

## ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

### Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du  
**Diplôme de Docteur Vétérinaire**

CONTRIBUTION A LA MISE EN EVIDENCE

D'UN BIOMARQUEUR DE LA CICATRISATION CUTANEE :

L'HYDROXYPROLINE

ET L'EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE D'EXTRAIT

METHANOLIQUE DE LA RACINE D'UNE PLANTE MEDICINALE :

LA CENTAUREA AFRICANA

Présenté par : **CHEHEB LOTFI**

**DOUADI MALLAK EL HOUDA**

**ALEM WISSANE**

Soutenu le **02 JUIN 2016**

**Devant le jury composé de :**

- |                  |                  |      |             |
|------------------|------------------|------|-------------|
| - Président :    | Mme L. AINOUZ    | MAA  | E NSV Alger |
| - Promoteur :    | Mr M. ZAOUANI    | MAA  | ENSV Alger  |
| - Co-promoteur : | Mme K .OUANDJELI | CUCC | LNCPP       |
| - Examineur :    | Mme B. DJELLOUT  | MAA  | ENSV Alger  |
| - Examineur :    | Mme C. BENMOHAND | MAA  | ENSV Alger  |

# **REMERCIEMENTS**

**Nous tenons à remercier toutes les personnes sans qui, ce travail n'aurait pas pu être réalisé :**

**Nos remerciements s'adressent en premier à notre encadreur pour ses orientations et ses conseils constructifs et constants :**

**Monsieur Mohamed ZAOUANI**

**Nos remerciements vont également à ceux qui nous ont accueillis dans leur Institution, en l'occurrence le Service pharmaco-Toxico du Laboratoire National du Contrôle des Produits Pharmaceutiques et qui nous ont suivi et orienté lors du stage pratique :**

**Monsieur H. CHADER et Melle K. OUANDJELI**

**Nous adressons, aussi, nos vifs remerciements aux Membres du Jury pour l'attention qu'ils ont accordé à notre travail et à son évaluation, à leur tête leur présidente Madame L. AINOUZ**

**Enfin nos remerciements s'adressent à tous nos Examineurs et à tous nos Enseignants qui n'ont pas hésité à nous dispenser une Formation de qualité depuis le premier cours de notre première année au sein de notre chère Ecole ;  
l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire**

**A Tous MERCI**

# *Dédicaces*

## **A mes très chers parents,**

*Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre amour, à votre patience et vos innombrables sacrifices.*

*Je ferai de mon mieux pour rester un sujet de fierté à vos yeux avec l'espoir de ne jamais vous décevoir.*

*En témoignage, je vous dédie ce travail qui clôture mon diplôme de Docteur Vétérinaire.*

*Que Dieu vous prête bonheur et longue vie.*

## **A mon frère bien aimé,**

*Tu occupes une place particulière dans mon cœur.*

*Je te dédie ce travail en te souhaitant un avenir radieux, plein de bonheur et de succès.*

## **A tous mes amis,**

*Pour votre sympathie, votre humeur, votre humour et votre solidarité envers moi.*

*Veillez accepter mes remerciements et mon amitié sincère.*

## **A mes oncles et tantes ainsi qu'à leurs enfants,**

*Pour votre chaleureux accueil, votre soutien et réconfort.*

*Je vous exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance.*

## **A tous nos enseignants,**

*Pour leur engagement indéfectible à nous offrir le meilleur des enseignements durant toutes ces années.*

*Et à tous ceux qui nous ont assistés de loin ou de près, dans la réalisation et le bon déroulement de ce travail*

*Veillez trouver ici l'expression de ma profonde considération et le sentiment de mon profond respect.*

*LOTFI...*

# DEDICACES

**Je vous dédie ce travail, fruit de l'effort de l'École de la Vie et pas seulement l'École Nationale Supérieure Vétérinaire, dernier maillon de la chaîne d'apprentissage que j'ai commencé à percevoir dès que j'ai ouvert les yeux entre vos bras, vous les Deux Personnes les plus chers que DIEU Soubhanou m'a Donné.**

**Toi Maman Yamina et Toi Papa faouzi**

**A toi frère : frère aîné et frère unique :**

**Chakib Areslane**

**A toi l'Homme de ma Vie :**

**Imed**

**A toi qui m'as accompagnée ces cinq dernières années, ma Tante :**

**Nacira**

**A Celles qui n'ont pas cessé de prier DIEU pour me guider dans tous mes pas, mes deux Grand-mères :**

**Sadja Nefdja et Sadja Zehaira**

**A tous les Membres de ma Famille**

**MALLAK...**

# *DÉDICACES*

A la personne dont tous les mots de l'univers sont incapables d'exprimer  
mon amour et mon affection pour elle, à l'être le plus cher à ma douce mère.

Mère si tu savais combien je t'aime.

A mon cher père qui a payé des années d'amour  
et de sacrifices le prix de ma façon de penser.

Père merci d'avoir fait de moi une femme.

A ma grand-mère Taous qui me chérit et pour laquelle je souhaite une meilleure santé.

A mes chers frères Djaâfar,

Rabah et Rahim et mes sœurs Akila, Linda et Djouhra.

A mes oncles Amar et El hacen, et leurs enfants.

A mes chers amis Mallak,

Nesrine, Fahima et Lotfi.

A tous ceux qui de loin ou de prêt ont contribué à la réalisation de ce travail.

WISSEM ...

# Table des matières

## LISTE DES ABREVIATIONS

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

Introduction Générale.....	1
<b>I.1 Les plantes médicinales :.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2 Phytothérapie :.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.1 Médicament à base de plantes .....</b>	<b>6</b>
<b>I.2.2 Préparations à base de drogue(s) végétale(s).....</b>	<b>7</b>
<b>I.3 Plante médicinale.....</b>	<b>7</b>
<b>I.3.1 Totum.....</b>	<b>8</b>
<b>I.3.2 Drogue.....</b>	<b>9</b>
<b>I.3.3 Principe actif : .....</b>	<b>10</b>
<b>I.3.4 Matières premières :.....</b>	<b>10</b>
<b>I.3.5 Récolte et conservation des plantes médicinales :.....</b>	<b>10</b>
<b>I.3.6 Opérations d'extraction : .....</b>	<b>10</b>
<b>I.3.6.2 Extraction par décoction chinoise :.....</b>	<b>11</b>
<b>I.3.7 Extraits de plantes : .....</b>	<b>12</b>
<b>I.4 Modes de préparation en phytothérapie.....</b>	<b>13</b>
<b>I.4.1 Infusions.....</b>	<b>13</b>
<b>I.4.2 Infusion froide.....</b>	<b>14</b>
<b>I.4.3 Infusion chaude et froide.....</b>	<b>14</b>
<b>I.4.4 Décoction .....</b>	<b>15</b>
<b>I.4.5 Macération.....</b>	<b>15</b>
<b>I.5 Formes d'utilisation : .....</b>	<b>16</b>
<b>I.5.1 Usage interne :.....</b>	<b>16</b>
<b>I.5.2 Usage externe .....</b>	<b>16</b>
<b>I.6 Présentation de la plante <i>Centaurea africana</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>I.6.1 Présentation de la famille des Asteraceae .....</b>	<b>17</b>
<b>I.6.2 Présentation du genre <i>Centaurea</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>I.6.3 Répartition géographique .....</b>	<b>18</b>
<b>I.6.4 Les métabolites secondaires chez le genre <i>centaurea</i>.....</b>	<b>19</b>

<b>I.7 La peau et la cicatrisation .....</b>	<b>20</b>
<b>I.7.1 Structure de la peau.....</b>	<b>20</b>
<b>I.7.2 Jonction dermo-épidermique.....</b>	<b>21</b>
<b>I.7.3 Les fonctions de la peau .....</b>	<b>21</b>
<b>I.8 La cicatrisation.....</b>	<b>22</b>
<b>I.8.1 Les différentes phases de la cicatrisation.....</b>	<b>22</b>
<b>I.9 QU'EST-CE QUE L' HYDROXYPROLINE ? .....</b>	<b>27</b>
<b>I.10 MECANISMES D'ACTION / PREUVES D'EFFICACITE .....</b>	<b>28</b>
<b>II MATERIEL .....</b>	<b>30</b>
<b>II.1 Matériel non biologique .....</b>	<b>30</b>
<b>II.2 Matériel biologique .....</b>	<b>30</b>
<b>a- Matériel végétal .....</b>	<b>30</b>
<b>b- Animaux expérimentaux.....</b>	<b>30</b>
<b>II.3 METHODES.....</b>	<b>30</b>
<b>II.3.1 Préparations d'extrait méthanolique de <i>Centaurea africana</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>II.3.2 ETUDE DE L'ACTIVITE CICATRISANTE .....</b>	<b>32</b>
<b>II.3.3 Dosage de l'hydroxyproline.....</b>	<b>35</b>
<b>II.4 Evaluation de la cytotoxicité in vitro de l'extrait méthanolique de la plante .....</b>	<b>38</b>
<b>II.4.1 Chronologie expérimentale.....</b>	<b>38</b>
<b>III. Résultats et discussions de l'activité cicatrisante .....</b>	<b>41</b>
<b>III.1 Evaluation de l'activité cicatrisante .....</b>	<b>41</b>
<b>III.1.1. Évolution des superficies des plaies : .....</b>	<b>41</b>
<b>III.2 Résultats du dosage de l'hydroxyproline : .....</b>	<b>44</b>
<b>III.3 Résultats de l'étude de la Cytotoxicité :.....</b>	<b>45</b>
<b>IV CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>47</b>
<b>V REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>49</b>
<b>VI ANNEXES .....</b>	<b>56</b>

**LISTE DES ABREVIATIONS:**

<b>Abréviations</b>	Significations
<b>DMEM</b>	Dulbecco's type culture collection
<b>SVF</b>	serum de veau fœtal
<b>IMAO</b>	l'inhibiteur de monoamine oxydase
<b>bFGF</b>	facteur de croissance fibroblastique
<b>EGF</b>	epidermal growth factor
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>1'IGF1</b>	L'insuline growth factor
<b>TGFβ</b>	Transforming growth factorβ
<b>TNFα</b>	Tumor necrosis factorα
<b>TIMP</b>	Tissue inhibitors of mettaloproteinases
<b>M</b>	mètre
<b>C°</b>	degré Celsius
<b>g</b>	gramme
<b>ml</b>	millilitre
<b>mBar</b>	millibars
<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>mg</b>	milligramme
<b>min</b>	minute
<b>DMSO</b>	Dimethylsulphoxide
<b>mm</b>	millimètre
<b>XVIIIe</b>	18ème siècle
<b>cm</b>	centimètre

## **LISTE DES FIGURES :**

<b>Figure 1</b> : Photo de <i>Centaurea africana</i> .....	<b>19</b>
<b>Figure 2</b> : Structure de la peau.....	<b>23</b>
<b>Figure 3</b> : Etapes du processus d'extraction hydro-alcoolique (photos personnelles).....	<b>35</b>
<b>Figure 4</b> : Provocation des plaies par excision plus application des pommades (photos personnelles).....	<b>34</b>
<b>Figure 5</b> : Protocole de dosage de l'hydroxyproline.....	<b>37</b>
<b>Figure 6</b> : Démarche expérimental suivi pour évaluer la cytotoxicité in vitro de l'extrait méthanolique de la plante « <i>Centaurea Africana</i> » sur les cellules fibroblastiques ATCC.....	<b>40</b>
<b>Figure 7</b> : Histogramme représentant les pourcentages de réduction des superficies des plaies de J <sub>0</sub> à J <sub>16</sub> , chez les rats témoins, traités par la pommade à base d'extrait méthanolique à deux concentrations (5 et 10 %) et le produit de référence Cycatril <sup>(R)</sup> .....	<b>42</b>
<b>Figure 8</b> : Evaluation de la teneur en hydroxyproline dans les échantillons des cicatrices chez les lots des rats traités par l'extrait formulé de <i>Centaurea africana</i> à 5% et 10% et par le produit de référence (Cycatril®).....	<b>44</b>
<b>Figure 9</b> : La courbe des pourcentages de mortalités en fonction de la concentration du produit à l'essai (extrait méthanolique).....	<b>45</b>

**LISTE DES TABLEAUX :**

**Tableau 1 :** Modèles des plaies expérimentales.....27

**Tableau 2 :** Répartition des rats selon les lots.....32

**Tableau 3 :** Evolution macroscopique des surfaces des plaies chez les rats traités par la pommade formulée à 10%,5%, chez les rats traitées par Cycatril® ainsi que chez les témoins durant 18j.....43

**Tableau 4 :** Classification de la cytotoxicité en fonction du pourcentage de mortalité observé à la dilution 50%.....46

# Introduction

# Introduction Générale

---

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes.

De l'aspirine au Taxol, 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 seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimiques et pharmacologiques, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents [1].

Parmi les milliers de plantes médicinales recensées à ce jour, ceux de la famille des astéracées représentent l'une des plus grandes familles des angiospermes, avec environ 1100 genres et 25000 espèces sont présentes dans pratiquement toutes les régions du globe.

Le genre *Centaurea* fait partie de la famille des astéracées, compte environ 700 espèces. En Algérie, il est représenté par 45 espèces dont 7 au Sud du pays [2,3]. Les espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités stimulantes, toniques [4,5], antidiabétiques [6,7], diurétiques [8] et antirhumatismales [9].

Des tests de recherche d'activité biologique des extraits chloroformes des espèces algériennes *C. musimomum*, *C. furfuracea*, *C. granata* et *C. maroccana* ont montré des activités cytotoxiques et antiparasitaires [10]. Les études chimiques des espèces du genre *Centaurea*, ont montré leur richesse en sesquiterpènes [11-16], triterpènes [17], stéroïdes [18], alcaloïdes [19], lactones sesquiterpènes [20,21] et en composés phénoliques notamment les flavonoïdes [22-24].

