer un rôle majeur en tant qu'agent antimicrobien et antioxydant (**Bruneton, 1993**).

A partir de ces résultats, nous pouvons dire que *Fredolia aretioides* possède plus de tannins que *Echium vulgare*. Ceci pourrait s'expliquer par la différence des habitats et par la dispersion des espèces végétales. En effet, lorsque la diversité est grande, le contact des plantes avec les insectes est faible, la pression de sélection est réduite, par conséquent, la production de tanins devient importante car ils constituent l'essentiel du système de défense des végétaux (**Leigh, 1999**).

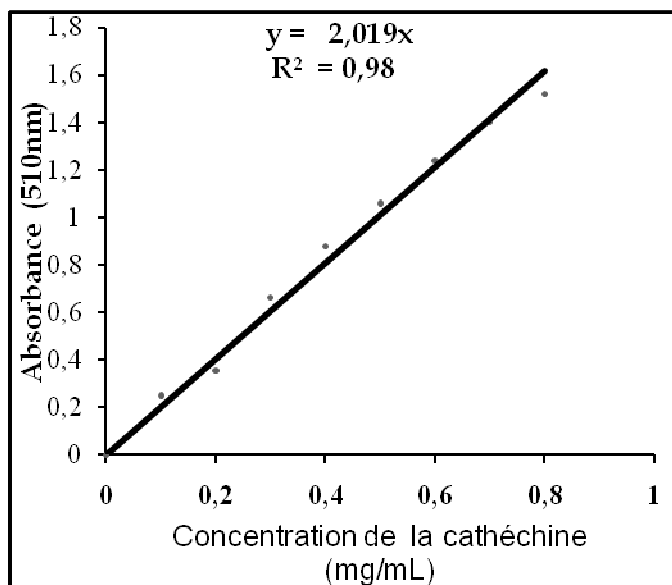


Figure N°13: Courbe d'étalonnage de la cathéchine.

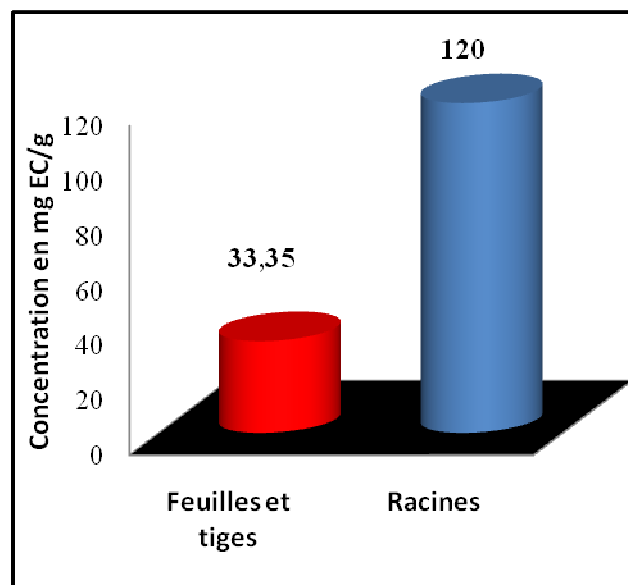


Figure N°14: Teneur en flavonoïdes totaux des racines, feuilles et tiges d'*Echium vulgare*

Tableau N°14 : Tanins condensés et hydrolysables des racines, des tiges et des feuilles de *Fredolia aretioides* (en %)

	<i>Fredolia aretioides</i>	
	Feuilles et tiges (%)	Racines (%)
Tanins condensés (%)	12,05	14,39
Tanins hydrolysables (%)	17,92	21,34
Total (%)	29,97	35,73

Tableau N°15 : Tanins condensés et hydrolysables (%) des racines, des tiges et des feuilles d'*Echium vulgare* (en %)

	<i>Echium vulgare</i>	
	Feuilles et tiges (%)	Racines (%)
Tanins condensés (%)	13,50	10,12
Tanins hydrolysables (%)	18,39	15,28
Total (%)	31,89	25,40

2.3. Rendements en extraits secs

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa polarité.

Les résultats des rendements d'extraction calculés à partir de la matière végétale sèche des racines, des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* et de *Fredolia aretioides* sont représentés respectivement par les **figures N°15 et N°16**.

Les résultats des extraits bruts d'*Echium vulgare* montrent que les rendements les plus élevés sont ceux de l'extrait hydrométhanolique et l'extrait aqueux des feuilles et des tiges soit 17,25% et 16,53% respectivement, suivis des extraits bruts des racines (15,39% pour l'extrait aqueux et 17,25% pour l'extrait eau-méthanol) (**figure N°15**).

Les teneurs des fractions acétate d'éthyle sont de 0,98% pour les feuilles et les tiges et de 0,45% pour les racines. Par contre, elles sont de 1,43% dans les parties aériennes et de 2,5% pour les racines de l'extrait n-butanolique.

Dans la **figure N°16**, nous constatons que les rendements enregistrés avec les extraits bruts de *Fredolia aretioides* sont estimés à 7,53%, pour les feuilles de l'extrait hydrométhanolique et à 22,87%, pour les racines de l'extrait aqueux.

Des teneurs importantes sont enregistrées avec l'extrait hydrométhanolique des racines (13,7%), l'extrait aqueux de la partie aérienne (8,31%) et l'extrait des tanins fraction butanolique des racines (10,3%).

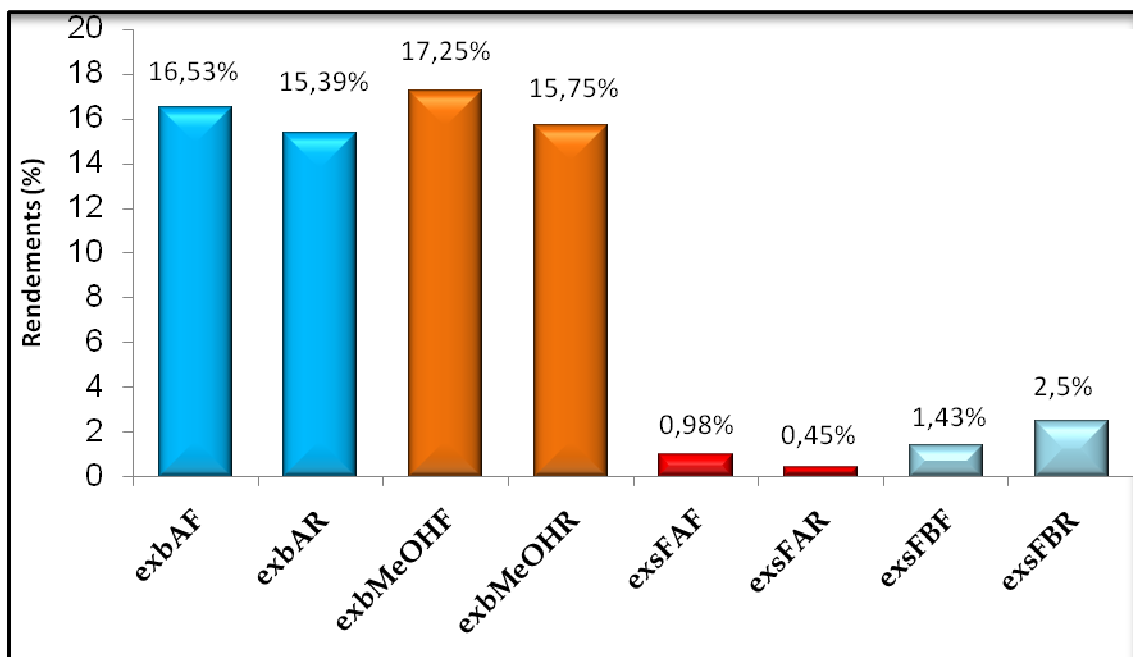


Figure N°15 : Rendements des extraits d'*Echium vulgare*.

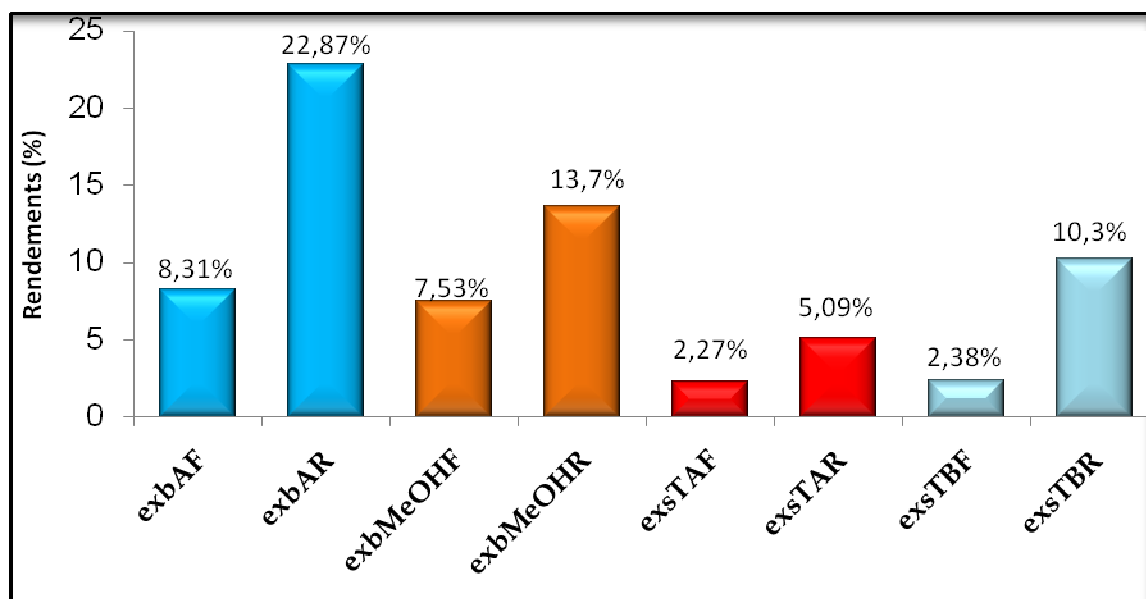


Figure N°16 : Rendements des extraits de *Fredolia aretioides*

exbAF: extrait brut aqueux des feuilles+tiges

exbMeOHF: extrait brut eau/MeOH des feuilles+tiges

exsTAF: Tanins: fraction acétate d'éthyle des feuilles+tiges

exsTBR : Tanins: fraction butanolique des racines

exsFAR : Flavonoïdes: fraction acétate d'éthyle des racines

exsFBF : Flavonoïdes: fraction butanolique des feuilles+tiges

exsFAF: Flavonoïdes: fraction acétate d'éthyle des feuilles+tiges

exbAR : extrait brut aqueux des racines

exbMeOHR : extrait brut eau/MeOH des racines

exsTBF: Tanins: fraction butanolique des feuilles+tiges

exsTAR : Tanins: fraction acétate d'éthyle des racines

exsFBR : Flavonoïdes: fraction butanolique des racines

3. Analyses biologiques

3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'*Echium vulgare*

3.1.1. Méthode de diffusion des disques

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits des racines de la plante *Echium vulgare* sur neuf souches bactériennes de référence sont regroupés sur le **tableau N°16**. Les valeurs indiquées sont les moyennes des triplicatas pour chaque test.

Nous pouvons dire que les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles aux extraits des racines d'*Echium vulgare* que les bactéries à Gram positif. En effet, les diamètres d'inhibition varient de 7 à 35 mm chez les bactéries à Gram négatif et de 7 à 20 mm chez les bactéries à Gram positif.

Nous remarquons également que la fraction acétate d'éthyle, les extraits n-butanol et eau/méthanol montrent une bonne activité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition de 35 et 30 mm respectivement.

Klebsiella pneumoniae et *Escherichia coli* se sont montrés très sensibles aux fractions acétate d'éthyle et n-butanol, le diamètre d'inhibition étant de 22 mm.

L'activité inhibitrice de la plupart des extraits des racines vis-à-vis de certaines souches est probablement liée à leur richesse en polyphénols qui peuvent être qualifiés de molécules antibactériennes. Sur la base des résultats obtenus nous pouvons dire que tous les extraits d'*Echium vulgare* à l'exception de l'extrait aqueux possèdent une activité antibactérienne relativement importante (diamètre ≥ 9) vis-à-vis des bactéries testées.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la partie aérienne de la plante *Echium vulgare* sont regroupés dans le **tableau N°17**.

Nous remarquons que la fraction acétate d'éthyle présente une bonne activité aussi bien sur les bactéries à Gram négatif que sur les bactéries à Gram positif. En effet, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* se sont montrés sensibles à cet extrait avec des zones d'inhibition d'environ 16 mm.

Tableau N°16: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des racines d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Extraits	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	Bactéries à Gram négatif					Bactéries à Gram positif			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus mrsa</i>	<i>B. cereus</i>
Brut Aqueux	7	8	7	6	7	7	7	7	7
Brut Eau/Méthanol	30	7	9	7	8	13	8	11	12
Flavonoïdes: Fraction Acétate d'éthyle	35	20	22	15	18	15	15	17	9
Flavonoïdes: Fraction n-butanol	30	22	20	15	17	20	18	17	8
DMSO	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tableau N°17: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Extraits	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	Bactéries à Gram négatif					Bactéries à Gram positif			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus mrsa</i>	<i>B. cereus</i>
Brut Aqueux	7	9	7	6	6	6	6	6	6
Brut Eau/Méthanol	12	8	12	9	8	8	9	15	9
Flavonoïdes: Fraction Acétate d'éthyle	14	16	15	10	10	15	12	6	11
Flavonoïdes: Fraction n-butanol	12	13	13	10	9	12	10	6	10
DMSO	6	6	6	6	6	6	6	6	6

D<8mm (Résistante), 9mm≥D≤14 (sensible), 15mm≥D≤19mm (Assez sensible), D>20mm (Très sensible)

3.1.2. Méthode de la microdilution en milieu liquide

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits des racines d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries sont présentés dans le **tableau N°18**.

Nous remarquons que les extraits des racines d'*Echium vulgare* sont beaucoup plus actifs sur les bactéries à Gram négatif que sur les bactéries à Gram positif. Les CMI varient de 0,75 à 11,5 mg/mL chez les bactéries à Gram négatif et de 1,12 à 13,5 mg/mL chez les bactéries à Gram positif.

Les extraits acétate d'éthyle et n-butanol présentent des CMI intéressantes vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherchia coli* et *Klebsiella pneumoniae* respectivement 0,75 ; 0,85 et 0,95 mg/mL.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits des feuilles et tiges d'*Echium vulgare* sont présentés dans le **tableau N°19**.

Les extraits eau/méthanol et n-butanol ont présenté les meilleures CMI vis-à-vis d'*Escherichia coli* (2 mg/mL) et de *Staphylocoques aureus (mrsa)* (0,98 mg/mL).

Les résultats obtenues par les deux méthodes montrent que les extraits des racines d'*Echium vulgare* sont plus actifs que ceux des feuilles et tiges. Ceci peut s'expliquer par le fait que les racines renferment plus de flavonoïdes et de polyphénols que les feuilles et les tiges.

Tableau N°18 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits des racines d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Extraits	CMI (mg/mL)								
	Bactéries à Gram négatif					Bactéries à Gram positif			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus mrsa</i>	<i>B. cereus</i>
Brut Aqueux	9,5	7	11,5	/	12,5	12,5	9,75	13,5	/
Brut Eau/Méthanol	1,6	5,5	2,81	5	11	6,5	8,5	5,62	7
Flavonoïdes : Fraction Acétate d'éthyle	0,75	1,03	0,95	2,25	1,12	3,25	1,12	1,34	11
Flavonoïdes: Fraction n-butanol	0,90	0,85	1,12	5,5	5,5	1,17	3,42	4,5	15

Tableau N°19: Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Extraits	CMI (mg/mL)								
	Bactéries à Gram négatif					Bactéries à Gram positif			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus mrsa</i>	<i>B. cereus</i>
Brut Aqueux	/	10,45	12,5	/	/	/	/	/	/
Brut Eau/Méthanol	2,15	6,5	2,25	5,5	4,5	3,5	/	0,98	/
Flavonoïdes: Fraction Acétate d'éthyle	3,10	6,5	3,12	7,25	4,5	2,25	3,25	/	11
Flavonoïdes: Fraction n-butanol	4,25	2	4,37	7,37	/	5	5	/	11,75

3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *Fredolia aretioides*

3.2.1. Méthode de diffusion des disques

Les résultats des tests qualitatifs de l'activité antibactérienne des extraits des racines de la plante *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches bactériennes sont regroupés dans le **tableau N°20**.

Nous remarquons que la fraction acétate d'éthyle présente une bonne activité aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. En effet, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus* se sont montrés sensibles à cet extrait avec des zones d'inhibition de 14 et 13 mm respectivement.

Nous constatons également que l'extrait n-butanol montre une très bonne activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus (mrsa)* et d'*Escherichia coli*, le diamètre étant de 20 et 14 mm respectivement.

Les résultats des tests préliminaires de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la partie aérienne de *Fredolia aretioides* sont présentés dans le **tableau N°21**.

Les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles aux extraits de la partie aérienne de *Fredolia aretioides* que les bactéries à Gram positif. Les diamètres d'inhibition varient de 6 à 20 mm chez les bactéries à Gram négatif et de 6 à 12 mm chez les bactéries à Gram positif

De plus, l'extrait hydrométhanolique montre une bonne activité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinobacter baumannii* avec des zones d'inhibition de 14 et 13 mm respectivement.

Pseudomonas aeruginosa s'est montré très sensible à la fraction acétate d'éthyle, le diamètre d'inhibition est de 20 mm.

Tableau N°20: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des racines de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Extraits	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	Bactéries à Gram négatif					Bactéries à Gram positif			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus mrsa</i>	<i>B. cereus</i>
Brut Aqueux	6	6	8	9	6	6	6	6	8
Brut Eau/Méthanol	8	6	9	9	8	8	8	9	8
Tanins: Fraction Acétate d'éthyle	14	12	10	10	11	14	14	9	13
Tanins: Fraction n-butanol	12	14	9	8	9	11	9	20	10
DMSO	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tableau N°21: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif

Extraits	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	Bactéries à Gram négatif					Bactéries à Gram positif			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus mrsa</i>	<i>B. cereus</i>
Brut Aqueux	7	6	6	6	6	6	6	6	6
Brut Eau/Méthanol	14	10	13	13	8	8	6	6	12
Tanins: Fraction Acétate d'éthyle	20	12	10	9	7	9	6	10	11
Tanins: Fraction n-butanol	11	6	8	8	6	6	6	6	11
DMSO	6	6	6	6	6	6	6	6	6

D<8mm (Résistante), 9mm≥D≤14 (sensible), 15mm≥D≤19mm (Assez sensible), D>20mm (Très sensible)

3.2.2. Méthode de la microdilution en milieu liquide

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices des extraits des racines de *Fredolia aretioides* sur les différentes souches bactériennes sont regroupés dans le **tableau N°22**.

Nous remarquons que les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont sensibles aux extraits des tanins de *Fredolia aretioides*.

Staphylococcus aureus methicillin resistant (mrsa) ATCC 43300 est la plus sensible aux extraits des racines essentiellement, les extraits acétate d'éthyle et hydrométhanolique avec des CMI respectives de 0,425 mg/mL et de 0,518 mg/mL.

L'extrait hydrométhanolique a une meilleure activité antibactérienne que l'extrait aqueux.

Les résultats relatifs à l'évaluation des CMI des extraits des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries sont présentés dans le **tableau N°23**.

Nous remarquons que les extraits de la partie aérienne de *Fredolia aretioides* sont beaucoup plus actifs sur les bactéries à Gram négatif que sur les bactéries à Gram positif. En effet, les CMI varient de 0,68 à 3,75 mg/mL chez les bactéries à Gram négatif et de 1,25 à 2,75 mg/mL chez les bactéries à Gram positif.

Les extraits eau/méthanol et acétate d'éthyle ont présenté les meilleures CMI vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* avec respectivement 0,87 et 0,68 mg/mL.

Les résultats des CMI obtenues avec la méthode des dilutions sont en corrélation avec ceux de la méthode de diffusion en milieu solide. La faible activité de certains composés est peut être due à la faible solubilité, ou à la résistance de certaines souches bactériennes.

Sur la base de ces résultats nous pouvons dire que les valeurs des CMI varient d'une bactérie à l'autre en fonction des différents extraits testés.

Tableau N°22 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits des racines de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Extraits	CMI (mg/mL)								
	Bactéries à Gram négatif					Bactéries à Gram positif			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus mrsa</i>	<i>B. cereus</i>
Brut Aqueux	/	/	2,47	10,5	/	/	/	/	9,75
Brut Eau/Méthanol	3.5	/	1.87	8	11.36	4.15	11	0,518	4,95
Tanins: Fraction Acétate d'éthyle	0.90	1.10	1.5	1.23	1.45	2.75	1,02	2,980	1,3
Tanins: Fraction n-butanol	1.05	0.95	2	0.88	1.42	3.5	4,35	0,425	1,25

Tableau N°23 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et Gram positif.

Extraits	CMI (mg/mL)								
	Bactéries à Gram négatif					Bactéries à Gram positif			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus mrsa</i>	<i>B. cereus</i>
Brut Aqueux	3,75	/	/	/	/	/	/	/	/
Brut Eau/Méthanol	0,87	2,5	1,05	1,5	2,65	1,5	/	/	1,45
Tanins: Fraction Acétate d'éthyle	0,68	2,5	1,12	3,25	2,5	1,25	/	/	2,15
Tanins: Fraction n-butanol	1,35	/	1,97	3,37	/	/	/	/	2,75

3.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits d'*Echium vulgare* et de *Fredolia aretioides*

3.3.1. Méthode de diffusion des disques

Cette évaluation est effectuée sur deux souches de *Candida albicans* (IP 444 et ATCC 10231) et un champignon filamenteux (*Aspergillus flavus* MNHN 994294) suivant les méthodes de référence CLSI (NCCLS) M38-A2 pour la technique de diffusion sur gélose.

Nous avons utilisé comme antifongique de référence l'amphotéricine B. il s'agit de l'antifongique le plus utilisé en milieu clinique.

Les résultats des tests qualitatifs de l'activité antifongique des extraits de la plante *Echium vulgare* sont regroupés dans le **tableau N°24**.

Les extraits des deux fractions de flavonoïdes des racines, des feuilles et des tiges possèdent une bonne activité vis-à-vis des deux souches de *Candida albicans* et d'*Aspergillus flavus* par rapport aux extraits aqueux et eau/méthanol.

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits des flavonoïdes varient de 14 à 22,5 mm et de 13 à 17 mm respectivement des racines et des feuilles plus tiges (comparativement à celui de l'amphotéricine B).

Il faut noter que l'extrait de la fraction n-butanol des flavonoïdes des racines a montré une activité antifongique nettement supérieure vis-à-vis de *Candida albicans* IP444, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus flavus* MNHN 994294 avec des diamètres respectifs de 22,5 ; 20 et 19 mm.

Les résultats des tests qualitatifs de l'activité antifongique des extraits de la plante *Fredolia aretioides* sont présentés dans le **tableau N°25**.

Nous remarquons que les extraits des fractions flavonoïdes et eau/méthanol de la plante *Fredolia aretioides* ont montré une activité vis-à-vis des trois souches testées. Cependant, cette activité est nettement inférieure à celle de l'amphotéricine B.

Il ressort de cette partie qu'*Echium vulgare* possède une activité antifongique supérieure à celle de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* IP 444 et ATCC 10231 et d'*Aspergillus flavus* MNHN 994294.

Tableau N°24 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits d'*Echium vulgare* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.

Souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)									
	Racines				Feuilles+tiges				DMSO	Amphotéricine B (0,1 mg/mL)
	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Flavonoïdes Fraction Acétate d'éthyle	Flavonoïdes Fraction n-butanol	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Flavonoïdes Fraction Acétate d'éthyle	Flavonoïdes Fraction n-butanol		
<i>Candida albicans</i> IP 444	6	11	15	22,5	6	9	14	17	6	20
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	7	9	14	20	6	8	13	15	6	15
<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	6	7	14	19	7	8	14	13	6	6

Tableau N°25 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.

Souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)									
	Racines				Feuilles+tiges				DMSO	Amphotéricine B la (0,1 mg/mL)
	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Flavonoïdes Fraction Acétate d'éthyle	Flavonoïdes Fraction n-butanol	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Flavonoïdes Fraction Acétate d'éthyle	Flavonoïdes Fraction n-butanol		
<i>Candida albicans</i> IP 444	7	12	13	12	7	9	15	13	6	20
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6	9	11	11	6	8	12	11	6	15
<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	6	11	11	12	6	7	13	10	6	6

3.3.2. Méthode de la microdilution en milieu liquide

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits d'*Echium vulgare* sont présentés dans le **tableau N°26**.

Nous remarquons que la fraction n-butanol d'*Echium vulgare* présente une bonne activité vis-à-vis des trois souches. Elle varie de 0,325 à 0,7 mg/mL et de 0,625 à 1,25 mg/mL respectivement des racines et des feuilles plus tiges. Ces CMI restent supérieures à celle de l'amphotéricine B.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits de *Fredolia aretioides* sont présentés dans le **tableau N°27**.

L'extrait acétate d'éthyle des feuilles et des tiges a présenté la meilleure CMI vis-à-vis de *Candida albicans* IP444 (0,89 mg/mL).

Tableau N°26 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits d'*Echium vulgare* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.

Souches	CMI (mg/mL)								
	Racines				Feuilles+tiges				Amphotéricine B
	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Flavonoïdes Fraction Acétate d'éthyle	Flavonoïdes Fraction n-butanol	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Flavonoïdes Fraction Acétate d'éthyle	Flavonoïdes Fraction n-butanol	
<i>Candida albicans</i> IP 444	/	2,37	0,925	0,325	/	4,85	1,12	0,625	0,2 x 10 ⁻³
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	/	3,125	1,07	0,633	/	5,15	1,53	0,937	0,156 x 10 ⁻³
<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	/	/	1,13	0,700	/	5,21	0,960	1,25	/

Tableau N°27 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*

Souches	CMI (mg/mL)								
	Racines				Feuilles+tiges				Amphotéricine B
	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Flavonoïdes Fraction Acétate d'éthyle	Flavonoïdes Fraction n-butanol	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Flavonoïdes Fraction Acétate d'éthyle	Flavonoïdes Fraction n-butanol	
<i>Candida albicans</i> IP 444	/	2,45	1,15	1,25	/	3,75	0,89	1,325	0,2 x 10 ⁻³
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	/	4,45	1,45	2,05	/	4,98	1,25	2,05	0,156 x 10 ⁻³
<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	/	3,125	2,10	1,89	/	/	1,03	2,15	/

3.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Fredolia aretioides*

3.4.1. Méthode de réduction de fer (FRAP: *Ferric reducing antioxidant power*)

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang et coll., 2008).

Nous avons évalué l'activité antioxydante des différents extraits des racines et des feuilles plus tiges de la plante *Fredolia aretioides* par la méthode de FRAP. Les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait **figure N°17 (A, B, C, D et E)**.