Ces derniers sont largement présents dans le règne végétal et représentent une catégorie très importante aux propriétés biologiques multiples.

Ces composés sont répartis dans tous les organes des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois....). Faisant objet de nombreuses études pendant ces

dernières décennies, le nombre des flavonoïdes connus a varié de 800 en 1976 [25] à 4000 au début des années 90 [26], pour atteindre 6500 ces dernières années [27]. Dans ce contexte et vu l'importance de l'utilisation des espèces du genre *Centaurea* en médecine traditionnelle et les résultats significatifs des tests biologiques obtenus, Le choix de notre plante est une espèce endémique pour l'Afrique du Nord [27] il s'agit de l'espèce *Centaurea africana* cette espèce a fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques mais peu d'études sur ces propriétés biologiques.

Notre étude est présentée en deux parties :

- La première partie bibliographique
- La seconde partie est consacrée à l'étude expérimentale, qui a porté essentiellement sur l'extraction hydro alcoolique, activité cicatrisante sur modèle par excision et étude de la cytotoxicité de l'extrait.

Les matériels utilisés et les méthodes adoptées lors de cette étude expérimentale y seront détaillées et les résultats obtenus présentés et discutés.

# **Partie bibliographique**

### **I.1 Les plantes médicinales :**

Les végétaux sont des organismes autotrophes, c'est-à-dire qu'ils produisent leur propre matière organique (comme les glucides, les lipides et donc les principes actifs) à partir de sels minéraux puisés dans le sol et de dioxyde de carbone, assimilé par les feuilles grâce à l'énergie solaire : c'est le mécanisme de photosynthèse.

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine ou animale. Elle est utilisée de différentes manières (décoction, macération, infusion...) et une ou plusieurs de ses parties peuvent être utilisées (racine, rhizome, feuilles, fleurs...).

On utilise pour nommer les plantes médicinales et pour éviter toute confusion, une dénomination internationale, comprenant deux noms latins suivis du nom de l'auteur qui a décrit en premier la plante (exemple : Ayapana décrite sous le nom de Ayapana Triplinervis (vahl) R.M KING et H. ROB.).

Toutes les données concernant les plantes médicinales sont regroupées dans un ouvrage officiel national ou international que l'on appelle pharmacopée (anciennement nommé CODEX). Y est décrit le mode de préparation, la composition, l'action des médicaments.

### **I.2 Phytothérapie :**

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : phuton et therapeia qui signifient respectivement "plante" et "traitement". La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes [28], qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe.

Actuellement, la phytothérapie est reconnue partout par les académies de médecine de certains pays [29]. Il est important de ne pas confondre cette discipline avec la phytopharmacie qui, quant à elle, désigne l'ensemble des substances utilisées pour traiter les plantes, à savoir les pesticides, fongicides, herbicides, ou encore insecticides [30]... On distingue deux types de phytothérapies.

Tout d'abord la phytothérapie traditionnelle. C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et

elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement [30]. Les indications qui s'y rapportent sont de première intention, propres au conseil pharmaceutique [31]. Elles concernent notamment les pathologies saisonnières depuis les troubles psychosomatiques légers jusqu'aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques. On peut citer pour exemple les graines de Chardonmarie (*Silybum marianum* L.) qui sont utilisées pour traiter les troubles fonctionnels digestifs attribués à une origine hépatique. En effet cette drogue se distingue par ses propriétés hépato protectrice et régénératrice de la cellule hépatique associées à une action cholérétique. Pline l'Ancien lui-même recommandait de prendre le jus de la plante mélangé à du miel pour "éliminer les excès de bile" [32].

La seconde forme existante est la phytothérapie clinique. C'est une médecine de terrain dans laquelle le malade passe avant la maladie. Une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet [33]. Son mode d'action est basé sur un traitement à long terme agissant sur le système neuro-végétatif. Cette fois-ci les indications sont liées à une thérapeutique de complémentarité. Elles viennent compléter ou renforcer l'efficacité d'un traitement allopathique classique pour des pathologies aiguës d'importance modérée (infection grippale, pathologies O.R.L...). On va principalement agir sur les effets secondaires. On peut citer par exemple l'utilisation chez un vagotonique de la Lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.) en usage interne pour ses effets anti-stress, calmant, et pour ses actions contre les crampes musculaires, ainsi que contre les troubles du sommeil.

Nous pouvons affirmer que la phytothérapie peut et devrait figurer en bonne place dans notre arsenal thérapeutique de tous les jours, sans que cela soit considéré comme une pratique marginale ou dépassée.

Naturellement, le médecin phytothérapeute ne s'interdit pas de prescrire toute molécule de synthèse qu'il juge utile et nécessaire à la guérison de son patient, mais il ne le fera qu'avec discernement et à bon escient, en évaluant au mieux le rapport bénéfice/risque, et surtout en accordant sa pensée à ses actes : à efficacité égale, le phytothérapeute préfère choisir la phytothérapie et/ou l'aromathérapie plutôt qu'un traitement utilisant les molécules de synthèse. Le corollaire de cette préférence est qu'il ne prétend pas tout guérir avec les plantes : à tout

moment, il peut compléter ou remplacer son traitement phytothérapeutique par une autre prescription plus conventionnelle si cela est nécessaire. Le médecin sait qu'il ne peut pas tout guérir, pas plus avec les plantes qu'avec l'ensemble des moyens dont il dispose. Mais l'ajout de la phytothérapie dans son approche thérapeutique lui permet d'élargir considérablement son champ d'efficacité et par conséquent son domaine d'activité, non seulement dans le cadre de toutes les affections fonctionnelles, mais aussi dans la plupart des maladies organiques, en prescription isolée ou, dans ces derniers cas, si nécessaire en association avec l'allopathie. L'adjonction d'un traitement phytothérapeutique renforce alors l'efficacité du remède chimique, ou diminue ses effets secondaires. Souvent, il est également possible d'adapter les posologies de ce remède chimique une fois associé au traitement à base de plantes. De même, la phytothérapie permet de remplacer les molécules de synthèse lorsque celles-ci ne sont plus tolérées ou acceptées par le patient. Citons par exemple le cas des anti-inflammatoires, des antidépresseurs, ou encore des anxiolytiques...

La phytothérapie offre des possibilités très complètes que bien souvent la chimiothérapie conventionnelle ne peut pas égaler, puisque l'on peut aussi bien rétablir les grands équilibres physiologiques (neuroendocriniens, immunitaires) qu'agir sur les fonctions et donc intervenir appareil par appareil (locomoteur, cardio-vasculaire, etc. Il est également possible d'avoir une action thérapeutique spécifique sur chacun des organes du corps, de façon précise et ciblée pour chaque plante utilisée. Mais le phytothérapeute veillera à soigner un tout et non pas un symptôme. Il considère et prend en charge son patient de façon globale et personnalisée, à tous les stades de sa démarche clinique, en adaptant sa thérapeutique au fil des consultations aux besoins réels de son patient par le biais notamment de la préparation magistrale. Il convient enfin de ne pas oublier une démarche fondamentale et spécifique à la phytothérapie, qui est souvent le préalable à toute autre prescription, et parfois même la seule : la prise en compte du terrain et la relance de l'homéostasie. En rétablissant ainsi les grandes fonctions métaboliques et en facilitant le travail des organes d'élimination (peau, rein, foie, intestin), le phytothérapeute permet à l'organisme malade de retrouver son équilibre, et ainsi le chemin de la guérison.

L'atout premier de la phytothérapie est l'exceptionnelle tolérance des plantes médicinales, si elles sont choisies soigneusement en respectant les indications, contre-indications et en tenant compte des interactions éventuelles. Cet avantage permet d'éviter les effets secondaires, les

problèmes de rebond, de rétrocontrôles négatifs et de dépendance si fréquemment rencontrés avec les médicaments de synthèse [29].

De nos jours, la Phytothérapie est basée sur les avancées scientifiques et les recherches des extraits actifs des plantes. Une fois identifiés ces derniers sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation de ces derniers est soumise à l'autorisation de mise sur le marché. On parle alors de Pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique [34].

La phytothérapie moderne trouve donc sa justification dans la pharmacognosie, aspect multidisciplinaire de la connaissance du végétal et de ses propriétés.

Enfin il est important de préciser que connaître une plante, c'est aussi être conscient de ses limites et de ses dangers car la phytothérapie n'est en aucun cas une technique anodine. Son utilisation thérapeutique nécessite une bonne connaissance de la matière médicale [29].

### **I.2.1 Médicament à base de plantes**

On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques.

Sont notamment considérés comme des médicaments : les produits diététiques qui renferment dans leur composition des substances chimiques ou biologiques ne constituant pas elles-mêmes des aliments, mais dont la présence confère à ces produits, soit des propriétés spéciales recherchées en thérapeutique diététique, soit des propriétés de repas d'épreuve. Les produits utilisés pour la désinfection des locaux et pour la prothèse dentaire ne sont pas considérés comme des médicaments [36]. Il est à noter que ces médicaments, d'après leur réglementation, sont sélectionnés sur la base de leur qualité, de leur innocuité et de leur intérêt thérapeutique [37].

Quant à la dénomination "médicaments à base de plantes" ou a celles "substances végétales" et "préparations à base de plantes" sont considérés comme équivalents aux termes

"drogues végétales" et "préparations à base de drogues végétales" définis dans la Pharmacopée européenne." Nous pouvons donc définir plus communément les médicaments à base de plantes comme étant des médicaments dont les principes actifs sont exclusivement des drogues végétales et/ou des préparations à base de drogue(s) végétale(s) [38]. Leurs composants à effets thérapeutiques connus sont des substances ou des groupes de substances, définis chimiquement, dont la contribution à l'effet thérapeutique d'une drogue végétale ou d'une préparation est connue [39].

### **I.2.2 Préparations à base de drogue(s) végétale(s)**

Les préparations à base de drogue(s) végétale(s) se présentent en extraits, teintures, huiles grasses ou essentielles, fragments de plantes, poudres, sucs exprimés par pression... Leur production met en œuvre des opérations de fractionnement, de purification ou de concentration. Cependant, les constituants isolés, chimiquement définis, ou leur mélange ne sont pas considérés comme des préparations à base de drogue(s) végétale(s). Des substances, telles que des solvants, des diluants, des conservateurs peuvent entrer dans la composition des préparations à base de drogue(s) végétale(s) ; la présence de ces substances doit être indiquée [35].

### **I.3 Plante médicinale**

D'après la Xème édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales "sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses". Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques. En d'autres termes nous pouvons dire qu'une plante médicinale est une plante dont un des organes, par exemple la feuille ou l'écorce, possède des vertus curatives lorsqu'il est utilisé à un certain dosage et d'une manière précise. Au Moyen Âge, on parlait de "simples" [40]. Dans le Code français de la Santé Publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique [33]. C'est une plante, non mentionnée en tant que médicinale, qui est en vente libre par les pharmaciens.

Pourtant en France, une définition officielle en est donnée par la jurisprudence : "une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal, c'est-à-dire que les plantes sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales. Dans le seul cas où ces

deux conditions sont réunies, alors la plante appartient à l'usage pharmaceutique. Elles sont considérées comme des médicaments et leur vente est exclusivement réservée aux pharmaciens". Il existe pourtant une exception pour 148 d'entre elles qui sont, par dérogation, en vente libre.

On peut distinguer deux types de plantes médicinales : En premier lieu se trouve l'allopathie dans laquelle les plantes ont une action importante et immédiate. Beaucoup de plantes utilisées dans ce mode de traitement peuvent s'avérer toxiques. En effet deux tiers des médicaments sur le marché sont d'origine naturelle, principalement végétale [33]. Puis on différencie les plantes dépourvues d'effet iatrogène mais ayant une activité faible. Elles sont utilisées en état ou dans des fractions réalisant le totum de la plante, soit la totalité des constituants [33]. La plante, organisme vivant, marque son identité par des spécificités morphologiques, à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimiques, liées à des voies de biosynthèses inédites, représentant l'intérêt de l'usage des plantes médicinales [41].

### **I.3.1 Totum**

Nous pouvons en profiter pour revenir sur cette notion de totum de la plante. L'activité d'un végétal est communément rattachée à la présence du principe actif majoritaire qu'elle renferme. Le terme de "totum" désigne l'ensemble des constituants de la plante supposés actifs, agissant en synergie et par complémentarité pour moduler, modérer ou renforcer l'activité de la drogue [29]. Il est plus efficace que le principe actif isolé et souvent en tempère les effets secondaires. La plante dans son totum présente des potentialités d'action très variées, pour un résultat plus sûr, plus complet sur le terrain du malade. En effet ce n'est pas toujours le principe actif majoritaire qui est responsable de l'effet thérapeutique, ni le marqueur choisi. Par exemple citons le Millepertuis (*Hypericum 28 perforatum L.*) dont l'hypericine est photosensibilisante et anti-virale alors que ce sont les xanthones, et plus particulièrement la kielcorine, qui sont responsables de l'effet IMAO, antidépresseur [36]. C'est l'ensemble des principes actifs du végétal qui confère son activité thérapeutique au végétal. Notons tout de même que certains avis diffèrent quant à cette notion de totum. Il pourrait arriver que des constituants du mélange soient toxiques ou indésirables. C'est le cas de la drogue de Valériane (*Valeriana officinalis L.*) qui peut être le totum du rhizome et des racines dans toute son intégrité et toute son intégralité. Pourtant si l'acide valérénique, principe actif majeur, est toujours d'actualité, les valépotriates qui sont également des composants du mélange ont démontré, *in vitro*, des propriétés cytotoxiques et

mutagènes [42]. Pour toute drogue se présentant sous forme de poudre totale, les essais de toxicité sont donc obligatoires.