Nous constatons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits.

Les résultats relatifs à l'activité antioxydante de l'extrait hydro-méthanolique de *Fredolia aretioides* sont présentés dans **la figure N°17 (A)**.

Nous remarquons que les deux parties de la plante ont des pouvoirs réducteurs plus ou moins proches, avec une activité antioxydante légèrement supérieure pour les feuilles (0,64) par rapport aux racines qui présentent pour la même concentration de 0,15 mg/mL un taux de réduction de fer de 0,24.

Le pouvoir réducteur de l'extrait brut aqueux des racines **figure N°17(B)**, présente une capacité à réduire le fer de l'ordre de 1,18 à une concentration de 0,15 mg/mL par rapport à l'extrait des feuilles et des tiges qui pour la même concentration, présentent un taux de réduction de 0,32.

Les variations de la capacité antioxydante de l'extrait des tanins fraction n-butanol, représentées dans **la figure N°17 (C)**, montrent que les racines, les feuilles et les tiges ont des pouvoirs antioxydants presque similaires et augmentent avec la même allure. Tandis que la fraction acétate d'éthyle **figure N°17 (D)** présente une activité antioxydante plus intéressante dans les feuilles et les tiges que dans des racines et qui est estimée à 1,20 pour une concentration de 0,15 mg/mL de l'échantillon à l'inverse des racines qui présentent un faible pouvoir réducteur pour la même concentration.

Afin de comparer les activités antioxydantes, nous avons présenté les résultats sous forme d'histogrammes dans **la figure N°17 (E)**. Nous pouvons déduire que tous les extraits de *Fredolia aretioides* ont la capacité à réduire le fer mais celle-ci reste variable entre les deux parties de la plante. Cette activité antioxydante est beaucoup plus importante dans l'extrait brut aqueux des racines et dans la fraction acétate d'éthyle des tanins des feuilles et des tiges.

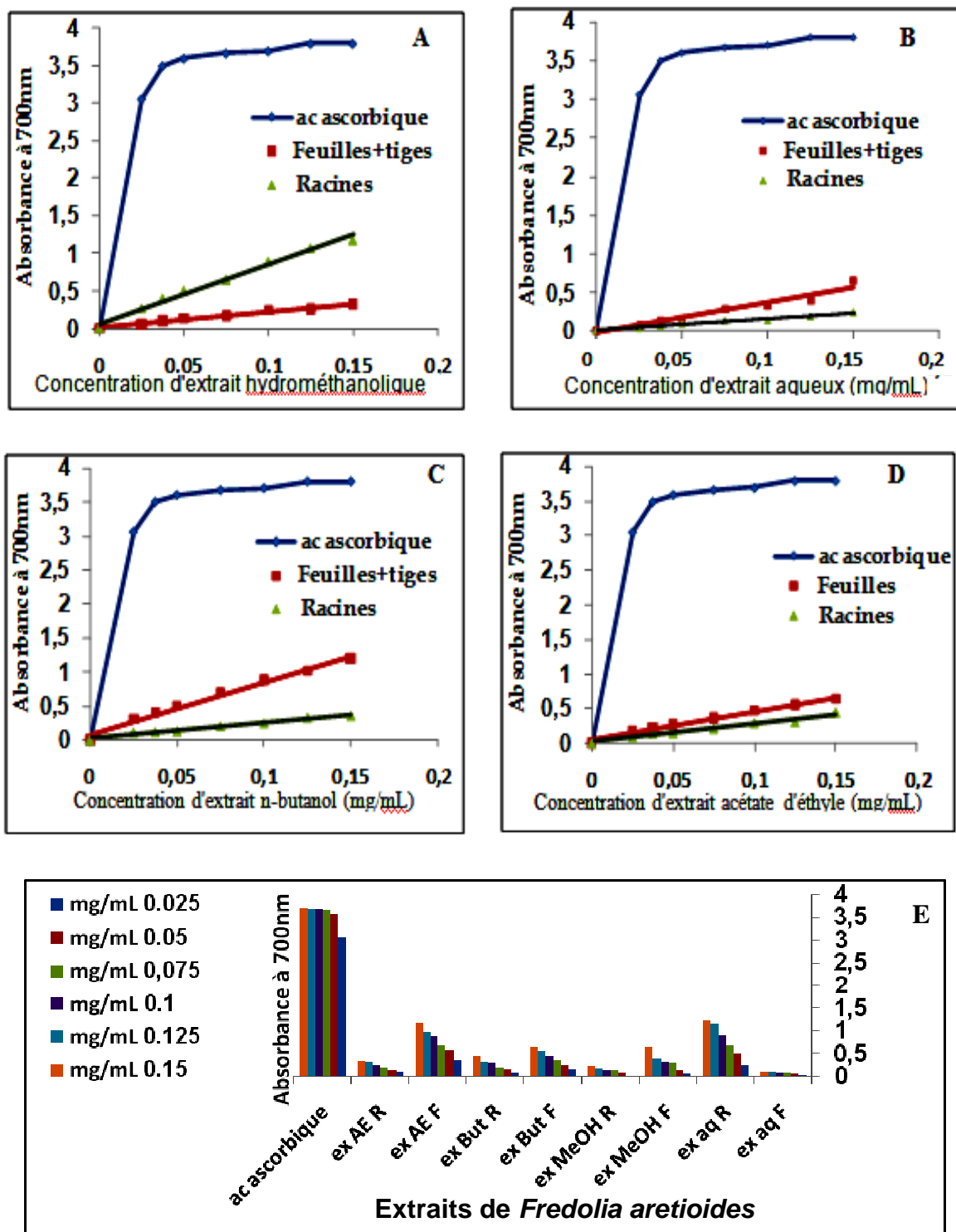


Figure N°17: Variation du pouvoir réducteur des extraits des racines, des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.

3.4.2. Méthode du piégeage du radical libre DPPH[·] (2,2-diphényl 1-1picrylhydrazyl)

Nous avons testé le pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, des extraits des racines et des feuilles+tiges de *Fredolia aretioides*. Les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait **figure N°18 (A, B, C et D)**.

Ces courbes correspondent à la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de nos extraits

L'extrait brut aqueux des feuilles a montré un pouvoir antioxydant très important par rapport à l'extrait brut aqueux des racines. Ceci est montré par l'allure des graphes de la **figure N°18 (A)**, qui correspond à une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du radical DPPH en sa forme non radicalaire. A une concentration de 1 mg/mL, le pourcentage de réduction du DPPH est de l'ordre de 64,34 % pour l'extrait aqueux des feuilles et des tiges contre 34,04 % pour l'extrait brut des racines.

L'extrait brut hydro-méthanolique des racines a montré une activité antioxydante plus importante que celle des feuilles et des tiges. A une concentration de 2 mg/mL, l'extrait des racines entraîne une réduction de 87,24 %, contre 69,45% pour l'extrait des feuilles et des tiges. Cependant, ces données restent inférieures à celles de l'acide ascorbique **figure N°18 (B)**.

La figure N°18 (C) montre que pour les fractions acétate d'éthyle des tanins, le meilleur résultat obtenu est celui des extraits des feuilles et des tiges, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 83,25 % pour une concentration de 1,49 mg/mL. Concernant les fractions butanoliques représentées dans la **figure N° 18 (D)**, les extraits des deux parties de *Fredolia aretioides* ont donné une activité antioxydante presque similaire. Nous remarquons que pour une concentration de 2 mg/mL, l'activité antiradicalaire est de 57,74 % et 52,74 % pour les tanins des feuilles et des racines respectivement.

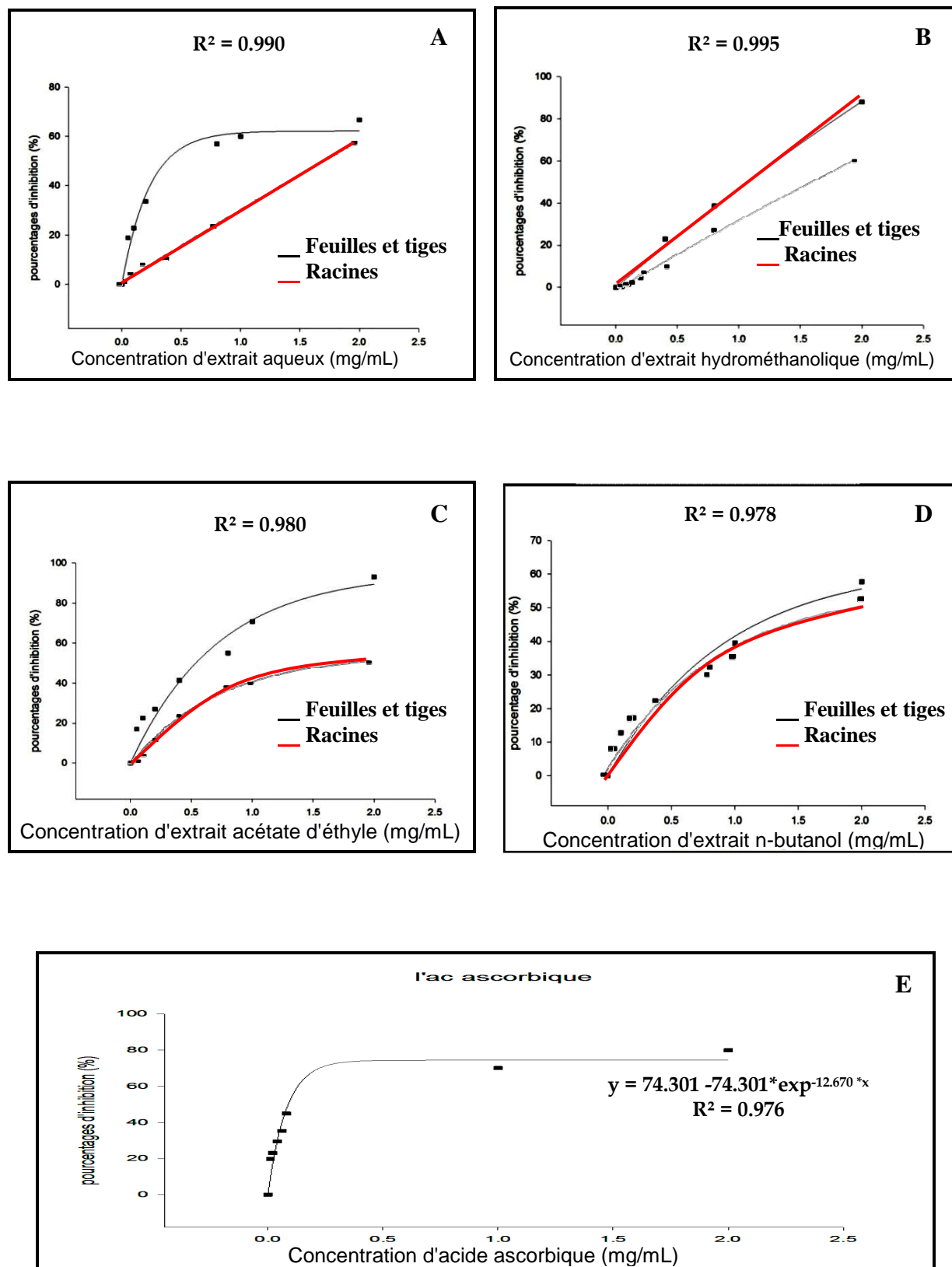


Figure N°18 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH' en fonction des concentrations des extraits des racines, des feuilles et des tiges de *Fredolia aretioides* et de l'acide ascorbique.

Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondant à 50 % d'inhibition (IC_{50}). La capacité antioxydante de nos extraits est déterminée à partir des IC_{50} . Cette dernière est inversement proportionnelle à l'activité antioxydante de l'extrait testé (**Prakash et coll., 2007**). Les valeurs des IC_{50} calculées pour tous les extraits testés sont représentées dans le **tableau N°28**.

La forte activité des extraits aqueux est attribuée à leur richesse en composés phénoliques. Ces extraits contiennent plusieurs molécules bioactives telles que les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins. En effet, une étude réalisée par **Kang et Coll. (2003)** a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antioxydante.

Tableau N°28 : Valeurs des IC_{50} des extraits des deux parties de *Fredolia aretioides*.

Extrait	IC_{50}	
	Feuilles+tiges (mg/mL)	Racines (mg/mL)
Aqueux	0,37 ± 0,388	1,81 ± 0,841
Eau/Méthanol	1,69 ± 0,490	1,06 ± 0,839
Tanins- Fraction: n-Butanol	1,46 ± 0,968	1,90 ± 0,978
Tanins- Fraction: acétate d'éthyle	0,53 ± 0,749	1,61 ± 0,577
Acide ascorbique	0,08 ± 0,839	

3.5. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echium vulgare*

3.5.1. Méthode de réduction de fer (FRAP: *Ferric reducing antioxidant power*)

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP des extraits des racines, des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* sont présentés dans la **figure N°19 (A, B, C, D, E)**.

Les résultats du pouvoir de réduction de fer de l'extrait hydro-méthanolique représentés dans la **figure N°19 (A)**, montrent une activité antioxydante dans les deux parties de la plante.

Cette capacité à réduire le fer pour l'extrait aqueux des racines est plus élevée que celle de l'extrait des feuilles et des tiges. Cette activité antioxydante est estimée à 1,12 pour les racines contre 0,39 dans les feuilles et les tiges à la concentration 0,15 mg/mL **figure N°19 (B)**.

Le pouvoir réducteur des fractions butanolique et acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* représenté dans la **figure N°19 (C, D)** est de 2,1 et 1,05 à la concentration 0,15 mg/mL respectivement. Nous avons constaté que c'est les extraits des racines qui présentent une forte activité antioxydante comparativement aux extraits des feuilles et des tiges.