### **I.3.2 Drogue**

Les drogues végétales sont essentiellement des plantes, parties de plantes ou algues, champignons, lichens, entiers, fragmentés ou coupés, utilisés en l'état, soit le plus souvent sous forme desséchée, soit à l'état frais. Certains exsudats n'ayant pas subi de traitements spécifiques sont également considérés comme des drogues végétales.

Les drogues végétales doivent être définies avec précision par la dénomination scientifique universelle selon le système binominal (genre, espèce, variété, auteur). De notre côté nous utiliserons une définition simplifiée qui assimile la drogue à une (ou des) partie(s) du végétal renfermant un ou plusieurs principe(s) actif(s) possédant des propriétés médicinales. La drogue est donc la partie de la plante la plus riche en principe actif ; elle est issue de plantes fraîches ou desséchées, et utilisée à des fins thérapeutiques [35]. Nous pouvons citer comme exemple de parties utilisées les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines ; et elles peuvent être gardées entières ou fragmentées.

Dans certains cas rares la drogue est la plante entière. C'est le cas de la Piloselle (*Hieracium pilosella* L.) pour laquelle sont utilisées les racines, les tiges et les feuilles ensembles. Enfin elle peut également être un produit d'excrétion retiré par incision du végétal vivant n'ayant subi aucune opération galénique [35]. Citons comme exemples l'al oès, suc épaissi provenant des feuilles d'une douzaine d'espèces de plantes de la famille des *Asphodelaceae*, les oléorésines chez les *Burseraceae*, la gomme chez certaines *Fabacées*, ou encore le latex, le mucilage chez les *Malvaceae*, etc.

Dans les médicaments à base de plantes, le principe actif n'est pas forcément toujours connu. Les monographies des pharmacopées précisent la nature de l'organe utilisé, généralement désigné par le terme de "drogue". Ainsi, si la totalité des organes (feuille, fruit, racine) de la Belladone (*Atropa bella-donna* L.) contient des alcaloïdes, seule l'écorce de Quinquina (*Cinchona officinalis* L.), renferme de la quinine. De plus, les composés synthétisés peuvent varier en fonction de l'organe, d'où l'importance du choix de la drogue comme matière première [28].

**I.3.3 Principe actif :**

C'est une molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal. Le principe actif est contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétale. Une drogue végétale en état ou sous forme de préparation est considérée comme un principe actif dans sa totalité, que ses composants ayant un effet thérapeutique soient connus ou non [43].

**I.3.4 Matières premières :**

Ce sont les produits (principes actifs, excipients, solvants, gaz...) utilisés pour la fabrication du médicament. Ils n'ont pas encore été travaillés et sont destinés à être transformés par le processus de fabrication afin d'aboutir aux produits traités et finis prêts à être utilisés par le patient. Leur qualité est définie par une monographie [35]. Les fabricants doivent enregistrer toute matière première auprès du Ministère de la Santé Publique.

**I.3.5 Récolte et conservation des plantes médicinales :**

Récolter les plantes par temps sec, plutôt par une matinée bien ensoleillée, lorsque la rosée s'est évaporée. Les plantes cueillies dans de bonnes conditions climatiques et au moment de leur pleine maturité ont une teneur très élevée en composants actifs [44].

Il existe diverses méthodes de conservation, les plus courantes et les plus simples étant le séchage à l'air ou au four. Un endroit chaud et sec est idéal. Poser toujours les plantes sur du papier journal. Une fois séchées, les plantes se conservent plusieurs mois dans un sac ou un pot en verre teinté ou dans un sac en papier kraft. Outre le séchage à l'air, il existe d'autres méthodes de conservation, telle que la déshumidification en utilisant l'appareil déshumidificateur et la méthode de congélation [45] et [46].

**I.3.6 Opérations d'extraction :**

L'extraction proprement dite s'effectue selon de nombreuses méthodes [45] et [46] Elle peut s'effectuer :

- Par décoction ;
- Par décoction chinoise ;

- Par lixiviation ou percolation ;
- Par distillation ;
- Par pyrogénéation ;
- Par infusions ;
- Par extraits de plantes ;

#### **I.3.6.1 Extraction par décoction :**

Pour extraire les principes actifs des racines, de l'écorce, des tiges et des baies, il faut généralement leur faire subir un traitement plus énergique qu'aux feuilles ou aux fleurs. Une décoction consiste à faire bouillir dans l'eau les plantes sèches ou fraîches, préalablement coupées en petits morceaux. On peut la consommer chaude ou froide.

Les décoctions sont généralement réalisées à partir des racines, d'écorce et de baies, auxquelles, on ajoute parfois des feuilles et des fleurs [45]. Et [48], ce type d'extraction relativement simple et classique, se réalise sur une quantité d'environ 1kg de matière végétale. Les parties fragiles de la plante doivent être ajoutées dans le récipient, hors du feu lorsque la décoction commence à tiédir et enfin, filtrer la préparation.

#### **I.3.6.2 Extraction par décoction chinoise :**

En Chine, la décoction est le principal mode d'utilisation des plantes médicinales. Pour obtenir un liquide très concentré, il faut utiliser de grandes quantités de plantes ou bien réduire la décoction jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 200 ml de liquide. La réduction est efficace lorsque l'on utilise des écorces astringentes, telles que l'acacia d'Arabie et de chêne commun pour renforcer les gencives ou nettoyer les éruptions cutanées infectées (à ne pas prendre en usage interne). Les décoctions doivent être utilisées aux températures prescrites pour les infusions [46].

#### **I.3.6.3 Extraction par lixiviation ou percolation :**

C'est une technique simple qui consiste à épuiser la matière végétale pulvérisée par divers solvants organiques. Le principe consiste à réaliser un écoulement lent et régulier du solvant à travers la drogue ; elle se réalise à froid dans une colonne en verre. Le temps de lixiviation et la

quantité de solvant à mettre en œuvre dépendent de la partie utilisée et de la taille de ses fragments. Le produit obtenu est un percola [49].

#### **I.3.6.4 Extraction par distillation :**

La distillation est une opération pharmaceutique qui a pour but de séparer les principes volatils (contenus dans un mélange complexe) de ceux qui ne le sont pas ou le sont moins qu'eux. Ce procédé est basé :

- D'une part, sur la propriété que possède les vapeurs développées dans une enceinte de se condenser sur les parois plus froides d'un récipient en relation avec celui dans lequel les vapeurs sont produites.
- D'autre part, sur la propriété qu'ont certaines substances de former azéotropes c'est-à-dire des mélanges de vapeurs se formant à température inférieure à la température de vaporisation de chacun d'eux (ex. eau-alcool-benzène) ; c'est la propriété qui permet l'entraînement à la vapeur.
- Le produit obtenu est un distillat [47].

#### **I.3.6.5 Extraction par pyrogénéation :**

C'est la méthode traditionnelle de l'obtention des goudrons de cade pour le mode distillation du bois de *Juniperus oxycedrus* [50]

En conclusion, les extraits obtenus par décoction, lixiviation et percolation doivent être séparés des solvants qui ont été utilisés pour l'épuisement soit par évaporation des solvants au Rota vapeur soit que la phase est réduite par l'acétate d'éthyle. Le produit final obtenu est dit « extrait pur » ou drogue.

#### **I.3.7 Extraits de plantes :**

Les extraits sont des substances de consistance fluide, semi-solide ou solide qui résulte de l'évaporation soit d'un suc de plante soit d'une solution extractive obtenue en traitant les matières premières végétales par un solvant approprié. « Chaque extrait est défini par son mode de

préparation, la nature du solvant d'extraction, l'identification de certains composants, la teneur éventuelle en principes actifs, la perte à la dissection ou le résidu sec » [51].

Un extrait se fait en 2 temps :

### **I.3.7.1 Préparation du liquide extractif**

La préparation fait appel à toutes les techniques de solubilisation extractive macération et la lixiviation sont pratiquement les seules à être employées.

Le choix des solvants est en fonction de la drogue et de la solubilité des principes actifs ; il est possible d'utiliser plusieurs solvants mélangés ou l'un après l'autre. Le plus souvent, l'alcool est utilisé à différents titres parfois l'éther ou l'eau acidulée (quinquina). La quantité utilisée doit être suffisante pour épuiser la drogue maximum sans pour autant conduire à une durée trop longue des opérations de concentration.

### **I.3.7.2 Concentration des solutions extractives**

La concentration est faite par évaporation. Les caractères organoleptiques, l'état physique, les qualités thérapeutiques et la conservation d'un extrait dépendent pour beaucoup de cette opération qui, pour être bien conduite, doit être la plus rapide possible, à température la moins élevée possible. L'évaporation se pratique :

- à pression ambiante à l'air libre ou à l'étuve, quand il n'est pas nécessaire de récupérer le solvant (extrait aqueux ou après distillation des solvants volatiles). Le chauffage se fait au bain- marie ou à la vapeur ou dans des échangeurs ou par rayonnements infrarouges ou par micro-ondes.
- Sous vide, ce qui permet en outre la récupération du solvant à température moyenne (40 à 50°C) et évite au maximum l'action oxydante de l'air. On peut classer les extraits d'après leur mode de préparation, les solvants employés, les drogues d'origine (extraits résineux, aromatiques) d'après leurs propriétés physiques, leur degré de concentration ou leur teneur en eau [47].

## **I.4 Modes de préparation en phytothérapie**

### **I.4.1 Infusions**

C'est la façon la plus simple d'accommoder les feuilles et les fleurs pour obtenir des remèdes ou des fortifiants à partir d'une seule plante ou d'un mélange de plusieurs et on la boit chaude ou froide [45] [51]. Il convient de couper en petits morceaux la substance végétale puis de

la placer dans un récipient. Versez la quantité d'eau bouillante nécessaire et laissez reposer de 5 à 20 mn, ou jusqu'à refroidissement, pour recueillir le plus de principes actifs possibles. Les infusions doivent être bues chaudes, jamais bouillantes bien entendu et quasiment jamais froides. Parfois, certaines infusions au goût particulièrement amer sont plus acceptables lorsqu'elles sont bues à température ambiante ; on peut les utiliser pour des compresses, des lavages, des bains et des rinçages [46].

#### **I.4.2 Infusion froide**

Certaines substances perdent leurs propriétés à la chaleur. Mais, on peut tout de même les infuser à froid. Faites tremper la quantité nécessaire de plantes toute une nuit dans l'eau froide. Le lendemain matin, il faut la faire chauffer sans problème jusqu'à la température voulue et filtrez avant usage.

#### **I.4.3 Infusion chaude et froide**

S'il faut recourir à une plante dont certains éléments seront altérés par la chaleur et d'autres qui ne seront révélés que par trempage à froid pendant une nuit, voici comment résoudre ce dilemme : faites tremper d'abord la quantité totale de plantes dans la moitié seulement du volume d'eau nécessaire à l'infusion. Le lendemain matin, filtrez et réservez séparément le liquide (infusion froide) et le résidu de plantes. Portez à ébullition l'autre moitié du volume d'eau et versez-y le résidu. Couvrez et laissez macérer trois minutes. Filtrez et mélangez l'infusion chaude et la froide dans un récipient en verre trempé (genre pyrex) [52].

L'infusion est dite simple, s'il s'agit d'une seule plante, ou composée, s'il s'agit d'un mélange de plantes, la solution obtenue s'appelle un infusé. La consommation d'infusions ou tisanes végétales n'est pas dépourvue de problèmes. En effet, la teneur en constituants actifs d'une espèce végétal dépendra de nombreux facteurs : âge de la plante, moment de la récolte, influence du sol, de l'ensoleillement et de l'altitude, procédé de séchage, etc... Bref, lorsque l'on boit une tasse de tisane, il est absolument impossible de connaître avec précision les concentrations des substances chimiques de la plante qui ont été solubilisées dans l'eau. De ce fait, certaines plantes ne doivent pas être utilisées sous forme d'infusion, car la marge thérapeutique du principe actif est très étroite, cela signifie qu'une légère différence dans le dosage transformera l'effet bénéfique (thérapeutique) de la substance active en effet toxique, voire mortel. Un dosage précis est impossible à réaliser avec une infusion [53].

#### I.4.4 Décoction

Pour préparer une décoction, on met le remède selon les cas, coupé en petits morceaux et pilé, pendant quelques heures dans la quantité d'eau froide nécessaire ou bien directement dans l'eau bouillante. On laisse ensuite bouillir pendant quelques dizaines de minutes, à la fin, on filtre et éventuellement, on presse le résidu pour en extraire complètement le suc, Il est conseillé d'utiliser, une quantité d'eau légèrement supérieure pour compenser celle qui s'est évaporée. Toutes les plantes médicinales ne se prêtent pas à la décoction et en particulier, celles contenant des huiles étherées qui se volatilisent facilement. Les décoctions doivent être utilisées de la manière et aux températures prescrites pour les infusions [46].

Dans le cas des matériaux durs ou grossiers, comme les écorces ou les tiges, seuls la méthode de la décoction permet de révéler les principes actifs, la macération ou le lessivage, ne suffisent pas, par contre, la cuisson à petit feu du procédé de décoction donne satisfaction [52]. La décoction est dite simple, s'il s'agit d'une seule plante, ou composée, s'il s'agit d'un mélange de plantes [51].