La classification des différents extraits des deux parties de la plante selon leur activité antioxydante est représentée dans la **figure N°19 (E)**. Nous pouvons déduire que l'extrait butanolique des racines présente le meilleur pouvoir de réduction de fer par rapport à tous les extraits et ceci peut être attribué à la présence des flavonoïdes. Tandis que l'efficacité de réduction de fer de l'extrait aqueux des racines peut être due à l'effet synergique entre les différents composés de cet extrait. Les autres extraits ont présenté une activité faible par rapport aux extraits cités précédemment.

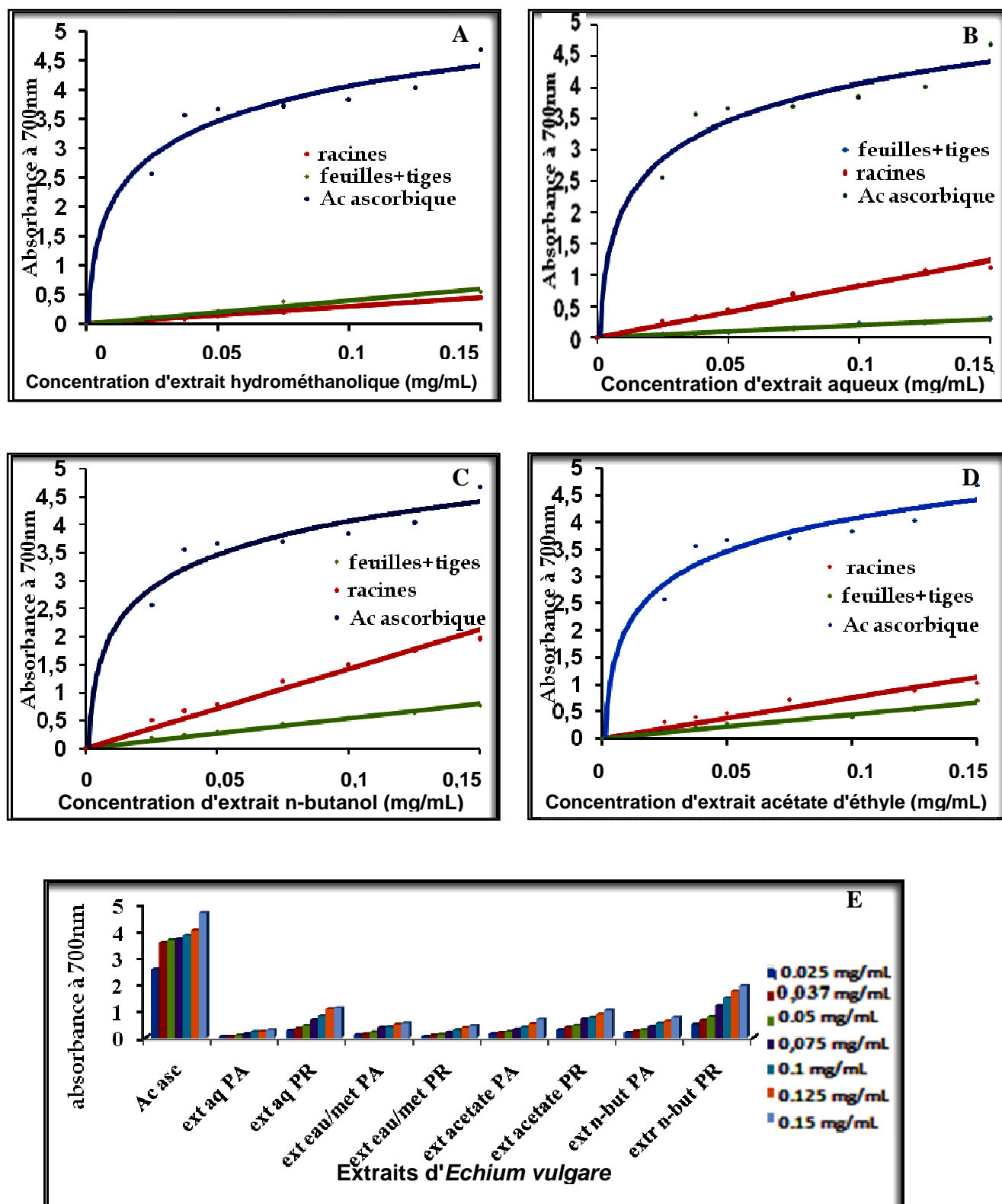


Figure N°19 : Variation du pouvoir réducteur des extraits des racines, des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.

3.5.2. Méthode du piégeage du radical libre DPPH[·] (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl)

Les résultats de l'activité antioxydante des racines des feuilles et des tiges d'*Echium vulgare* sont présentés sur la **figure N°20 (A, B, C et D)**.

Nous remarquons que l'activité antioxydante est presque identique pour l'extrait brut aqueux des deux parties de la plante **figure N°20 (A)**,

L'extrait brut hydro-méthanolique des racines présente une grande activité de piégeage du radical DPPH[·] de l'ordre de 95% contre 90% pour l'extrait des feuilles et des tiges à la concentration de 2 mg/mL **figure N°20 (B)**.

L'activité antioxydante enregistrée pour l'extrait acétate d'éthyle des racines est plus importante que celle des feuilles et des tiges. Cette capacité est de l'ordre de 93% à la concentration de 2mg/mL contre 54% pour les feuilles et les tiges **figure N°20 (C)**.

Pour les extraits butanoliques représentés dans la **figure N°20 (D)**, le meilleur résultat obtenu est celui de l'extrait des racines qui a donné un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 95% à concentration de 2 mg/mL.

En ce qui concerne *Echium vulgare*, les extraits des racines ont des valeurs d'IC₅₀ inférieures à celles des extraits des feuilles et des tiges. Ce qui reflète une activité antioxydante plus importante à l'exception de l'extrait brut aqueux (**tableau N°29**).

L'activité antioxydante de l'extrait hydrométhanolique des racines est la plus élevée (IC₅₀=0,4 mg/mL) suivie de la fraction acétate d'éthyle (IC₅₀=0,5 mg/mL) puis de la fraction butanolique (IC₅₀=0,61 mg/mL).

Tableau N°29 : Valeurs des IC₅₀ des extraits des deux parties d'*Echium vulgare*.

Extrait	IC ₅₀	
	Feuilles et tiges (mg/mL)	Racines (mg/mL)
Aqueux	1,54± 0,742	1,73± 0,621
Eau/Méthanol	0,774± 0,838	0,402± 0,488
Flavonoïdes- Fraction acétate d'éthyle	1,786± 0,980	0,5± 0,566
Flavonoïdes- Fraction butanolique	1,5± 0,650	0,615± 0,430
Acide ascorbique	0,1± 0,578	

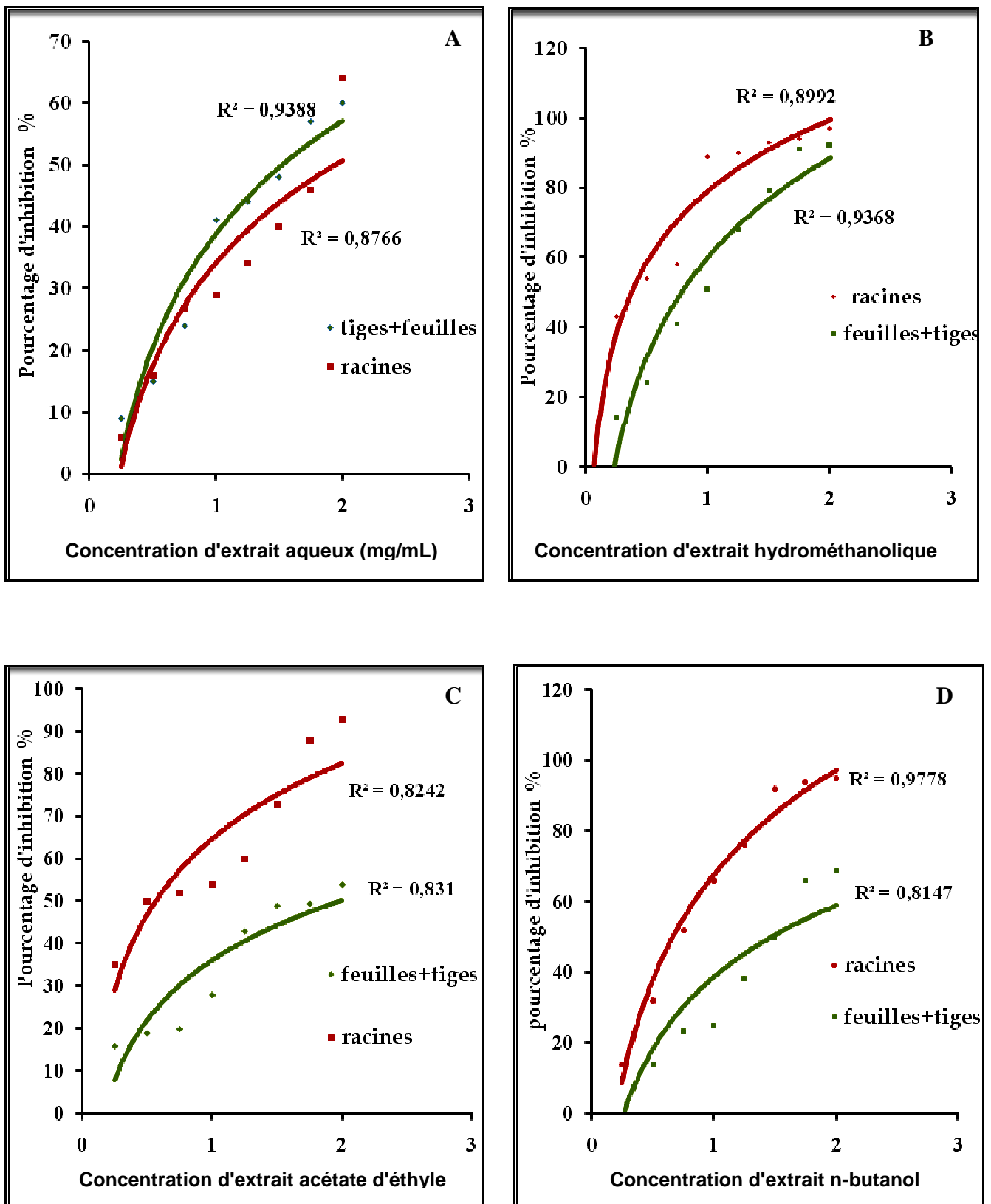


Figure N°20 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH \cdot en fonction des concentrations des extraits d'*Echium vulgare*.

4. Propriétés de conservation d'un produit cosmétique par les extraits

La sécurité microbiologique des produits cosmétiques présente un intérêt très important pour les industries, en raison de la contamination microbiologique qui peut provoquer de grands changements sur la composition de ces produits.

Les agents conservateurs sont ajoutés dans les produits pour deux raisons:

- prévenir l'altération microbiologique et prolonger la date d'expiration du produit.
- protéger le consommateur contre les infections.

Cependant, ces conservateurs chimiques, posent beaucoup de problèmes pour une grande partie des consommateurs. C'est pourquoi, il y a un grand intérêt porté sur les produits cosmétiques qui contiennent des conservateurs naturels.

Dans cette étude trois extraits naturels sont choisis pour évaluer leurs capacités à conserver le produit cosmétique formulé (shampoing) et ceci sur la base des résultats des activités antimicrobiennes et antioxydantes obtenus des différents extraits des deux plantes. Notre choix a porté sur:

- L'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides*
- L'extrait n-butanol des racines d'*Echium vulgare*
- L'extrait acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare*

Les critères d'évaluation de l'activité antimicrobienne et d'acceptation de la pharmacopée européenne, sont donnés dans le **tableau N°30** en terme de réduction logarithmique du nombre de microorganismes viables par rapport à la valeur de l'inoculum.

Tableau N°30 : Critères d'acceptation du produit cosmétique selon les normes de la pharmacopée européenne (EP, 2005).

		Log de réduction			
		2 ^{ème} jour	7 ^{ème} jour	14 ^{ème} jour	28 ^{ème} jour
Bactérie	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
Levure	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

NI: No Increasing (aucune augmentation)

Pour les préparations destinées à une application local, les critères A expriment l'efficacité recommandée à atteindre. Lorsque ces critères A ne peuvent être satisfaits, et dans des cas justifiés, par exemple une augmentation du risque de réactions indésirables, des critères minimums dits critères B doivent être remplis.

Le test challenge ou d'évaluation de l'activité antimicrobienne est effectué sur les trois formulations suivantes:

- Shampooing + extrait naturel+ EDTA,
- Shampooing + extrait naturel,
- Shampooing + EDTA

4.1. Extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides*

Les résultats du test d'évaluation de l'activité antimicrobienne (Test challenge) de l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* sont présentés dans le **tableau N°31**.

Le test de challenge effectué dans la formulation du shampooing conservé avec l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* à 1% satisfait le critère B de la pharmacopée européenne pour les souches bactériennes (réduction de l'inoculum bactérien d'un facteur de 10^3 au 14^{ème} jour de défi, sans augmentation au 28^{ème} jour).

En ce qui concerne la souche de levure et de champignon, à la concentration d'extrait choisie l'inoculum est réduit d'un facteur de 10^2 dès le 14^{ème} jour sans augmentation au 28^{ème} jour et satisfait donc le critère A.

Le contrôle composé de shampooing conservé avec EDTA satisfait le critère B. Le contrôle négatif (shampooing sans conservateur) s'est avéré un bon substrat pour la multiplication des bactéries à Gram négatif au 28^{ème} jour et un biocide pour les bactéries à Gram positif et les levures dont le nombre est réduit progressivement.