#### I.4.5 Macération

C'est l'action d'un liquide froid (eau, alcool, vin, huile) sur une ou plusieurs plantes pendant plusieurs heures, pour en extraire les principes actifs ; le produit obtenu s'appelle un macéré. C'est un mode de préparation qui est employé notamment avec les racines dans ce cas, il faut les écraser avant macération pour assurer une meilleure diffusion des principes actifs [51].

##### ❖ Principe [55]

Le processus est déroulé en quatre étapes :

- Préparation du décocté ou du macéré ;
- Concentration du filtrat obtenu au rota vapeur ;
- Congélation du concentré au réfrigérateur ;
- Lyophilisation du concentré au lyophilisateur.

Il existe d'autres modes de préparation en phytothérapie telle que :

- Teinture ;
- Jus ;
- Sirops ;
- Poudre ;

- Huiles médicinales ;
- Vins toniques ;

## **I.5 Formes d'utilisation :**

### **I.5.1 Usage interne :**

- **Tisane :**

C'est la boisson constituée par un infusé, un décocté ou un macéré de plantes [46].

- a) **Fumigation :**

C'est l'utilisation de vapeurs chargées des principes actifs de la plante, On peut ainsi faire bouillir des feuilles d'eucalyptus dans une pièce qu'on veut désinfecter. La fumée de certains végétaux qu'on brûle lentement comme de l'encens peut aussi servir aux fumigations ; c'est le cas de la fumée de baies de genévrier

On peut pratiquer :

- Ou bien des fumigations humides, en faisant bouillir une plante : on utilise soit un inhalateur, soit la technique de la tête recouverte d'une serviette éponge, le visage étant placé au-dessus du bol d'eau fumante contenant les plantes.
- Ou bien des fumigations sèches, en faisant brûler une ou plusieurs plantes sur des charbons ardents et en respirant les fumées qui s'en dégagent.

### **I.5.2 Usage externe**

#### **Au niveau de la peau**

- b) **Compresse**

C'est l'application sur les parties traitées de gaze imbibée de décocté, d'infusé ou de macéré [46].

- c) **Cataplasme**

C'est la préparation de la plante assez pâteuse pour être appliquée sur la peau dans un but thérapeutique. La plante peut être broyée, hachée à chaud ou à froid ou mélangée à de la farine de lin pour obtenir la bonne consistance. Le cataplasme calme les douleurs musculaires et les névralgies, soulage les entorses, les fractures, les plaies infectées et permet d'extraire le pus, avec plusieurs épaisseurs de gaze sur les parties du corps à traiter [46].

**d) Lotions**

Les lotions sont des préparations à base d'eau et de plantes en infusions, décoctions ou teintures diluées dont on tamponne l'épiderme aux endroits irrités ou enflammés [45].

**e) Bains**

Il peut s'agir de bains complets ou de bains partiels. La préparation se fait en ajoutant à l'eau du bain une infusée, un décocté ou un macéré.

**▪ Bain complet**

Il peut être tonique ou au contraire, calmant.

**▪ Bain partiel**

On distingue :

- Le bain de siège, ou bain de la région ano-fessière, qui est indiqué dans le traitement des hémorroïdes et des fissures anales. Le bain de siège froid a une action de décongestionnement sur le petit bassin.
- Le bain de pieds (pédiluve) et le bain de mains est indiqué en cas de transpiration excessive des pieds ou des mains.

**I.6 Présentation de la plante *Centaurea africana*****I.6.1 Présentation de la famille des Asteraceae**

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. La famille des Astéracées est la plus vaste de la classe des dicotylédones, car elle comprend environ 900 genres et 15 000 et 20 000 espèces selon les estimations, distribuées principalement dans les zones tempérées du globe.

Ce sont des plantes herbacées, rarement arbustives, arborées ou rampantes [56] et ont les caractéristiques communes suivantes :

- Des feuilles alternes.
- Des inflorescences en capitules constituées d'un réceptacle sur lequel sont insérées de la base au sommet des bractées vertes stériles.
- Des bractées colorées fertiles axillant chacune une fleur.
- La fleur est petite, possédant un calice très réduit représenté par un bourrelet annulaire, une corolle en tube, d'un ovaire uniloculaire formé par la soudure de deux carpelles [57].

### I.6.2 Présentation du genre *Centaurea*

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, biannuelles ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons sont disposés en capitules multiflores homomorphes ou dimorphes, entourés d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubulées, multiflores homomorphes ou dimorphes, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes le cas de *Centaurea africana*. Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle plan ou sub plan et garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, à hile latérale, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque [58].

*Centaurea africana* est une plante annuelle, vivace, ferme, dressée et puissante de 60 à 150 cm, les feuilles grandes et vertes à fleurs jaune (Figure 01).



**Figure 01** : Photo de *Centaurea africana*. (photo personnel)

### I.6.3 Répartition géographique

Le genre *Centaurea* est répandu aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe, le bassin méditerranéen, l'ouest de l'Asie et le continent américain. Ce genre est présent en Algérie en

majorité dans l'est et le sud-est, alors que l'espèce *Centaurea africana* est endémique pour l'Algérie et la Tunisie, d'où le nom Africana [58].

### Position taxonomique

Règne :	plantae
Division :	Magnoliophyta
Embranchement :	Spermatophyta (Angiospermae)
Classe :	Dicotyledone
Ordre :	Asterales
Famille :	Asteraceae
Genre :	Centaurea
Espèce :	Centaurea africana [58].

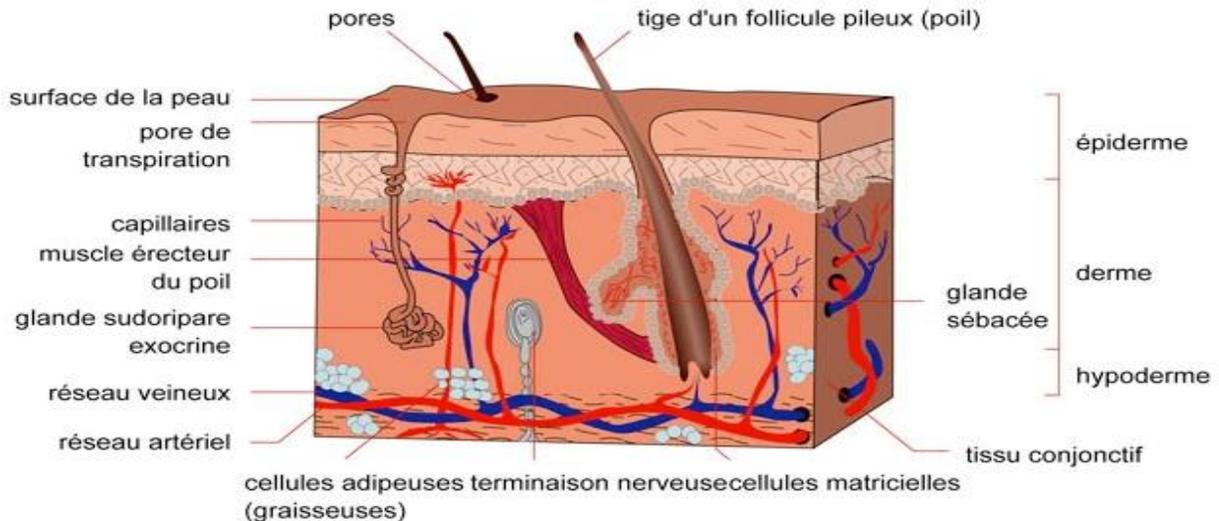
#### I.6.4 Les métabolites secondaires chez le genre *centaurea*

Les études photochimiques effectuées sur les espèces du genre *centaurea* ont révélé leur richesse en métabolites secondaires tel que les lactones sesquiterpéniques [59] et [60] les stéroïdes (stérols) [61] et [62], en composés phénoliques de type flavonique et un degré moindre les alcaloïdes [63].

plus d'une vingtaine de lactones sesquiterpéniques ont été isolées des espèces du genre *Centaurea* poussant en Algérie de type germacranolide, élémanolide, eudesmanolide et guaianolide [60].

## I.7 La peau et la cicatrisation

La peau est un organe vivant constituant le revêtement extérieur du corps de l'homme et des animaux. De coloration variable suivant les races et les régions du corps, son poids représente environ 10% du poids corporel total [65].



**Figure 2 :** Structure de la peau.

### I.7.1 Structure de la peau

La peau est non seulement un organe membraneux de surface mais elle est également constituée de trois couches, principalement :

#### I.7.1.1 L'épiderme

Est un tissu non vasculaire se compose environ de 90% de kératinocytes qui se transforme en cellules cornées, ces cellules forment la couche cornée externe.

De plus, l'épiderme héberge les cellules du système pigmentaire produisant la mélanine (mélanocytes), des cellules dendritique du système immunitaire (cellules de Langerhans), les cellules du système nerveux périphérique.

### **I.7.1.2 Le derme**

Est une couche fibro-élastique de tissu conjonctif riche en fibres, elle se compose de cellules du tissu conjonctif toujours présentes à cet endroit (fibroblastes) et de la matrice extracellulaire.

Le derme confère ses caractéristiques particulièrement de résistance et d'élasticité à la peau. Il est porteur de la vascularisation et du système nerveux de la peau et contient de plus les cellules mobiles des systèmes immunitaires de la peau.

### **I.7.1.3 hypoderme**

Se compose de cellules graisseuses (lipocyte) et du tissu conjonctif les lipocytes formant un tissu adipeux construit les lobules des vaisseaux et des nerfs passent dans des septes conjonctifs. L'hypoderme contient de la moitié aux deux tiers de la masse totale grasse de l'organisme [54].

### **I.7.1.4 Les annexes cutanées**

La peau est traversée par une série d'éléments annexes en relation avec le milieu extérieur tels que les glandes sébacées, sudoripares et des phanères : poils, cheveux. [66].

#### **a- Les glandes sudoripares**

Fabriquent la sueur, permettent d'évacuer l'excès de chaleur et de maintenir constante la température du corps (thermorégulation).

#### **b- Les glandes sébacées**

Associées aux poils, sécrètent du sébum qui a pour fonction de lubrifier et d'imperméabiliser l'épiderme.

#### **c- Les follicules pileux**

Ils sont le lieu de naissance des poils et des cheveux, et les muscles horripilateurs.

### **I.7.2 Jonction dermo-épidermique**

La jonction dermo-épidermique est une zone acellulaire qui sépare le derme de l'épiderme. Elle joue un rôle essentiel dans la cohésion de l'épiderme au derme, c'est une barrière sélective qui contrôle les échanges moléculaires et cellulaires dermo-épidermique. Elle intervient également dans la cicatrisation cutanée par le biais de ses glycoprotéines.

### **I.7.3 Les fonctions de la peau**

La peau assure plusieurs fonctions importantes :

- protection contre les agents nocifs de l'environnement.

- fonction sensitive (perception de la chaleur, du froid ou de la douleur).
- Thermorégulation (régulation de la température corporelle par l'irrigation sanguine)
- fonction d'échanges et d'excrétion (élimination d'eau et de sels par la sudation).
- absorption de substance (médicaments)
- participation à la communication [67].

## **I.8 La cicatrisation**

La cicatrisation d'une plaie est un phénomène biologique naturel. Les tissus humains et animaux sont capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leurs sont propres.

La cicatrice est la partie visible d'une lésion du derme après que le tissu se soit réparé, suite à une incision au cours d'une opération ou après une blessure. La cicatrisation fait partie intégrante du processus de guérison. A part les lésions très mineures, chaque blessure (après un accident, une maladie, ou un acte chirurgical) engendre une cicatrice plus ou moins importante.

Le tissu cicatriciel n'est pas identique au tissu qu'il remplace et est habituellement de qualité fonctionnelle inférieure. Par exemple, les cicatrices cutanées sont plus sensibles au rayonnement ultraviolet, les glandes sudoripares et les follicules pileux ne se développent pas sous la cicatrice. Cependant, quelques tissus (par exemple l'os) peuvent guérir sans détérioration structurelle ou fonctionnelle [69].

### **I.8.1 Les différentes phases de la cicatrisation**

Le processus de cicatrisation se déroule en continuité mais peut arbitrairement être divisé en plusieurs phases successives qui de se chevauchent parfois au sein d'une même plaie [69]

Les 4 phases sont :

- 1- Phase vasculaire
- 2- Phase inflammatoire
- 3- Phase de réparation tissulaire
- 4- Phase de maturation de la cicatrice

### **I.8.1.1 Phase vasculaire**

Le saignement est le premier phénomène clinique observé dans une plaie ; la qualité de la coagulation détermine l'efficacité de cette première phase. La vasoconstriction est rapide et favorise l'hémostase immédiate. La mise à nu du sous-endothélium vasculaire provoque l'adhésion plaquettaire par l'intermédiaire du facteur Willebrand (glycoprotéine de la famille des intégrines). Ce thrombus est suivi de la formation du caillot de fibrine : les plaquettes activées libèrent le contenu de leurs granules (thrombospondine, fibronectine, facteur plaquettaire 4, ...) et d'autres protéines sont apportées par le sang (fibrinogène, fibronectine, thrombospondine, vitronectine, thrombine, facteur Willebrand). Le réseau de fibrine et fibronectine forme un réservoir pour les facteurs de croissance libérés dans la plaie (facteur de croissance dérivé des plaquettes : PDGF, facteur de croissance fibroblastique : bFGF, transforming growth factor : TGF  $\alpha$  et  $\beta$ ). Ils favorisent la migration et l'activation des polynucléaires neutrophiles et des macrophages. Ces cellules protègent de l'infection, favorisent la détersion et ont un rôle nutritionnel local [70].

### **I.8.1.2 Phase inflammatoire**

À une phase de vasoconstriction rapide, indispensable à l'hémostase immédiate, succède une vasodilatation permettant aux cellules circulantes d'affluer sur le site de la plaie. Cette vasodilatation est méditée par plusieurs facteurs dont l'histamine, certains dérivés du complément (C3a et C5a) et les prostaglandines. Les neutrophiles et les monocytes sont attirés dans la plaie non seulement par les facteurs libérés par les plaquettes, mais également par des peptides bactériens, des facteurs du complément et des produits de dégradation de la fibrine. Les polynucléaires neutrophiles sont les premiers leucocytes présents dans la plaie. Libérant des enzymes protéolytiques comme l'élastase et des collagénases, ils favorisent la pénétration des cellules dans la plaie. Ils assurent également la détersion des lésions et une action anti-infectieuse locale. Les monocytes se fixent sur les cellules endothéliales et migrent dans la plaie d'une façon similaire à celle des neutrophiles. Une fois dans le milieu tissulaire, ils se différencient en macrophages et adhèrent aux protéines de la matrice extracellulaire. Les macrophages jouent un rôle anti-infectieux et de détersion locale grâce à leurs capacités de phagocytose, ils participent également au remodelage matriciel. Mais ils sont surtout, comme les plaquettes, une source essentielle de cytokines dont "l'insuline growth factor 1"(IGF1), le "transforming growth factor $\beta$ " (TGF $\beta$ ), le "tumor necrosis factor $\alpha$ "(TNF $\alpha$ ) et le "platelet-derived growth factor"(PDGF). Ces substances

amplifient la réponse inflammatoire et stimulent la prolifération des fibroblastes, la production de collagène et plus généralement la formation du tissu de granulation. Entre 48 et 72 heures après l'apparition de la plaie, les macrophages y prédominent, présents en nombre supérieur à celui des neutrophiles. Vers le 5<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup> jour, peu de cellules inflammatoires persistent, les fibroblastes deviennent le type cellulaire prédominant [71].

### **I.8.1.3 Phase de réparation tissulaire**

La formation du tissu de granulation dure entre 10 à 15 jours ; elle associe :

Une prolifération fibroblastique : les fibroblastes arrivés dans la plaie vers la 48<sup>ème</sup> heure migrent grâce à l'expression à leur surface de récepteurs de la famille des intégrines pour la fibronectine, la vitronectine, le collagène de type 1. Leur prolifération est sous la dépendance de cytokines (IGF1, EGF : epidermal growth factor, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  et PDGF-BB). Le remodelage de la matrice est favorisé par la sécrétion d'enzymes protéolytiques (métalloprotéinases 1 : collagénase et 2: gélatinase) qui facilitent la migration cellulaire à l'intérieur de cette matrice. La synthèse d'une matrice extracellulaire par les fibroblastes, comportant du collagène (III puis I), de la fibronectine, des protéoglycanes (acide hyaluronique, chondroïtine sulfate, dermatan et héparan sulfates). une angiogénèse issue de la migration des cellules endothéliales à partir des vaisseaux sanguins sains proches. L'hypoxie tissulaire dans la plaie et les protéases dégradant la matrice. Le réseau vasculaire est d'abord indifférencié (bourgeon charnu) vers le 5<sup>ème</sup> jour.

En fin de phase, certains fibroblastes se transforment en myofibroblastes, capables de se contracter. Cette contraction permet le rapprochement des berges de la plaie.

L'épithélialisation commence par la migration des kératinocytes basaux ou des annexes sur des composants matriciels (fibronectine, collagène I et IV, thrombospondine) grâce à l'expression de récepteurs. Ensuite, interviennent leur multiplication et leur différenciation [70]

### **I.8.1.4 Phase de maturation**

Le remodelage de la matrice extracellulaire passe par une phase inflammatoire et proliférative durant jusqu'à 2 mois après la fermeture de la plaie, suivie par une phase de régression qui peut persister jusqu'à 2 ans. Peu à peu, le tissu de granulation se raréfie en fibroblastes, une structure collagénique plus dense apparaît, tandis que le réseau vasculaire s'organise. Le remodelage matriciel va accroître la résistance de la cicatrice de façon considérable, jusqu'à 80 à 90 p. 100 de sa force finale vers la 6<sup>e</sup> semaine. La fibronectine et l'acide hyaluronique sont

progressivement remplacés par les collagènes, les fibres élastiques et les glycoaminoglycanes (dermatane sulfate, chondroïtine 4 sulfates). Les collagénases (métalloprotéinases) et leurs inhibiteurs (“tissue inhibitors of metalloproteinases” ou TIMP), les protéases synthétisées par les fibroblastes, les polynucléaires et les macrophages principalement, interviennent de façon importante dans les phénomènes de remodelage matriciel. L’âge, les forces de tension, la pression influencent la synthèse et l’organisation des molécules de collagène. Les cicatrices sont néanmoins, dans tous les cas, moins résistantes et moins élastiques que la peau normale, en partie à cause d’un certain déficit en élastine [70].

Modèles	MODELE INCISIONNEL	MODELE EXCISIONNEL
<b>Définition</b>	Il consiste à réaliser une incision linéaire calibrée en profondeur par un bistouri ou un laser	La plaie est réalisée par l'excision d'un certain volume de tissu calibrée en superficie et en profondeur, le volume de la plaie est important
<b>Avantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les tissus adjacents ne sont pas traumatisés.</li> <li>- Technique utilisée sur tous les animaux.</li> <li>- Les plaies se cicatrisent rapidement.</li> </ul>	Des biopsies sont aisément réalisables aux différents stades de la cicatrisation permettant de récupérer des quantités suffisantes de matériels tissulaires.
<b>Inconvénients</b>	Non adapté pour des analyses histologiques ou pour l'étude de l'épithélialisation	
<b>Domaines d'application</b>	Utilisé pour réaliser des analyses biomécaniques notamment de résistance cicatricielle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Des biopsies sont aisément réalisables aux différents stades de la cicatrisation permettant de récupérer des quantités suffisantes de matériels tissulaires.</li> <li>- Etudes de l'épithélialisation de granulation et de l'angiogenèse</li> <li>- Analyses histologiques, biochimiques et moléculaires.</li> </ul>

**Tableau 1** : Modèles des plaies expérimentales.

## I.9 QU'EST-CE QUE L' HYDROXYPROLINE ?

L'hydroxyproline est un acide aminé présent principalement dans le collagène, protéine de la trame osseuse, du tissu conjonctif et de la peau. Avec la proline, son précurseur, elles représentent 25 à 30% des acides aminés totaux formant le collagène.

Le collagène est la protéine la plus abondante du corps humain. Si l'on décompose le mot « collagène », nous obtenons « tige de kola » qui veut dire « colle » et « gennen » qui signifie « produire ». Ainsi, on pourrait définir le mot « collagène » comme étant une « colle » qui retient et forme l'ensemble de tous les tissus conjonctifs du corps (os, cartilages, muscles, tendons, ligaments, peau...). Sans cette « colle » de notre corps, nous ne serions qu'une « flaque d'eau ».

Le collagène est une protéine fibreuse, sécrétée par les fibroblastes et assemblée à l'extérieur des cellules, dans la matrice extracellulaire. Il se retrouve dans tous les tissus. Les tissus qui contiennent du collagène sont plus résistants et ont davantage d'élasticité comparativement à ceux qui n'en possèdent pas.

Le collagène est composé principalement de trois acides aminés :

La glycine pour 35%, la proline pour 7 à 9 % et l'hydroxyproline pour 12 à 14% (selon les types de collagènes).

Lors de la synthèse du collagène, les fibroblastes synthétisent le tropocollagène, le précurseur du futur collagène. L'hydroxylation des prolines du tropocollagène en hydroxyproline est la réaction cruciale de synthèse du collagène. Il semblerait que l'hydroxylation de la proline soit post-traductionnelle. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la prolyl hydroxylase, en présence de vitamine C. L'hydroxylation contribue à :

- stabiliser la molécule de collagène, grâce à la formation de liaisons covalentes entre les différentes chaînes polypeptidiques voisines.
- protéger les protéines contre la digestion par les protéases.
- permettre une bonne sécrétion dans l'espace intercellulaire.

Au cours du turnover du collagène, ses deux acides aminés sont relargués sous forme soit libre soit de dipeptides. La partie non métabolisée est éliminée dans les urines. La mesure de

l'hydroxyproline libre et liée, dans les urines, permet d'évaluer le métabolisme du collagène et ses dysfonctionnements.

### **I.10 MECANISMES D'ACTION / PREUVES D'EFFICACITE**

L'hydroxyproline agit au niveau de l'épiderme et du derme et entraîne l'augmentation de la synthèse :

- Des céramides, via l'activation de la prolifération des kératinocytes au niveau de l'épiderme [72-73]. Le dipalmitoyl hydroxyproline a été décrit comme facteur de réparation de l'épiderme, notamment comme agent cicatrisant. Il est présenté comme agent améliorant l'aspect de la peau humaine, notamment dans les cas de vieillissement, en accroissant son épaisseur. L'hydroxyproline aurait une action sur le photo-vieillessement et plus particulièrement sur les rides [73].
- Du collagène par les fibroblastes, par une action indirecte sur le derme [72-73]. Une étude *in vivo* en hémi visage, sur 15 femmes âgées de 44 à 55 ans, montre les effets de l'hydroxyproline formulée en émulsion à 1% versus un placebo (application biquotidienne pendant 1 mois). Le relief cutané de la patte d'oie et le taux d'hydratation sont évalués. Pour 60% du panel, l'hydroxyproline tend à diminuer la profondeur des rides moyennes de 3%, la surface ridée de 35% vis-à-vis du placebo. Le taux d'hydratation est augmenté de 18% [74].

# **Partie expérimentale**

## II MATÉRIEL

### II.1 Matériel non biologique

L'appareillage, les produits chimiques et les réactifs utilisés lors de l'expérience sont cités dans l'annexe 01.

### II.2 Matériel biologique

Dans notre étude, le matériel biologique utilisé est essentiellement du matériel végétal composé de racines de *Centaurea africana* et de rats albinos.

#### a- Matériel végétal

Partie souterraine de *Centaurea africana* (racines).

#### b- Animaux expérimentaux

Espèce : Rats albinos

Souche : Wistar

Sexe : Mâle

Poids :  $200 \pm 20$  g

Nombre : 6 rats par lot (04 lots).

Nourriture : Granules (aliments pour animaux de laboratoire).

Boisson : Eau ad libitum.

### II.3 MÉTHODES

#### II.3.1 Préparations d'extrait méthanolique de *Centaurea africana*

Les racines séchées de *C. africana* sont toutes écrasées à l'aide d'un mortier traditionnel puis par un mixeur électrique afin d'obtenir une poudre fine [75].

La poudre végétale ainsi récupérée est placée dans des sacs en papier, à l'abri de la lumière pour éviter l'oxydation de ces composants. Cette poudre est soumise ensuite à l'extraction.

Une quantité de 50 g de poudre végétale est pesée puis versée dans un Erlenmeyer. Un volume de 500 ml du solvant hydro-méthanolique (400 ml méthanol + 100 ml d'eau distillée) est ajouté dans l'Erlenmeyer.

Enveloppé avec du papier aluminium pour éviter tout contact de la solution avec la lumière, le mélange poudre-solvant est laissé sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique durant 72 heures.

La filtration de la solution est effectuée sur du coton hydrophile puis à travers un papier filtre. Le filtrat obtenu est placé dans des ballons qui sont par la suite disposés dans un rota vapeur.

L'étape finale de l'extraction est la lyophilisation réalisée sous vide sous une pression de 0,627 mbar et une température de - 49°C.

Cette étape assure, non seulement une bonne séparation de l'extrait pur de *Centaurea africana* des solvants organiques, mais permet aussi de calculer le poids en gramme de lyophilisat résultant du traitement de 50 g de poudre végétale.

Une quantité de 200 mg du lyophilisat de chaque extrait est récupérée dans 10 ml de DMSO et conservée à 4°C dans de petits flacons en verre ambré.



**Figure 3 :** Etapes du processus d'extraction hydro-alcoolique (photos personnelles)

### II.3.2 ETUDE DE L'ACTIVITE CICATRISANTE

#### 1) La répartition des lots

L'étude de l'activité cicatrisante a été réalisée sur 24 rats répartie en 4 lots (6 rats/lot) comme il est indiqué dans le **tableau 2**

Lots	Traitements
Lot I	Traitement par la pommade véhicule
Lot II	Traitement par la pommade à base d'extrait méthanolique à 5%
Lot III	Traitement par la pommade à base d'extrait méthanolique à 10 %
Lot IV	Traitement par produit de référence Cycatril <sup>R</sup>

**Tableau 2** : Répartition des rats selon les lots.

#### 2) Préparation des animaux

- La veille de l'expérimentation les animaux sont pesés, marqués au niveau de leur queue et répartis selon leur lot comme indiqué ci-dessus.

La première étape de l'expérimentation consiste à l'épilation de la région dorsolombaire de tous les rats sous anesthésie par injection intrapéritonéal à la Thiopental.

#### 3) Induction des blessures

##### a- Une plaie par excision

Le principe consiste à l'application sur des plaies préalablement provoquées du produit à tester (pommade de *Centaurea africana*) et d'un produit cicatrisant de référence Cycatril®.

Les applications ont été faites quotidiennement jusqu'à épithélialisation complète de la plaie (environ 15 jours). Cette étude permis de comparer les différentes cicatrices et leur évolution sur la base de la modification de la surface de la cicatrice.