En revanche, cet effet antimicrobien, était plus lent et moins sévère que celui observé dans le shampooing conservé avec l'extrait acétate d'éthyle de *Fredolia aretioides*+EDTA.

Tableau N°31: Propriétés de conservation du shampoing par l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* : test de challenge.

	Shampoing (Jour) (Log UFC g ⁻¹)				
	0	2	7	14	28
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933					
Extrait Acétate d'éthyle	6,2	5,5	4,3	3,3	3,6
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	6,2	4,1	3,4	3,4	2,9
Contrôle EDTA	6,2	4,6	3,6	3,2	2,2
Contrôle	6,2	6,7	7,0	7,4	7,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					
Extrait Acétate d'éthyle	6,0	5,3	4,5	3,0	2,8
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	6,0	4,4	3,2	2,6	2,3
Contrôle EDTA	6,0	4,4	3,8	2,7	2,2
Contrôle	6,0	7,4	7,9	8,0	8,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					
Extrait Acétate d'éthyle	6,3	5,7	4,5	3,1	3,5
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	6,3	4,9	3,8	2,9	2,8
Contrôle EDTA	6,3	4,8	3,9	3,2	2,0
Contrôle	6,3	8,2	8,7	8,8	8,8
<i>Candida albicans</i> IP 444					
Extrait Acétate d'éthyle	6,0	5,2	4,5	3,2	3,9
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	6,0	4,8	3,6	2,9	2,6
Contrôle EDTA	6,0	4,6	3,7	3,1	2,6
Contrôle	6,0	7,9	7,6	6,5	6,4
<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294.					
Extrait Acétate d'éthyle	5,7	5,0	4,0	3,7	2,8
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	5,7	4,6	3,6	3,0	2,8
Contrôle EDTA	5,7	4,8	3,2	3,0	2,8
Contrôle	5,7	5,4	6,4	6,2	6,2

4.2. Extraits n-butanol et acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare*

Les résultats des propriétés de conservation des extraits n-butanol et acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* dans le shampoing sont présentés dans le **tableau N°32**.

***Escherichia coli*:**

Les résultats obtenus pour la souche *Escherichia coli*, montrent que les deux préparations (Extrait et Extrait+EDTA) répondent aux critères A de la pharmacopée européenne. Un effet bactéricide permanent est atteint lors du deuxième jour suivant l'inoculation. Cependant, l'EDTA s'est une fois de plus avéré hostile à la survie bactérienne, comme il a aussi entraîné un effet bactéricide 14 jours après la contamination artificielle (Critères B).

***Staphylococcus aureus* :**

Dans le cas de la formulation du shampoing conservé avec les extraits n-butanol et acétate d'éthyle d'*Echium vulgare*, la population microbienne est progressivement éliminée dès la première semaine (Critère A). Cependant, cet effet antibactérien a été plus lent et relativement moins sévère que celui observé dans le shampoing qui contient l'extrait+EDTA. L'addition du conservateur est impérative dans cette formulation puisque nous remarquons une multiplication progressive de la souche *Staphylococcus aureus* pendant les 28 jours de suivi (Contrôle négatif).

***Pseudomonas aeruginosa*:**

Comme le micro-organisme précédent, le shampoing conservé avec l'extrait n butanol et l'extrait acétate d'éthyle a montré une action antimicrobienne qui satisfait le critère A. Cependant, une fois de plus l'activité antibactérienne résultante de la présence de l'extrait (n-butanol ou acétate d'éthyle) +EDTA dans la formulation du produit était plus directe et plus sévère. Le shampoing (contrôle négatif) a permis la prolifération de cette souche. Ceci a été démontré par un nombre microbien accru dans le produit. D'autre part, l'EDTA a montré une activité bactéricide persistante envers *Pseudomonas aeruginosa* après le 14^{ème} jour remplissant ainsi le critère B.

***Aspergillus Niger et Candida albicans*:**

Une semaine après l'inoculation des trois formulations du shampoing, une diminution remarquable du nombre d'UFC est notée remplissant ainsi les exigences du critère A (à savoir réduction d'un facteur de 10^2 au 14^{ème} jour du test sans aucune augmentation au 28^{ème} jour).

Tableau N°32 : Propriétés de conservation du shampoing par l'extrait n-butanol et l'extrait acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* : test de challenge

	Shampoing (Jour) (Log UFC g ⁻¹)				
	0	2	7	14	28
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933					
Extrait n-butanol	6,2	4,2	3,0	2,9	2,0
Extrait n-butanol + EDTA	6,2	3,6	2,4	2,4	1,9
Extrait Acétate d'éthyle	6,2	4,3	3,2	2,9	2,2
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	6,2	4,0	3,1	2,6	1,9
Contrôle EDTA	6,2	4,6	3,6	3,2	2,2
Contrôle	6,2	6,7	7,0	7,4	7,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					
Extrait n-butanol	6,0	4,1	3,1	2,9	2,4
Extrait n-butanol + EDTA	6,0	3,4	2,5	2,3	2,0
Extrait Acétate d'éthyle	6,0	4,1	3,1	2,8	2,1
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	6,0	4,0	3,0	2,4	1,6
Contrôle EDTA	6,0	4,4	3,8	2,7	2,2
Contrôle	6,0	7,4	7,9	8,0	8,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					
Extrait n-butanol	6,3	4,3	3,2	2,5	2,1
Extrait n-butanol + EDTA	6,3	3,5	2,3	2,0	1,5
Extrait Acétate d'éthyle	6,3	4,4	3,3	2,9	2,3
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	6,3	4,0	3,0	2,6	1,8
Contrôle EDTA	6,3	4,8	3,9	3,2	2,0
Contrôle	6,3	8,2	8,7	8,8	8,8
<i>Candida albicans</i> IP 444					
Extrait n-butanol	6,0	4,3	3,9	3,1	2,7
Extrait n-butanol + EDTA	6,0	3,8	3,0	2,5	1,6
Extrait Acétate d'éthyle	6,0	4,8	3,9	3,5	2,9
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	6,0	4,0	3,2	2,8	2,0
Contrôle EDTA	6,0	4,6	3,7	3,3	2,6
Contrôle	6,0	7,9	7,6	6,5	6,4
<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294.					
Extrait n-butanol	5,7	4,2	3,3	3,0	2,5
Extrait n-butanol + EDTA	5,7	3,4	2,8	2,0	1,3
Extrait Acétate d'éthyle	5,7	4,9	3,7	3,4	2,9
Extrait Acétate d'éthyle + EDTA	5,7	4,2	3,0	2,3	1,6
Contrôle EDTA	5,7	4,8	3,2	3,0	2,8
Contrôle	5,7	5,4	6,4	6,2	6,2

5. Evaluation de l'activité hémolytique des extraits des plantes vis-à-vis des globules rouges humains

Dans cette partie, nous avons testé uniquement les extraits qui ont montré les CMI et les IC₅₀ les plus intéressantes. La cytotoxicité est suivie par la fuite de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges humains (modèle universel de cellules animales). Le taux d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire additionné de différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides*, l'extrait n-butanol et l'extrait acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* est mesuré par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 548nm.

La cinétique de la fuite d'hémoglobine est suivie à 37°C pendant 90 minutes sous agitation continue à 130 tours/minute.

Les résultats relatifs aux taux d'hémolyse induit par les différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* allant de 1 à 8,5 mg/mL vis-à-vis des globules rouges sont présentés sur la **figure N°21 (A)**.

Nous constatons que la fuite de l'hémoglobine intracellulaire dépend de la concentration finale de l'extrait testé. En effet, le taux d'hémolyse varie de 35% à 45%, lorsque la concentration finale de l'extrait acétate d'éthyle passe de 4,25 à 8,5 mg/mL. En revanche, aucune lyse des globules rouges n'est observée en présence de l'extrait acétate d'éthyle à une concentration finale de 1 mg/mL jusqu'à 90 minutes d'incubation. Il est important de signaler que le DMSO n'a aucun effet sur les globules rouges humains.

En ce qui concerne l'effet de l'extrait de l'acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* sur la fuite de l'hémoglobine des globules rouges, les résultats sont présentés sur la **figure N°21 (B)**.

A une concentration finale de 3,3 mg/mL, la fuite de l'hémoglobine est maximale et atteint 25%. En revanche, aucune lyse n'est observée pour des concentrations finales équivalentes à 0,825 et 1,65 mg/mL. Ces concentrations correspondent aux CMI de cet extrait vis-à-vis des levures et des bactéries testées

Nous avons testé également la cytotoxicité de l'extrait n-butanol des racines d'*Echium vulgare* qui a montré une activité antimicrobienne très intéressante.

Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure N°21 (C)**.

Nous remarquons que cet extrait est moins toxique que les deux précédents. L'hémolyse maximale estimée à 18% est atteinte avec une concentration finale de 5 mg/mL. Pour une concentration finale de 0,625 mg/mL, les globules rouges gardent la totalité de leur contenu en hémoglobine.

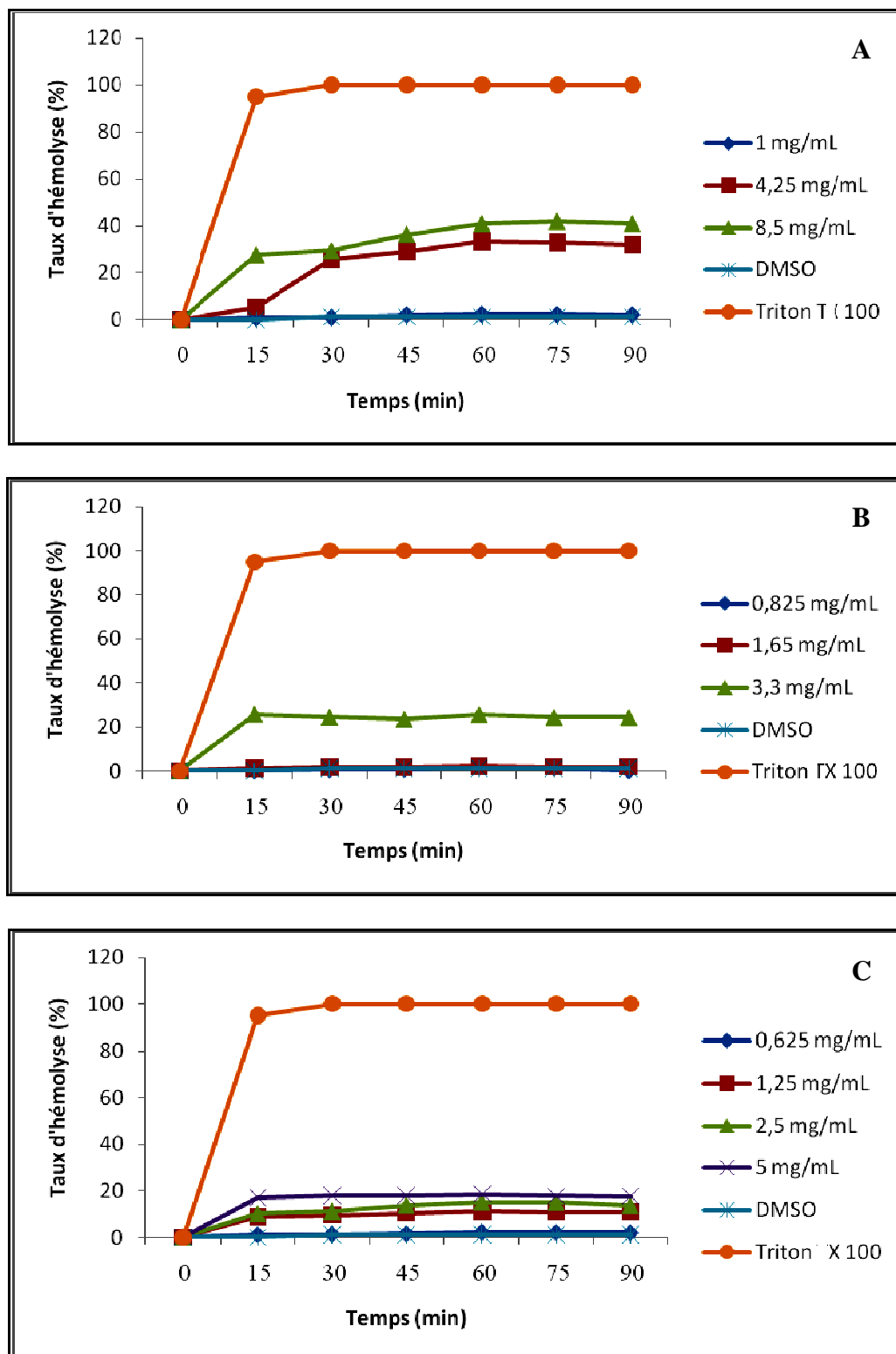


Figure N°21: Effets des extraits des plantes solubilisés dans le DMSO sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les globules rouges humains.

A: Taux d'hémolyse induit par la fraction acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides*.

B: Taux d'hémolyse induit par la fraction acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare*.

C: Taux d'hémolyse induit par la fraction n-butanol des racines d'*Echium vulgare*.

Quatrième partie
Discussion générale

L'ouest Algérien possède une flore riche et peu valorisée. Les espaces qui abritent cette végétation riche et diversifiée ont tendance à régresser. Parmi cette végétation qui se raréfie, on trouve les plantes médicinales traditionnellement utilisées par nos ancêtres à des fins thérapeutiques.

Un des axes de recherche développé par le laboratoire LapSab consiste à valoriser les plantes de la région d'un point de vue de leur potentiel chimique et biologique.