**❖ Mode opératoire**

Après avoir préparé les lots de rats (animaux marqués et épilés, cage étiquetées), les animaux de ces lots sont laissés à jeun la veille de l'expérimentation qui se déroule selon les étapes suivantes :

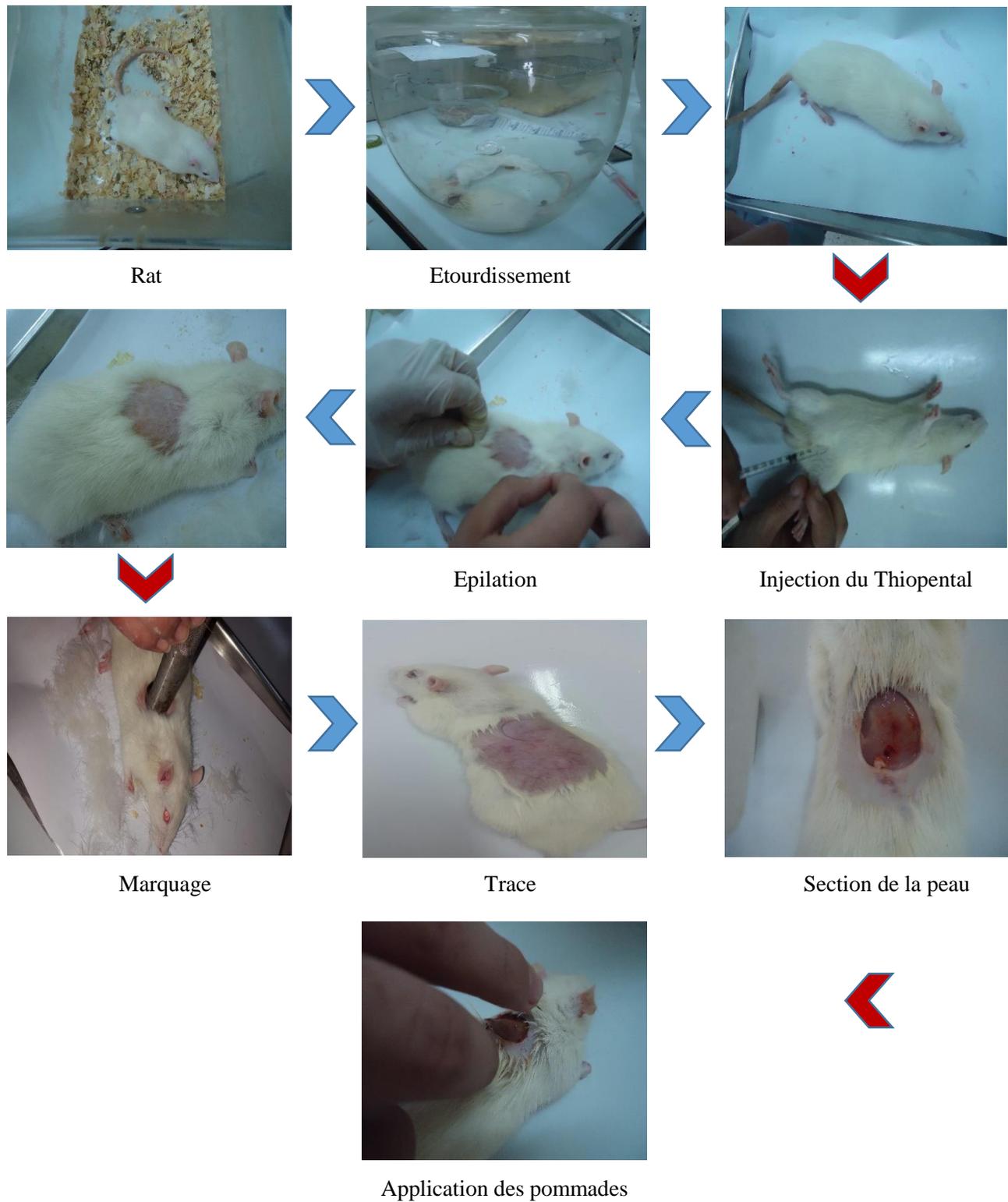
- Anesthésie des rats par injection de la Thiopental.
- Découpe des zones tracées par l'emporte-pièce en utilisant des lames à bistouri et une pince pour enlever la peau coupée.
- Prise immédiate d'empreintes des surfaces des plaies (essai et témoins) sur papier transparent à l'aide de feutres à encre indélébile dès le jour J<sub>0</sub> et après au J<sub>4</sub>, J<sub>8</sub>, J<sub>12</sub>, J<sub>16</sub> et J<sub>24</sub>
- Calculs des surfaces des plaies à l'aide de logiciel d'architecture AutoCAD 2010.

**4) Application des traitements**

L'application des produits à tester se fait quotidiennement sur les plaies (essais) jusqu'à épithélialisation complète. En contrepartie les autres plaies (témoins) n'ont reçu aucun traitement

- Lot I : a reçu une application dermique quotidiennement avec la pommade véhicule.
- Lot II : a reçu une application dermique avec la pommade à base d'extrait méthanolique à 5%.
- Lot III : a reçu une application dermique avec la pommade à base d'extrait méthanolique à 10%.
- Lot IV : a reçu une application du produit de référence Cycatril®.

Les plaies sont ainsi traitées de façon quotidienne pendant tous les tests.



**Figure 4** : Induction des plaies par excision, plus application des pommades (photos personnelles).

Une observation macroscopique est réalisée aux jours J<sub>0</sub>, J<sub>4</sub>, J<sub>8</sub>, J<sub>12</sub> et J<sub>18</sub>. Il est à noter qu'à chaque prélèvement d'empreintes, s'il y a apparition de croûte, il est indispensable de bien décoller celle-ci à l'aide de la gaze imbibée d'eau physiologique à 0,9% pour une bonne prise d'empreinte de la surface des plaies.

### II.3.3 Dosage de l'hydroxyproline

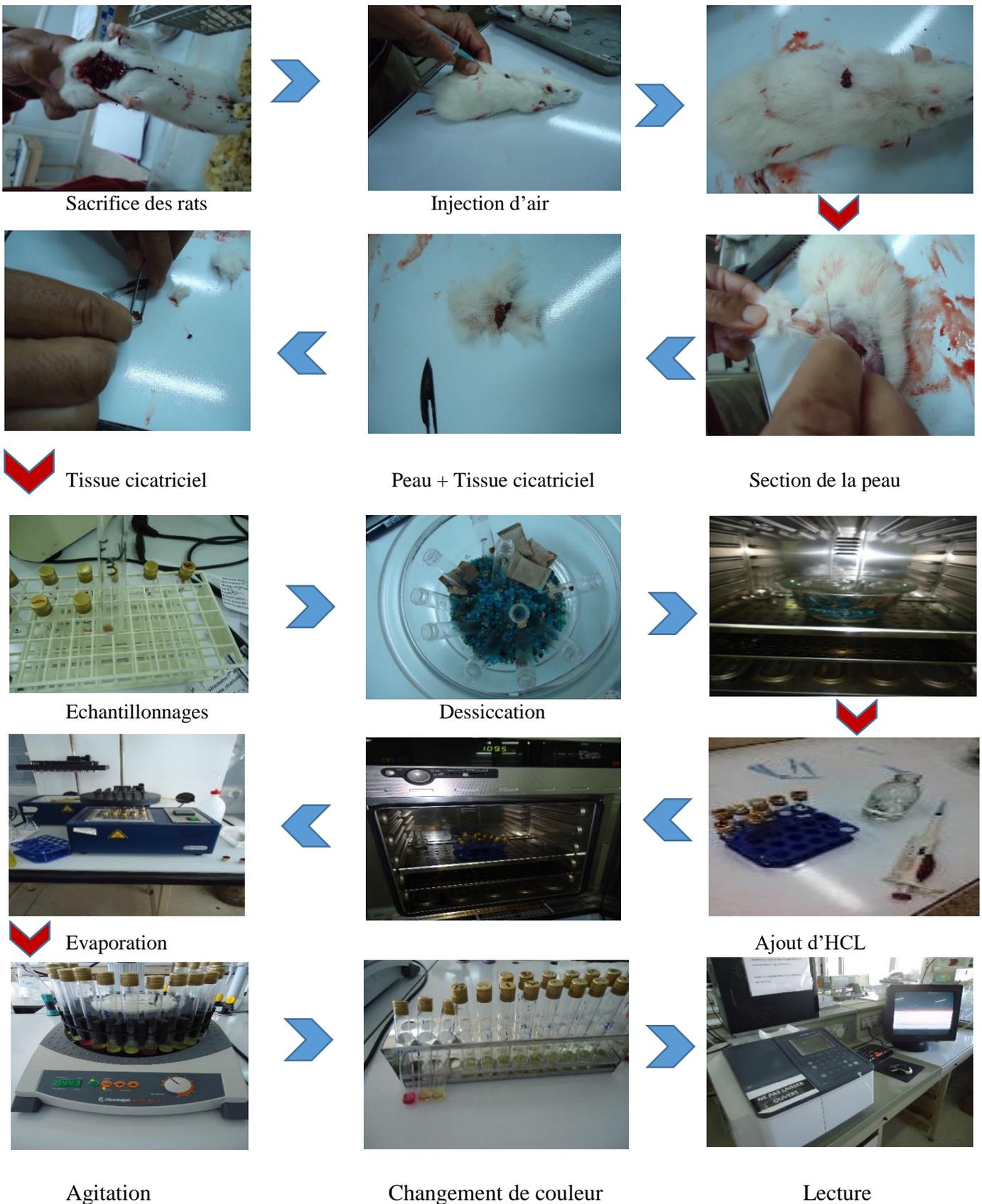
Le dosage de l'hydroxy proline est réalisé selon le protocole décrit par Boyd R.Switzer [76].

- Une quantité de 25 à 350 mg du poids du tissu est placée dans le tube de culture sec (de poids connu).
- Les échantillons sont séchés dans un four à 65°C pendant 18 à 24 heures, puis laissés dans des tubes à température ambiante dans un dessiccateur pour refroidir.
- Un volume de 2 ml 6N de HCL est ajouté pour hydrolyser les échantillons à 110 °C pendant 24 heures.
- Les échantillons sont évaporés à sec avec un courant d'azote puis mélangés dans chaque tube avec 10 ml l'eau déminéralisée.

#### II.3.3.1 Détermination d'hydroxy proline

- Transférer 0,2 ml d'hydrolysate dans un tube de culture propre puis ajouter 1,6 ml d'eau déminéralisée.
- Préparer un ensemble de tubes contenant des quantités d'hydroxy proline connues (1,0 - 8,0 ug) et de l'eau comme réactif blanc.
- Ajouter à tous les tubes 1.0 ml de tampon borate dilué à 1/5.
- Ajouter la Chloramine T (0,3 ml) à chaque tube dans une séquence chronométrée pour oxyder l'hydroxyproline et bien mélanger.
- Après 20 min, ajouter 1,0 ml de thiosulfate de sodium et bien mélanger.
- Ajouter environ 1,5 g de chlorure de potassium pour saturer tous les tubes.
- Fermer et chauffer les tubes dans de l'eau bouillante pendant 20 minutes.
- Laisser les tubes refroidir jusqu'à température ambiante.
- Ajouter 2,5 ml de toluène dans les tubes et les boucher fermement.

- Secouer les tubes pendant environ 5 min et les mettre brièvement à centrifuger à vitesse basse.
- Transférer 1,0 ml extrait du toluène dans les tubes à essai marqués et ajouter le réactif d'Ehrlich (0,4 ml).
- Laisser la couleur se développer pendant 30 min.
- A l'aide du densitomètre, lire les absorbances à la longueur d'onde 565 nm comparativement à un blanc de réactif.



**Figure 5 :** Protocole du dosage de l'hydroxyproline (photos personnelles).

## **II.4 Evaluation de la cytotoxicité in vitro de l'extrait méthanolique de la plante « Centaurea Africana »**

Méthode alternative à l'évaluation du potentiel irritant expérimenté sur cellules fibroblastiques, basé sur l'évaluation de la cytotoxicité d'un produit testé.

Cette méthode est adoptée pour les produits hydro-dispersibles et hydrophiles, et non pour les produits volatils ou contenant des substances volatiles ou présentant un pH extrême

Le protocole d'étude de la cytotoxicité est réalisé suivant la méthode décrite dans le journal officiel [77].

### **II.4.1 Chronologie expérimentale**

#### **Ensemencement des cellules**

- Trypsination et comptage des cellules fibroblastiques ATCC pour obtenir une suspension cellulaire, les ensemercer en microplaque de 96 puits à raison de 10000 cellules /1ML de DMEM/puits sans agitation à incuber à 37°C, 5% CO2 pendant 24h.
- Contact avec le produit de l'essai qui est l'extrait de la plante centaurea Africana.
- Elimination délicate du milieu de culture.
- Rinçage des puits des microplaques avec 2 ml de PBS (pour éliminer les débris et les traces du milieu).
- Récupération de 1,0 ml des extraits après leurs stérilisations par filtration et les déposer dans les 18 puits selon les concentrations étudiées (0,5% - 5% - 10% - 30% - 50% - 70 % et 100%) avec les 2 témoins positifs traités avec un anti-cancéreux et le témoin négatif.

#### **Coloration cellulaire**

- Préparation de la solution mère de rouge neutre à 4% dans l'eau distillée stérile.
- Dilution au 1/80 dans le milieu de culture nutritif (DMEM).
- Incubation de la solution durant 18h à 24h.
- Elimination du milieu de culture dans chaque puits.
- Centrifugation du colorant à 3000T/mn durant 6 minutes après les dépôts de 1,0 ml dans chaque puits de microplaque, puis incubation pendant 3 heures.
- Préparation de la solution d'acide acétique glacial à 1% dans l'éthanol 50°. Cette solution sert à l'extraction afin d'éclater les cellules.

- Rajout de 1,0 ml de la solution de revelation et agitation de la microplaque modérément pendant 15 mn.
- Lecture des DO à 540 nm sur lecteur de microplaque.



Décongélation



Flasque avec cellule fibroblastique



Tripsination



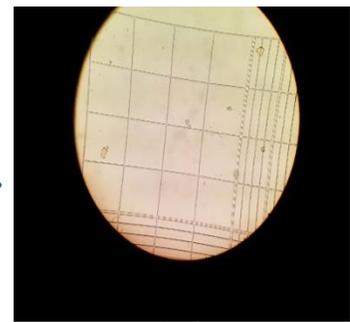
Cellule ATCC



Dépôt sur cellule de malassez



Comptage



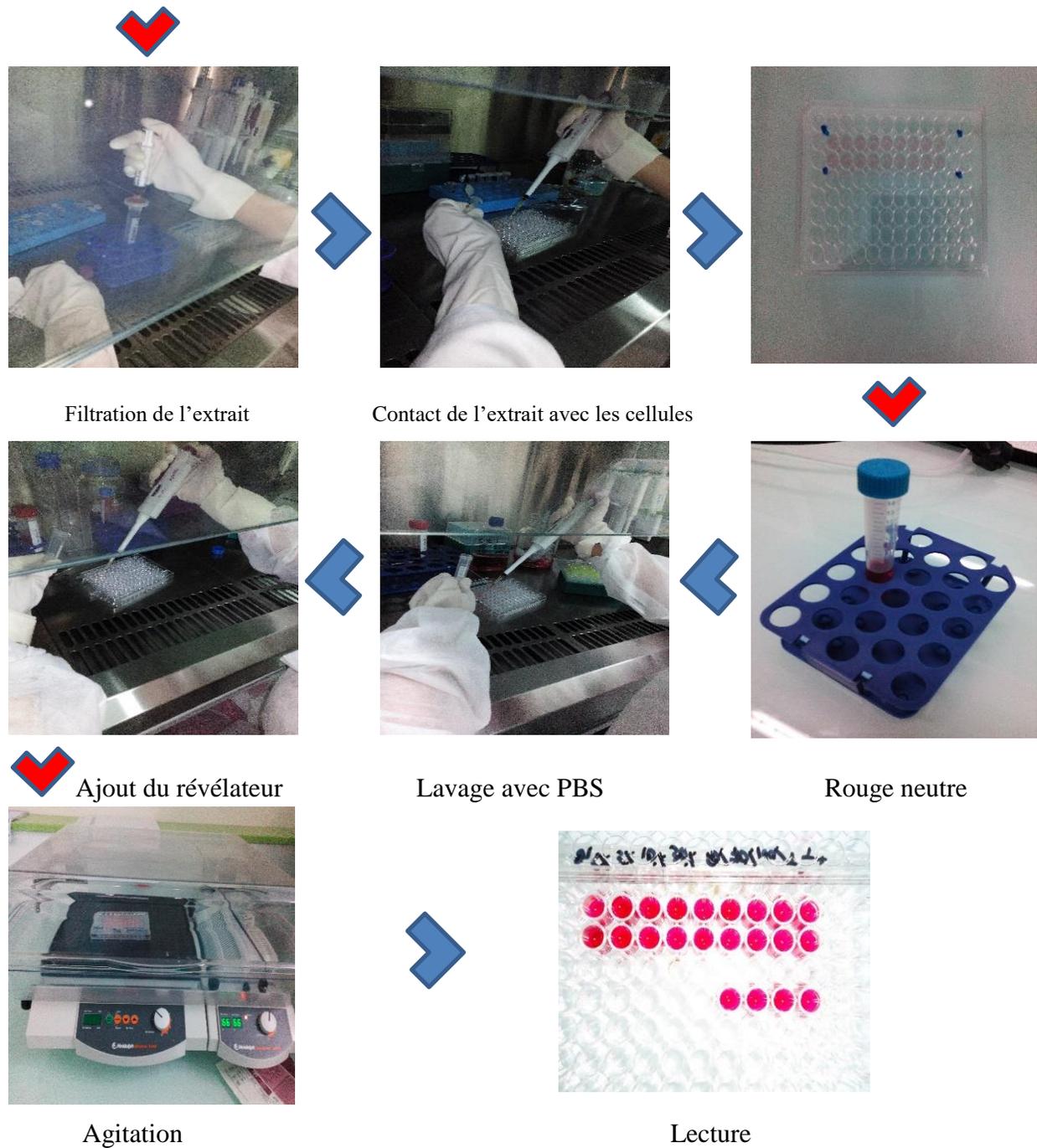
Extrait



Incubation



Encensement sur micro plaque



**Figure 6 :** Démarche expérimental suivi pour évaluer la cytotoxicité in vitro de l'extrait méthanolique de la plante « Centaurea Africana » sur les cellules fibroblastiques ATCC.

### III. Résultats et discussions de l'activité cicatrisante

#### III.1 Evaluation de l'activité cicatrisante

Les paramètres d'évaluation de la cicatrisation d'une plaie sur modèle par excision sont fournis par :

- Le calcul des superficies des plaies à l'aide de logiciel AutoCAD.
- Le calcul des pourcentages de réduction des superficies des plantes traitées par le produit de référence **Cicatryl<sup>R</sup>** et celles traitées par la pommade de « **extrait méthanolique de racine de Centaurea africana** ».

Ce pourcentage de la réduction est calculé comme suit :

$$\% \text{ Réduction (produit de référence)} = \frac{\mu_{CE1} J_0 - \mu_{CE2} J_n}{\mu_{CE1}} \times 100$$

Avec :

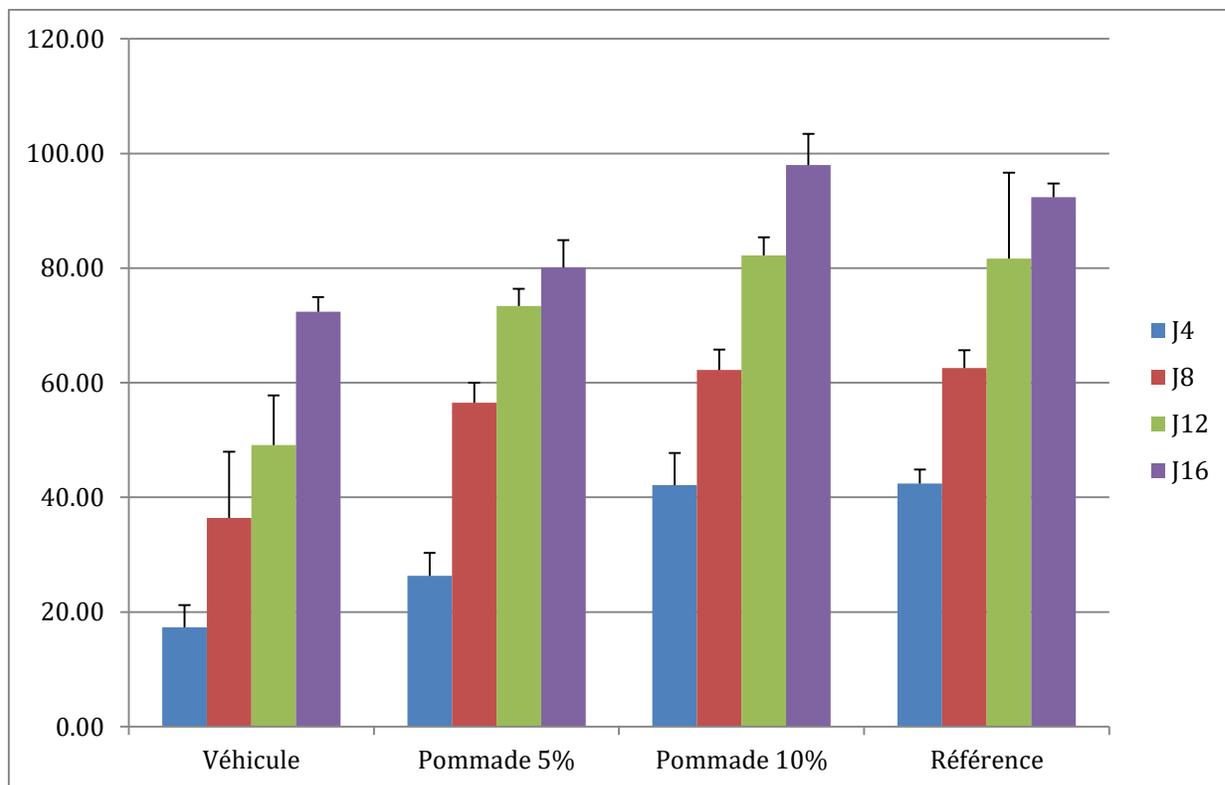
$\mu_{CE1}$  : La moyenne de la superficie des plaies traitées par le produit de référence.

$\mu_{CE2}$  : La moyenne de la superficie des plaies traitées par les produits à tester.

#### III.1.1. Évolution des superficies des plaies :

##### III.1.1.1 Évolution des superficies des différents lots :

Les résultats de l'évolution des superficies des plaies témoins et essais au cours de 15 jours sont illustrés dans la figure suivante.

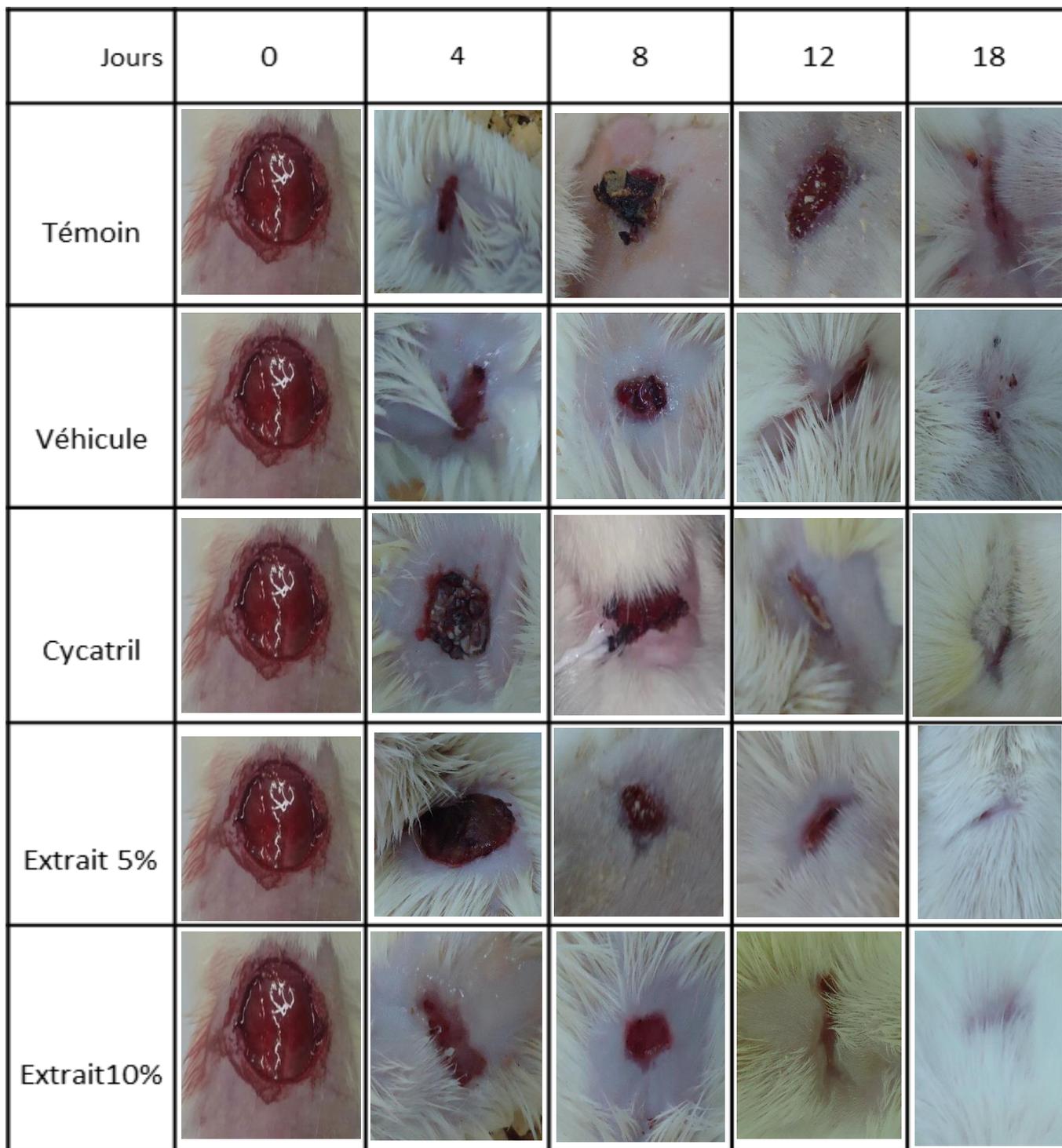


**Figure 7** : Histogramme représentant les pourcentages de réduction des superficies des plaies de J0 à J16, chez les rats témoins, traités par la pommade à base d'extrait méthanolique à deux concentrations (5 et 10 %) et le produit de référence Cycatril<sup>®</sup>.

Les taux (%) obtenus de réduction des superficies des plaies, démontrent que les rats traités par la pommade de la plante « **Centaurea africana 10%** » donnent un pourcentage de réduction significatif (97,99%) au 16<sup>ème</sup> jour (J16) comparativement à ceux qui ont subi les traitements par la pommade véhicule (72,37%) et le produit de référence (90,32%). Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux obtenus par Dezső 2010 et al [78] ainsi que Ufuk et al 2009 [79] qui ont travaillé sur la meme espèce de centaurea.