Notre travail est une contribution à l'étude des activités biologiques et de la phytochimie de la poudre des parties aériennes et des racines de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare*.

Ces plantes sont choisies sur la base de témoignages recueillis auprès des populations et des tradithérapeutes des régions de Bechar et de Tlemcen.

Dans la première partie de notre travail, nous avons effectué une étude ethnobotanique qui a montré que la fréquence d'utilisation de ces deux plantes, est très liée au profil des personnes enquêtées. Ainsi, les jeunes, comparés aux personnes âgées, ne connaissent généralement pas les noms ni l'utilité des espèces végétales. Les femmes et les hommes ont un savoir médicinal partagé, avec une légère différence de pourcentage d'utilisation des plantes médicinales entre les deux sexes, avec un avantage allant aux femmes. Ceci peut être expliqué par l'utilisation des plantes médicinales par les femmes dans d'autres domaines que la thérapie et par leur responsabilité en tant que mères. Ce sont elles qui donnent les premiers soins en particulier pour leurs enfants.

Les résultats de cette étude ont montré que *Fredolia aretioides* est très utilisée dans les maladies de l'appareil digestif, comme antidote au poison et hypoglycémiant. Quand à *Echium vulgare* cueillie dans la région de Tlemcen, elle est utilisée principalement dans le traitement des rhumes, des fièvres, de la cicatrisation des plaies et des inflammations. Ceci explique l'utilisation très intense de ces plantes qui sont connues par leurs effets phytothérapeutiques multiples.

La décoction ou l'infusion sont souvent les méthodes de préparation de ces deux plantes médicinales et qui sont les plus utilisées en littérature. Dans de très rares cas, d'autres méthodes de préparation et d'utilisation ont été enregistrées comme des applications directes du matériel végétal en poudre ou sous la forme d'inhalation de vapeurs [(Aburjai et coll., 2007) ; (Al-Qura'n, 2009)].

Dans la deuxième partie de notre travail, les tests phytochimiques effectués sur les extraits aqueux, ethanologique et éther diéthylique des deux plantes, ont révélé une forte présence dans l'extrait aqueux des tanins galliques et des saponosides pour *Fredolia aretioides* et des tanins cathéchiques et des flavonoïdes pour *Echium vulgare*. En revanche, nous assistons à la présence des alcaloïdes, des quinones et des composés réducteurs dans l'extrait aqueux et ethanologique des deux plantes.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux de **Tomas et ses collaborateurs (1986)**, qui ont mis en évidence la présence des flavonoïdes et des naphtoquinones dans les extraits bruts d'*Echium vulgare* ainsi que ceux d'**El-Shazly et coll., (1999)**, qui ont montré que *Echium vulgare* contient des alcaloïdes, essentiellement des alcaloïdes hépatotoxiques de pyrrolizidine.

De même, en **2012 Chaouche** a montré que *Echium pycnanthum*, une autre espèce d'*Echium*, est riche en tanins et en flavonoïdes.

Il est important de noter que les tanins sont des substances reconnues pour leurs propriétés antioxydantes, leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus ce qui pourrait expliquer l'utilisation traditionnelle des feuilles et des racines de la plante *Echium vulgare* dans le traitement des plaies, des furoncles et des abcès (**Bruneton, 2009**).

De plus, les composés phénoliques, représentés majoritairement par les tanins et les flavonoïdes, suscitent actuellement un grand intérêt scientifique, car ils sont considérés comme de puissants antioxydants, antibactériens, antifongiques et antiviraux (**Chen et coll., 2008**). De ce fait, il nous a semblé intéressant de les quantifier dans l'extrait hydro-méthanolique de nos deux plantes.

Les extraits des racines renferment des teneurs en polyphénols plus élevées que les parties aériennes des deux plantes soit 971,05 mg EAG/100g pour *Fredolia aretioides* et 1159 mg EAG/100g pour *Echium vulgare*, contre 741,8 mg EAG/100g dans *Echium vulgare* et $764,54 \pm 0,55$ mg EAG/100g dans *Fredolia aretioides*.

Il est important de noter que ces teneurs restent supérieures à celles rapportées dans la littérature [(Conforti, et coll., 2009) ; (Rached et coll., 2010)] ce qui confirme la richesse de *Fredolia aretioides* en polyphénols. Ceci est probablement dû à la période de récolte. En effet, cette dernière est récoltée au mois de décembre ce qui correspond à la période de floraison contrairement à leurs plantes récoltées au mois de juin.

Les résultats relatifs aux flavonoïdes montrent que les racines contiennent des teneurs nettement supérieures à la partie aérienne d'*Echium vulgare* avec des teneurs respectives de 120 mg EC/g.MS et 33,35 mg EC/g MS.

Nous avons également déterminé *in vitro* l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles, tiges et racines d'*Echium vulgare* et de *Fredolia aretioides* vis-à-vis de neuf souches bactériennes, deux levures et un champignon.

Il ressort de cette étude que les extraits testés présentent des niveaux d'activités variables en fonction des germes étudiés. Les extraits spécifiques des flavonoïdes de la fraction acétate d'éthyle et n-butanol des racines d'*Echium vulgare* présentent des CMI intéressantes vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* respectivement 0,75 ; 0,85 et 0,95 mg/mL. Ces deux extraits se sont montrés les plus actifs de tous les extraits testés.

Quant aux extraits des feuilles et des tiges, seuls les extraits eau/méthanol et n-butanol présentent les meilleures CMI vis-à-vis d'*Escherichia coli* (2 mg/mL) et de *Staphylococcus aureus* (*mrsa*) (0,98 mg/mL).

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par l'équipe de **Kuruuzum (2004)** dont les travaux ont porté sur la même plante et où les CMI dépassent 1mg/mL vis-à-vis d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

L'évaluation de l'activité antibactérienne révèle un bon pouvoir antibactérien des deux fractions des tanins des racines de *Fredolia aretioides* aussi bien envers les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Cowan (1999)** qui a montré que l'activité antibactérienne est due essentiellement aux tanins.

L'évaluation de l'activité antifongique des extraits butanoliques des feuilles+tiges et des racines d'*Echium vulgare* révèle une bonne activité antifongique vis-à-vis d'*Aspergillus flavus* et de *Candida albicans* IP 444. De même, l'extrait acétate d'éthyle des racines de la plante *Fredolia aretioides* a présenté une bonne activité antifongique vis-à-vis des deux souches de *Candida albicans*.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'**Adel et coll., (1996)**, **Boullard (2001)** et **Bidarigh et coll., (2010)** qui ont montré que des extraits alcooliques possèdent une bonne activité antifongique vis-à-vis de plusieurs souches de *Candida albicans*. Cette activité serait due à la présence des saponosides, des alcaloïdes, des composés quinoniques et des tanins (**Bidarigh et coll., 2010**).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, nous pouvons citer l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiens, le blocage de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer et l'inhibition de métabolisme microbien (**Milane, 2004**).

Concernant l'activité antioxydante des deux plantes, les résultats obtenus avec le test de DPPH montrent que l'extrait brut aqueux et la fraction acétate d'éthyle des tanins des feuilles de *Fredolia aretioides* ont les valeurs d'IC₅₀ les plus faibles (0,37 mg/mL et 0,53 mg/mL respectivement) ce qui se traduit par une bonne activité antioxydante. La comparaison de ces valeurs avec celles des antioxydants standards, montrent que les deux extraits sont plus actifs que l'Hydroxytoluène butylé (BHT).

Ces résultats confirment que les différentes parties de *Fredolia aretioides* présentent une aptitude à piéger le radical DPPH et donc un potentiel antioxydant très intéressant.

La deuxième méthode utilisée au cours de notre travail pour évaluer l'activité antioxydante est la technique de réduction du fer FRAP, qui constitue un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes (**Li et coll., 2008**). Les résultats obtenus montrent que la capacité réductrice de l'extrait aqueux et les deux fractions des flavonoïdes des racines d'*Echium vulgare* est la plus élevée à la concentration de 3 mg/mL.

Des travaux antérieurs ont montré qu'il existe une corrélation très significative entre la teneur en polyphénols (polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés) et l'activité de piégeage des radicaux DPPH de l'extrait méthanolique de *Cynara cardunculus* une plante de la famille des astéracées (**Falleh et coll., 2008**).

D'autres études réalisées par **Rached et coll., (2010)** ont montré que parmi les plantes indigènes Algériennes étudiées, l'extrait aqueux des racines de *Fredolia aretioides* présente une bonne activité antioxydante avec un taux élevé en polyphénols.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature et qui montrent qu'*Echium vulgare* et *Fredolia aretioides* possèdent un potentiel antioxydant très important. En effet ces deux plantes sont riches en tanins et polyphénols et donc leurs capacités à piéger les radicaux DPPH sont élevées.

Le pouvoir réducteur des espèces *Echium vulgare* et *Fredolia aretioides* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs des oxydants (**Siddhuraju et Becker, 2007**).

Les conservateurs sont des produits chimiques ajoutés aux produits cosmétiques pour les protéger contre toutes contaminations microbiennes qui se produisent à partir de matières premières, lors de la fabrication ou pendant leurs usages par les consommateurs.

Dans notre travail nous avons examiné l'efficacité de conservation des extraits des racines de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare* dans trois types de formulations de shampoing.

L'incorporation de l'extrait n-butanol ou de l'extrait acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* à une concentration finale de 1% dans nos formulations de shampoing a induit une réduction des inocula. Il est important de noter que les shampoings ainsi préparés sont conservés contre la prolifération des bactéries et des levures et répondent par conséquent, au critère A de la pharmacopée européenne.

Les résultats de l'essai du test challenge de l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* à la concentration de 1% dans les trois formulations de shampoing ont montré une bonne activité antifongique. Cependant la concentration de l'extrait est insuffisante pour réduire l'inoculum des bactéries, tel que requis par le critère A de la Pharmacopée Européenne, mais satisfait tout de même le critère B. Au contraire, comme pour les bactéries et les levures, le shampoing sans conservateur était un bon substrat de croissance.

De nombreuses publications ont rapporté l'effet synergique de l'EDTA avec des conservateurs synthétiques ou naturels (**Petersen, 2002**). C'est pourquoi, nous avons jugé utile d'introduire l'EDTA dans nos formulations de shampoing.

Les résultats que nous avons obtenus ont montré que cet agent chélateur utilisé à une concentration finale de 1%, améliore nettement le pouvoir conservateur des deux extraits testés. La réduction des inocula est estimée à 10^3 au 7^{ème} jour du test sans aucune augmentation au 14^{ème} et 28^{ème} jours pour les bactéries et à 10^2 au 14^{ème} jour du test sans aucune augmentation au 28^{ème} jour pour les levures.

En effet, l'EDTA est un agent chélatant qui bloque le métabolisme et la croissance microbienne. Ainsi, il peut être un ingrédient important dans l'amélioration de l'efficacité des conservateurs pour le contrôle des bactéries Gram négatives qui sont connues pour avoir une meilleure résistance aux agents antimicrobiens. Toutefois, en raison de sa biodégradation lente, l'utilisation de l'EDTA est à l'étude.

Ces résultats obtenus peuvent aider davantage à comprendre et à développer des composés antimicrobiens et antioxydants. Les études de la cytotoxicité confirment l'intérêt biologique probable de ces extraits.

En considérant l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle, l'étude des propriétés d'hémolyse de leurs extraits doit être réalisée, compte tenu de la sensibilité de l'être humain à l'hémolyse induite par certaines substances (**Devecioglu et coll., 2001**). Dans ce sens, la FDA (Food and Drug Administration) recommande d'évaluer les seuils hémolytiques potentiels des composés administrés dans le corps humain ou dans un produit alimentaire ou cosmétique (**FDA, 2005**). L'activité hémolytique des extraits de nos plantes peut être un inconvénient grave pour la poursuite du développement pharmaceutique et cosmétique de ces extraits.

Les résultats obtenus à l'issue de l'évaluation de l'activité hémolytique des extraits ont montré qu'aucune lyse n'est observée pour l'extrait d'acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* à des concentrations finales équivalentes à 0,825 et 1,65 mg/mL et pour l'extrait n-butanol à la concentration 0,625 mg/mL.

Cinquième partie

Conclusion générale

Au terme de ce travail visant à étudier les activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits de *Fredolia aretioides* et d'*Echium vulgare*, et de les utiliser pour la conservation des produits cosmétiques, il ressort que ces plantes possèdent des vertus pouvant justifier leur utilisation en médecine traditionnelle.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence de nombreux composés tels que les tanins, les coumarines, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponosides, les stérols et les triterpènes.

L'analyse quantitative de l'extrait hydro-alcoolique par dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins a révélé des teneurs importantes variant d'une partie de la plante à l'autre.

Par ailleurs, certains extraits possèdent une activité antioxydante importante *in vitro*. Ils ont montré une inhibition très importante du radical DPPH, et un puissant pouvoir réducteur. L'activité antimicrobienne des différents extraits est testée vis-à-vis de neuf souches de références par la méthode de diffusion sur gélose et la détermination des concentrations minimales inhibitrices.

L'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides*, l'extrait n-butanol et acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* sont sélectionnés pour l'évaluation de leur capacité à conserver le produit cosmétique formulé. Dans le cas de la formulation du shampoing conservé avec les extraits n-butanol et acétate d'éthyle de *Echium vulgare*, la population microbienne est progressivement éliminée dès la première semaine (Critère A). De plus, ces deux extraits n'ont induit aucune fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les globules rouges humains jusqu'à 90 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue.

Perspectives :

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de :

- Caractériser et isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques;
- Etudier la cytotoxicité des métabolites afin de confirmer ou d'infirmer les activités attribuées à ces plantes;

- Evaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne *in vitro* sur des cultures cellulaires de cellules isolées de l'organisme pour confirmer les résultats obtenus;
- Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antidiabétique, anticancéreuse et anti-inflammatoire ; Ces activités biologiques répondent aux usages majeurs des plantes selon les résultats de l'enquête ethnobotanique.

Sixième partie
Références bibliographiques

- Aburjai T., Hudaib M., Tayyema R., Yousef M. et Qishawi M. (2007).** Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Ajloun Heights region. *J. Ethnopharmacol*, 110: 294-304.
- Adel M., Jameel A. et Ahmad A. (1996).** Antimicrobial Activity of Extracts of Herbal Plants used in the Traditional Medicine of Bahrain. *Phytotherapy Research*, vol. 10, 251-253.
- Adjanooum J.E, Aké Assi L., Floret J J., Guinko S., Koumaré M., Ahyi A. et Raynal J. (1979).** Contribution aux études ethnobotaniques et florestiques au Mali. *Médecine traditionnelle et Pharmacopée. ACCT*, Paris, 291 P.
- Al-Mohammedi S., Al-Khateeb E. et Al-Shamma A. (2005).** An antimicrobial investigation of *Suaeda baccata* (*Chenopodiaceae*). *AJPS*, vol 2, No.1.
- Al-Qura'n S. (2009).** Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *J. Ethnopharmacol*, 123: 45-50.
- Amara K. (2010).** Contribution à l'étude phytochimique de deux espèces végétales : *Echium vulgare* et *Solenanthes lanatus* de la région de Tlemcen. Mémoire de magister en biologie option biochimie. Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire. Faculté des Sciences. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.
- ANDI. (2013).** Agence Nationale de Développement de l'Investissement.
- Anyinam C. (1995).** Exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. *Social Science and Medicine*, 4, 321-329.
- Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F.Z., Benmehdi H., 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.
- Belkacem N., Djaziri R., El-Haci I.A., Lahfa F. et Boucherit K. (2010).** Antihyperglycemic effect of hydroalcoholic extract from *Punica granatum L.* peels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats and its potent α -amylase inhibitory. *Der Pharma Chemica*, 2(6):416-428.
- Benariba N., Djaziri R., Zerriouh B.H., Boucherit Z., Louchami K., Bellakhdar W., Hupkens E. et Malaisse J. (2012).** Short- and long-term effects of various *Citrullus colocynthis* seed extracts in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(6): 1528-36.

- Benariba N., Djaziri R., Zerriouth B.H., Boucherit K., Louchami K., Sener A et Malaisse W.J. (2009).** Antihyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* seed aqueous extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metab. and Func. Res. on Diabetes*, 2: 71-76.
- Berube-Gagnon J. (2006).** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Thèse de doctorat à l'université de Québec.
- Bertoncelj J., Dobersek U., Jamnik M. et Golob T. (2007).** Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105 : 822-828.
- Bidarigh S., Khoshkholgh Pahlaviani M.R.M., Massiha A., Issazadeh K., Giahi M. et Muradov P.Z.O. (2010).** Analysis of the Phytochemical Content and Anti-Candida Activity of *Borago officinalis*. *Lahijan, Islamic Republic of Iran*.
- Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A et Ziyyat. (2002).** Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab*, 10: 33-50.
- Bock B. (2012).** Tela Botanica . Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France.
- Boughalleb N., Trabelsi L. et Harzallah-Skhiri F. (2009).** Antifungal activity from polar and non-polar extracts of some Chenopodiaceae wild species growing in Tunisia. *Natural product research* ; 23(11):988-97.
- Bouhadjera K., Bendahou M., Tabti B. (2005).** Antimicrobial activity of extracts from algerian *Aristida pungens*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(2): 206-210.
- Boullard B. (2001).** Dictionnaire: Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. *Edition ESTEM*, Paris, 636 p.
- Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie. Technique et documentation. *Lavoisier*, Paris, 278p
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes médicinales. 3^{ème} édition, *Technique et documentation*, Lavoisier, Paris. France.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 4^{ème} édition, *Lavoisier*, Paris, France.
- Calzada F., Yépez-Mulia L et Aguilar A. (2006).** *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 367–370.

- Chaouche T., Atik Bakkara F., Haddouchi F. et Boucherit-Othmani Z. (2012).** Antibacterial activity of different extract of *Echium pycnanthum pomel*. *Journal of chemical and pharmaceutical research*.4(1):216-220.
- Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L. et Zhao J.W. (2008).** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience lettres*, 448 (2) : 175- 179.
- Chiej R. (1984).** The MacDonald encyclopedia of medicinal plants. *MacDonald & Co. Publishers, Ltd.* London, UK. 447 pp.
- Ciulel I. (1982).** Methodology for analysis of vegetable drugs. *Ed I.P.A.C*, Romania. p 67.
- Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI. (2009).** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. CLSI document. M07-A8. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Giancarlo A., Statti D., Uzunov Tubaro A et Menichini F. (2009).** The protective ability of mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol,flavonoid and sterol contents. *Food chemistry*, 112: 587-594.
- Cowan M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582.
- Cox, D. D. (1985).** Common herbaceous flowering plants of the Northeast. *State University of Albany Press*, Albany, NY. 395 pp.
- Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.G. et Pore G.S. (2004).** Concentration of parabens in human breast tumors. *J. Appl. Toxicol.* 24, 5–13.
- Darbyshire S. J., Favreau M. et Murray M. (2000).** Common and scientific names of weeds in Canada. *Agriculture and Agrifood Canada, Ottawa*. Publ. 1397/B. 132 pp.
- Devecioglu C., Katar S., Dogru O. et Tab M.A. (2001).** Henna-induced hemolytic anemia and acute renal failure. *Turk. J. Pediatr*, 43: 65–66.
- Dupont F. et Guignard J.L. (2007).** Abrèges botanique systématique moléculaire. 14ème édition révisée, *Masson*.
- Dweck A.C. (2003).** Natural preservatives. *Cosmetic Toiletries*, 118: 45–50.

- Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A. et Yousefzadi M. (2008).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. *Food chemistry*, 110: 927-931.
- Eigener U. (2013).** Preservatives and their antimicrobial effect in cosmetics. *In: Dermato-Cosmetische Wettenschappen (Course in Dermato-Cosmetic Sciences)*. VUB.
- El Mansouri L., Ennabilli A et Bousta D. (2011).** Socioeconomic interest and valorization of medicinal plants from the Rissani oasis (Morocco). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol 1, pp. 30-45.
- El shazly A., Abdel-All M., Tei A. et Wink M. (1999).** Pyrrolizidine alcaloïdes from *Echium rauwolfii* and *Echium horridum* (borraginaceae). *Z. naturforschung*, 54 :295-300.
- Epsinel-ingroff A. (2007).** Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clin. Microbiol. Newsl*, 29: 97-100.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases (ESCMID). (2003).** Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and infectious*, 9 (8): 1-7.
- European Pharmacopeia (EP). (2005).** Efficacy of antimicrobial preservation.
- Fabri R.L., Nogueira M.S., Braga F.G., Coimbra E.S. et Scio E. (2009).** *Mitracapus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, 100: 428-433.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
- Filho A.A.S., Costa E. S., Cunha W.R., da Silva M.L. A., Nanayakkara N. P. D. et Bastos J.K. (2008).** *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother. Res*, 22, 1307–1310.
- Food and Drug Administration (FDA). (2005).** Guidance for industry - Nonclinical studies for the safety evaluation of pharmaceutical excipients. U.S department of health and human services, pharmacology/toxicology.

- Gomez-Caravaca A. M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A. et Fernandez-Gutierrez A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220-1234.
- Gonzalez-Tejero M.R., Casares-Porcel M., Sanchez-Rojas C.P., Ramiro-Gutierrez J.M. et Molero-Mesa J. (2008).** Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol*, 116: 341-357.
- Hamburger H. et Hostettmann H. (1991).** Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30(12), 3864-3874.
- Iranshahi M., Arfa, P., Ramezani, M., Jaafari, M. R., Sadeghian, H., Bassarello, C., Piacente, S et Pizza, C. (2007).** Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry*, 68, 554–561.
- Joffin J.N. et Leyral G. (2006).** Microbiologie Technique. Tome 1, Dictionnaire des techniques. 4^{ème} Edition A.S.M Washington, 967-971.
- Joad HM., Haloui MH., Rhiouani H., El Hilaly JM et Eddouks M. (2001).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *J. Ethnopharmacol.*, 77: 175-182.
- Kang D-G., Yun C-K . et Lee H-S. (2003).** Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:231-236.
- Karagözler A., Erdag C.S. et Çalmaz Emek Y. (2008).** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111: 400-407.
- Karakas F., Yildirim A et Turker A. (2012).** Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turk J Biol*, 36: 641-652.
- Karumi Y., Onyeyili P.A et Oyugbuaja V.O. (2004).** Identification of active principals of *M. Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med. Sci*, 4 (3): 179 -182.
- Kaszowska M. (2004).** Chemical structure and biosynthesis of lipopolysaccharide important component of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 58, 333–342.

- Khedache Z. (1999).** Etude écologique et fonctionnelle de quatre populations de *Fredolia aretioides* sur le transect Béchar-Béni-Abbès. Contribution à l'analyse architecturale de *Fredolia aretioides* Coss et Moq. Mémoire de magister USTHB, Alger. 122 p.
- Kraft C., Jenett-Siems K., Köhler I., Tofern-Reblin B., Siems K., Bienzle U et Eich, E. (2002).** Antiplasmodial activity of sesquilignans and sesquioneolignans from *Bonamia spectabilis*. *Phytochemistry*, 60, 167–173.
- Kuruuzum U.A., Guvenalp Z., Stroch K., Demirezer L. O. et Zeeck, A. (2004).** Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(9): 833-836.
- Le K., Chiu F. et Ng K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353-363.
- Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J. et Lee C.Y. (2003).** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51: 7292-7295.
- Leigh E.G. (1999).** Tropical Forest Ecology. A View from Barro Colorado Island. *Oxford University Press*, New-York.
- Lemini C., Jaimez R., Avila M.E., Franco Y., Larrea F. et Lemus A.E. (2003).** In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicol. Ind. Health* 2–6, 69–79.
- Li H-B. , Wong C-C., Cheng K-W et Feng C. (2008).** Antioxidant properties in vitro and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*, 41(3), 385–390.
- Lin Z. B., Wang P., Ruan Y et Guo Z. X. (1980).** Anti-inflammatory effect of β,β , dimethyl-acryshikonin. *Acta Pharmacol, Sin*, 1: 60–63.
- Liu R. (2004).** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention : Mechanism of action. *journal of nutritional*, 134: 3479-3485
- Marie-Victorin F. É. C. (1995).** Flora Laurentienne. 3^{ème} ed. Presses de l'université de Montréal, Montréal, QC. 925 pp.
- Marxen K., Vanselow K.H, Lippermeir S., Hintze R., Ruser A. et Hansen U.P. (2007).** Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal Species by Linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, 7 : 2080-2095.

- Masoko P., Picard J. et Eloff J.N. (2005).** Antifungal activities of six South African Terminalia species (*Combretaceae*). *J. Ethnopharmacol.* 99: 301-308.
- Matkowski A. et Piotrowska P. (2006).** Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77: 346-353.
- Mattocks, A. R. (1986).** Chemistry and toxicity of the pyrrolizidine alkaloids. *Academic Press, Orlando, FL.* 393 pp.
- Merghache D., Boucherit-Atmani Z., Boucherit K. (2012).** Évaluation de l'activité antifongique de différents extraits de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*). *Aromathérapie expérimentale, Springer-Verlag France*, 10:215-221.
- Merghem R. (1995).** Les facteurs anti-nutritionnels (FAN) phénoliques de *Pisum sativum*. L et de *Vicia faba* (Légumineuse): aspects structuraux génétiques et phénoliques. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon I, France.
- Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en Sciences Domaine : Pharmacochimie, Université Louis Pasteur Strasbourg.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R. et Van Beek T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, 85: 231-237.
- Moali A., Kaabeche M., et Benkheira A. (2011).** Guide Habitats, Flore et Faune des zones arides et sahariennes d'Algérie. Edition Altitude Communication.
- Mole S et Waterman P.G. (1987).** A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tannins. *Oecologia*, 72: 148-156.
- Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science of Technology*, (26): 211-219.
- Murphy G. L., Whitworth L. C., Clinkenbeard K. D. et Clinkenbeard P. A. (1995).** Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 63(8): 3209-3212.
- Ncube N.S, Afolayan A.J et Okoh A.I. (2008).** Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7 pp. 1797–1806.

- Oloyede O.I. (2005).** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*, 4 : 379-381.
- Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of nutrition*, 44 : 307-315.
- Papageorgiou V. P. (1980).** Naturally occurring isohexenyl naphthazarin pigments : a new class of drugs. *Planta Medica*, 38:193–203.
- Petersen W. (2002).** Antimicrobial ingredients for self-preserving cosmetics. *Eur. Cosmet*, 2: 28–36.
- Prakash, D., Upadhyay, G., Brahma, N., Singh, H.B. (2007).** Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry*, 104: 783-790.
- Price M.L., Vanscoyoc S et Butler G. (1978).** Evaluation of vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *I- Agric. Food. Chem*, 26: 1210-1218.
- Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., Sauvain, M., Valentin, A et Moulis, C. (2007).** Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*, 68: 1312 – 1320.
- Quézel P. et Santa S. (1962-1963)** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, 2ème vol. 1170p.
- Rached W., Benamar H., Bennaceur M et Marouf A. (2010).** Screening of the Antioxidant Potential of Some Algerian Indigenous Plants. *Journal of Biological Sciences*, 10: 316-324.
- Rahmoun N M, Boucherit-Atmani Z, Benabdallah M, Kebir Boucherit, Villemin D et Choukchou-Braham N. (2013).** Antimicrobial activities of the henna extract and some synthetic naphthoquinones derivatives. *American Journal of Medical and Biological Research*, (1), 1, 16-22.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. et Saura-Calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Sci Food. Agr.* 76 : 270-276.
- Scherer R. et Goboy H.T., (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112: 654-658.
- Schofield P., Mbugua D M., Pell A N. (2001).** Analysis of condensed tannins: A review *Animal Feed Sciences and Technical*, 91: 21 - 40.
- Sezik E. (1997).** Parasiticidal, antifungal and antibacterial activities of *Onosma griffithii* Vatke. *African Journal of Biotechnology*. ISSN: 1684-5315.

- Sherbanivs'kii L. P. (1971).** Presence of shikonin in some species of the family Boraginaceae and its effect on lactic acid bacteria. *Ukr. Bot. Zh*, 28: 504–508.
- Siddhuraju P. et Becker K. (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10-1.
- Singh K.P., Abishek Kumar Dwevedi et Gunjan Dhakre. (2011).** Evaluation of antibacterial activities OF *Chenopodium album* l. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*. ISSN 0976-4550.
- Soliman M. F.M. et Ibrahim M. M. (2005).** Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study. *Acta Tropica*, 93, 1 – 9.
- Swain T et Hillis W.E. (1959).** The phenolics constituents of *prunus domestica* -I- the quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal of the science of food and agriculture*, 10. p: 13.
- Swain T. (1979).** Tannins and lignins, pp.657-682. In (G.A. Rosenthal and D.H. Janzen, Eds.) Herbivores. *Academic Press, New York*.
- Tabata M., Mizukami H., Naoe S. et Konoshima M. (1975).** Antimicrobial activity of *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Yakugaaku Zasshi*, 95: 1376–1379.
- Tanaka S. T., Mayumi T., Minoru T. et Tabata M. (1986).** A comparative study of anti-inflammatory activities of the enantiomers shikonin and alkannin. *J. Nat. Prod.* 49: 466–469.
- Tomas-Baberan F.A., Tomas-Lorente F., Ferreres F. et Garcia-Viguera C. (1986).** Flavonoids biochemical markers of the plant origin of bee pollen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47:337-340.
- Tundis R., Menichini F., Conforti F., Loizzo M., Bonesi M., Statti G. et Menichini F. (2009).** A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition an medicinal Chemistry*, Vol. 24, No. 3 , Pages 818-824.
- 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 systemical systematic and ecology*, 28: 991-1007.
- Vermerris W. et Nicholson R. (2006).** Phenolic compound biochemistry. *Springer* , Dordrecht. ISBN:101-4020-5163-8.

Wolfgang Siegert Schülke et Mayer GmbH Robert-Koch-Straße (2012). ISO 11930 – A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation, Norderstedt Germany.

Wollgast J. et Anklam E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33: 423 – 447.

Zhang M., Hongfei J., Aiti A., Haizhou L., Chew L.T et Sheng L. (2008). A Tree Sequence Alignment based Tree-to-Tree Translation Model. *ACLHLT-08*. 559-567.

Sites d'internet:

AROMAZONE® : fiches produits, ateliers, recettes [EN LIGNE] Consulté sur http://www.aroma-zone.com/aroma/accueil_fra.asp depuis janvier 2013.

OMS, 2012, Rapport sur la Santé du Monde, <http://www.who.int/whr/2012/fr/>

Piquemal G., (Février 2013). Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php?option=com_content&view=article&id=166:les-flavonoides&catid=41:phyto-aromatherapie&Itemid=215.

Annexes

Annexes N°01: Questionnaire

- Identification:

N° :.....

Nom:Prénom :.....Sexe:.....

Age:..... Niveau de scolarisation :.....Wilaya:,,,,,,,,,.....

- Quel est le nom local d'*Echium vulgare* ou de *Fredolia aretioides*?

- Utilise-t-on cette plante pour se soigner?

- Quelles sont les maladies soignées par cette plante?

- Quelles parties (feuilles, tiges, racines, fleurs) de cette plante sont-elles utilisées dans le traitement des maladies?

- Comment prépare-t-on cette plante?

- Utilise-t-on cette plante à l'état frais ou sec?

- Quelle quantité de plante doit-on préparer et dans quelle quantité d'eau. S'agit-il d'une décoction, d'une infusion, d'une macération ou autres?

Annexes N°02: Réactifs de caractérisation

- Alcaloïdes

a) Réactif de Mayer

Dissoudre 1,358 g de HgCl_2 dans 60 mL d'eau. Dissoudre 5 g de KI dans 10 mL d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 mL d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un trouble ou un précipité blanc.

b) Réactif de Wagner

Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g d' I_2 dans 75 mL d'eau. Ajuster le volume total à 100 mL d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

- Stéroïdes, hétérosides stéroïdiques et triterpéniques

• Réaction de Liebermann Burchardt

Mélanger 5 mL de solution à tester avec 5 mL d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposer 30 minutes à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert. D'autre part, cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement des colorations verte - bleue et verte - violette.

- Quinones

• Réaction de Bornträger

En milieu alcalin aqueux, ces composés donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangée - rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

- Composés réducteurs

- a) La liqueur de *Fehling* est un mélange de deux solutions:

Fehling A: dissoudre 3,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 50 mL d'eau distillée.

Fehling B: dissoudre 6,5 g de NaOH, 17,3 g de tartrate de sodium et potassium dans 35 mL d'eau distillée puis compléter le volume à 50 mL. Les composés réducteurs donnent avec le réactif de Fehling un précipité rouge brique.

Annexe N°03: Milieux de culture

- **Bouillon Nutritif (Fluka, BioChemika)**

Formule en g/L

Extrait de viande	3,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,2 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 13g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Gélose Nutritive (GN, Fluka, BioChemika)**

Formule en g/L

Extrait de viande de boeuf	1,0
Extrait de levure	2,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,2 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 28 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Gélose Mueller Hinton (Fluka BioChemika)**

Formule en g/L

Infusion de viande de bœuf	4,0
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 38g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Bouillon Mueller Hinton (Fluka BioChemika)**

Formule en g/L

Hydrolysate de caséine	17,5
Infusion de viande de bœuf	4,0
Amidon	1,5
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Bouillon Sabouraud**

Formule en g/L

Peptone pepsique	10
Glucose	20
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 30 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Gélose Sabouraud**

Formule en g/L

Peptone pepsique	10
Glucose	20
Agar	15
Eau Distillée	qsp 1L

pH=5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 45 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Notre travail consiste dans un premier temps à réaliser une étude phytochimique et à extraire des principes actifs à partir de plantes locales connues par leurs activités antibactériennes, antifongiques et antioxydantes (enquête ethnobotanique). Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'efficacité de nos extraits dans la conservation du produit cosmétique formulé.

L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence l'existence de différentes familles de composés chimiques dans les racines, les feuilles et les tiges des deux plantes étudiées. Le dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins s'est révélé variable entre les différentes parties des plantes.

Les extractions des extraits bruts, des flavonoïdes et des tanins à partir des deux parties des plantes ont été effectuées par des méthodes d'extractions par des solvants spécifiques pour chaque extrait. Les rendements sont plus importants dans les racines par rapport aux feuilles-tiges pour la plante saharienne et le contraire a été enregistré pour la plante cueillie localement.

L'étude de l'activité antimicrobienne de ces extraits sur des souches bactériennes, des levures et de moisissure en utilisant la technique de diffusion sur gélose et la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI, montre que le pouvoir antimicrobien des fractions de flavonoïdes et des tanins des racines, est plus important comparé à celui des autres extraits.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par deux méthodes ; la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical libre DPPH. Les extraits contenant les composés phénoliques possèdent un bon pouvoir antioxydant.

Notre présente étude a examiné l'efficacité de conservation de certains extraits de plantes dans trois types de formulations de shampoing. Il a été démontré une importante activité des deux extraits de flavonoïdes des racines d'*Echium vulgare* à une concentration de 1% dans la formulation de shampoing sur la réduction des inoculum microbiens. D'une part, le shampoing a montré une bonne efficacité de préservation contre les bactéries très persistantes ou des contaminants typiques de l'eau, qui pourraient très facilement contaminer le shampoing, et d'autre part, ces extraits seuls ou en combinaison avec l'EDTA ont satisfait le critère A de la pharmacopée européenne. L'évaluation de la cytotoxicité des extraits les plus actifs a montré que l'extrait n-butanol et acétate d'éthyle des racines d'*Echium vulgare* qui présentent une activité antimicrobienne très intéressante ne provoque aucune lyse vis-à-vis des globules rouges humains.

Mots clés : Extraits végétaux, Métabolites secondaire, Activité antibactérienne, Activité antifongique, Activité antioxydante, Shampoing, Conservateurs, toxicité.

Abstract

Our works initially consists in making to a phytochemical study and extract the active ingredients from local plants known by their antibacterial, antifungal and antioxidant activities (ethnobotanical investigation). In a second step, we evaluated the effectiveness of our extracts in the conservation of the cosmetic product formulated.

Phytochemical studies highlight the existence of different families of chemical compounds in the roots, leaves and stems of two studied plants. The determination of total phenols, tannins and flavonoids proved variable between the different parts of the plants.

Extractions of crude extracts, flavonoids and tannins from both parts of the plants were performed by methods of extractions with specific solvents for each extract. Yields are more important in roots compared to leaves + stems for Saharan plant and the opposite was recorded for locally harvested plant.

The study of the antimicrobial activity of these extracts on bacterial strains, yeasts and mold, shows that the antimicrobial capacity of the flavonoids and tannins fractions of the root is more important compared with other extracts. The antioxidant activity of different extracts was evaluated by two methods, the reduction of iron (FRAP) and trapping of free radical DPPH. Extracts containing phenolic compounds have a good antioxidant capacity.

Our present study examined the effectiveness of conservation of some plant extracts in three types of shampoo formulations. It has been demonstrated an important activity of both flavonoids extracts of *Echium vulgare* roots in a concentration of 1% in the shampoo formulation on the reduction of the microbial inoculum. First, the shampoo showed good preservative efficacy against bacteria or very persistent typical contaminants of water that could easily contaminate the shampoo, and secondly, these extracts alone or in combination with EDTA satisfied the criterion A of the European Pharmacopoeia.

The evaluation of the cytotoxicity of the most active extracts showed that the extract n-butanol and ethyl acetate of the roots of *Echium vulgare* which present a very interesting antimicrobial activity don't cause any lysis of human red globules.

Keywords: Plant extracts, Secondary metabolites, antibacterial activity, antifungal activity, antioxidant activity, shampoo, Preservative, toxicity.

المخلص

تناولنا عددا من الإشكاليات المطروحة في خطوتين :

الأولى : تحقيق تجارب كيميائية نباتية و استخراج مركبات من النباتات المحلية المعروفة بنشاط المضاد للجراثيم، المضاد للفطريات و الأنشطة المضادة للأكسدة (بحت الإثنوبوتانيك) . في الخطوة الثانية ، قمنا بتقييم فعالية المستخلصات لدينا في الحفاظ على منتجات التجميل، لقد كشفت التجارب الكيميائية النباتية على عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية في الجذور والأوراق والسيقان في كلتا جزئ النبتتين. تحديد مجموع الفينولات والعفص والفلافونيدات أعطى نتائج مختلفة بين مختلف الأجزاء المدروسة للنبتتين. اجريت عملية استخراج المستخلصات الخام ، الفلافونويد و العفص من كلتا جزئ النباتات باستعمال طرق استخراج و مذيبات محددة لكل عينة.

مرودود المستخلصات كان أعلى في الجذور مقارنة بالأوراق للنبتة الصحراوية و السيقان و سجلنا العكس بالنسبة للنبتة المحلية. تظهر دراسة نشاط هذه المقتطفات على السلالات البكتيرية والخمائر والعفن أن فلافونيدات و عفص الجذور لهم قدرة مضادة للميكروبات ، أكثر أهمية مقارنة بما كان عليه في العينات الأخرى.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات بطريقة إرجاع الحديد (FRAP) و تثبيط الجذور الحرة DPPH . المقتطفات التي تحتوي على المركبات الفينولية لها قدرة مضادة للأكسدة جد عالية.

دراسنا قامت بفحص فعالية الحفاظ بعض المستخلصات النباتية في ثلاثة أنواع من تركيبات الشامبو. و قد أبدت مستخلصات الفلافونويد لجذور نبتة *Echium vulgare* بتركيز 1% نشاطا هاما في صياغة الشامبو في الحد من الميكروبات. من ناحية، الشامبو قد أظهر فعالية جيدةحافظة ضد البكتيريا شديدة الثبات أو الملوثات النموذجية للمياه، التي يمكن بسهولة أن تلوث الشامبو، من ناحية أخرى، هذه المستخلصات وحدها او مزوجة مع الـEDTA تلبى احتياجات المعيار A للأدوية الأوروبية.

الكلمات وأظهر تقييم السمية الخلوية للمستخلصات الأكثر نشاطا أن مستخلص ن بيوتانول وإيثيل لجذور *Echium vulgare* التي لديها نشاط مضادات الميكروبات مثيرة للاهتمام انه لا يسبب تحلل كرات الدم الحمراء البشر.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات النباتية ، المركبات الثانوية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، النشاط المضاد للفطريات ، النشاط المضاد للأكسدة ، الشامبو ، المواد الحافظة. التسمم