### III.1.1.2 Etudes macroscopiques :

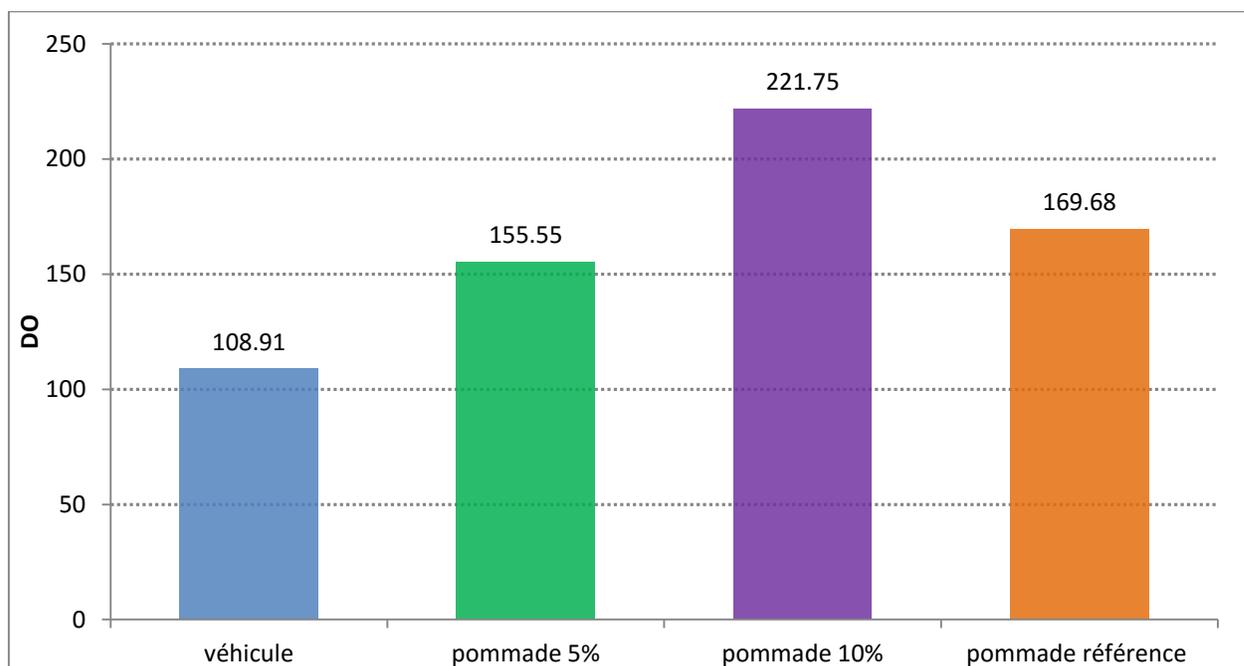
L'observation des plaies des rats révèle une diminution de leurs surfaces au fil du temps. On peut voir aisément une diminution plus marquée de la surface des plaies chez les rats traités par la pommade formulée à 10%,5%, que chez les rats traitées par Cycatril<sup>®</sup> ainsi que chez les témoins.



**Tableau 3** : Evolution macroscopique des surfaces des plaies chez les rats traités par la pommade formulée à 10%,5%, chez les rats traitées par Cycatril® ainsi que chez les témoins durant 18 jours (J<sub>0</sub> J<sub>4</sub> J<sub>8</sub> J<sub>12</sub> J<sub>18</sub>).

### III.2 Résultats du dosage de l'hydroxyproline :

La mesure de l'hydroxyproline est utilisée comme un indicateur pour chiffrer le taux de collagène. Dans notre étude, la quantité de l'hydroxyproline dans les échantillons des cicatrices chez les lots des rats traités par l'extrait formulé de *Centaurea africana* à 5% et 10% et par le produit de référence (Cycatril®) était significativement élevée (\*p < 0,05) par rapport au lot témoin. Les résultats obtenus sont consignés dans le graphe (Figure 8).



**Figure 8 :** Evaluation de la teneur en hydroxyproline dans les échantillons des cicatrices chez les lots des rats traités par l'extrait formulé de *Centaurea africana* à 5% et 10% et par le produit de référence (Cycatril®).

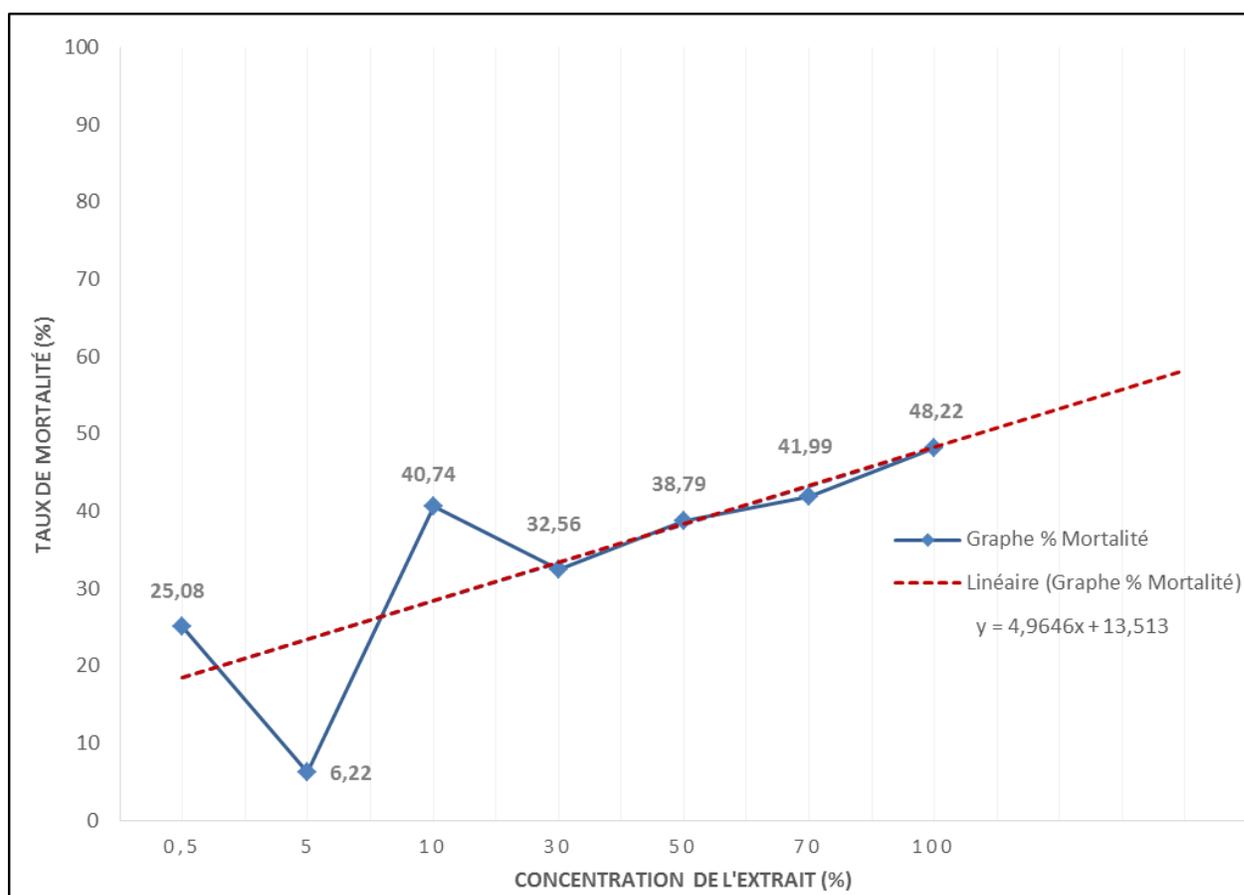
Les résultats obtenus corroborent les travaux de Tabatabai 2014 [80] et Agrawa 2010 [81] qui ont mis en évidence la rapidité de la contraction des plaies et le raccourcissement du temps d'épithélialisation avec une augmentation de la teneur en hydroxyproline, respectivement par application topique de gel de *Calendula officinalis* et de *Procumbens Tridax* plantes appartenant à la famille des astéracées.

### III.3 Résultats de l'étude de la Cytotoxicité :

Le pourcentage de mortalité cellulaire est calculé pour chaque dilution du produit de l'essai selon la formule :

$$\% \text{ mortalité} = 100 - \frac{DO \text{ moy des puits traités}}{DO \text{ moy du puit témoin}} * 100$$

La courbe des pourcentages de mortalités est tracée en fonction de la concentration du produit à l'essai



**Figure 9** : La courbe des pourcentages de mortalités en fonction de la concentration du produit à l'essai (extrait méthanolique).

Les résultats obtenus nous indiquent qu'à la concentration de 50%, le taux de mortalité est de 38,79%. Le taux de viabilité correspondant est donc de 61,11%.

Selon La classification du **Journal officiel de la république française, 26 décembre 1996, page 19818-19818-19819.voir tableau n°04** la cytotoxicité de notre extrait est peu importante puis qu'elle est comprise entre 20 et 50%.

La cytotoxicité du produit est donnée par l'échelle du tableau suivant qui est tiré du Journal officiel.

<b>CI50</b>	<b>Pourcentage de mortalité observé à la dilution 50%</b>	<b>Classification</b>
> 50	$\leq 20$	Cytotoxicité négligeable
> 50	> 20 et < 50	Cytotoxicité peu importante
> 25 et $\leq 50$		Cytotoxicité modérée
$\leq 25$		Cytotoxicité importante

**Tableau 4** : Classification de la cytotoxicité en fonction du pourcentage de mortalité observé à la dilution 50%.

# Conclusion

---

## IV CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

---

Les plaies, les brûlures et les coupures constituent un motif fréquent de consultation dans les services d'urgence en médecine humaine et vétérinaire qui sont souvent à l'origine des complications infectieuses graves tels les abcès, la gangrène et les phlegmons. Elles peuvent aussi entraîner des problèmes moteurs en cas de lésions nerveuses, tendineuses ou articulaires négligées. Pour différentes raisons, la population concernée par ce type de lésions a souvent recours à la médecine traditionnelle pour la prise en charge de ces maux.

De manière générale, l'observation et les expériences vécues ont été le fil conducteur dans l'utilisation des plantes à des fins curatives. Depuis, de nombreuses études sont venues prouver l'efficacité des plantes médicinales à différents stades de la cicatrisation des plaies [82].

Dans notre contribution, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet cicatrisant d'une pommade préparée à base d'extrait méthanolique de poudre de racine *Centaurea africana* sur un modèle par excision chez le rat Wistar.

La mesure de l'hydroxyproline a été utilisée comme un indice fiable pour chiffrer le collagène et également comme un bio-marqueur précoce de la cicatrisation lors de l'augmentation continue de l'hydroxyproline dans les tissus cicatrisés.

Ainsi, le suivi des dosages de l'hydroxyproline contenu dans les tissus des rats traités par rapport aux rats recevant la pommade véhicule a confirmé la synthèse accrue du collagène indiquant une cicatrisation importante de la plaie.

L'application topique de nos deux pommades, respectivement de concentrations de 5 et 10 % d'extrait méthanolique a montré une accélération significative de contraction des berges cutanées des plaies des rats traités comparativement aux lots véhicules (sans principe actif).

En outre, l'évaluation de la toxicité cutanée réalisée par la méthode *in vitro* sur la lignée cellulaire épithéliale d'origine humaine (cellule fibroblastique) ATCC ccd-986SK (ATCC CRL - 1947) a montré que lorsque la concentration de notre extrait est de 50%, la cytotoxicité du produit est peu importante et se situe à un taux de mortalité de 38,79%. En conséquence, notre produit est peu ou pas toxique et ne présente aucune dangerosité avérée.

Ces résultats restent préliminaires, il serait souhaitable de poursuivre les investigations en procédant à l'isolement des substances responsables, à l'étude de ses diverses activités ainsi qu'à l'identification des composés par des méthodes plus performantes. Pour mieux évaluer l'activité anti-oxydante, d'autres études in Vitro et in Vivo seraient intéressantes, afin de mettre à la disposition des populations une plante active avec des posologies précises.

---

# V REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [1] Kühnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition.
- [2] Middleton Jr, E., Kandaswami, C., & Harborne, J. B. (1994). The flavonoids: advances in research since 1986
- [3] Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- [4] Bitar, I. E. (1980). Mofradat Al-Adwiah Wa Al-Agzia. *Al-Zharia Press, Cairo, Egypt*, 148.
- [5] Mitchell, W. J., & Breyer-Brandwijk, M. G. (1962). The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. *E and S Livingstone Ltd., Edinburgh and London*.
- [6] Monya, M.; Racz, G. Content of flavonosides in some species of the genus *Centaurea* L.I. Chromatographic studies. *Plant Med. Phytother.* 1974, 8, 126.
- [7] Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M. and Girrel, L. (1992). *Pharma. Acta. Helvena*, 67, 178.
- [8] Gonzalez, A. G., Bermejo, J., Caberar, I., Galido, A., & Masenet, G. M. (1977). Sesquiterpene lactones from *Centaurea Alba* and *C. conifera*. *Ann. Quim*, 73, 86.
- [9] Teresa, L. D. P., Caballero, E., Anaya, J., Caballero, C., & Gonzalez, M. S. (1986). Eudesmanolides from *Chamaemelum fuscatum*. *Phytochemistry*, 25(6), 1365-1369.
- [10] Medjroubi, K. (1999). Thèse de doctorat d'état, Université Mentouri-Constantine.
- [11] Massiot, G., Morfaux, A. M., Le Men-Olivier, L., Bouquant, J., Madaci, A., Mahamoud, A., & Aclinou, P. (1985). Guaianolides from the leaves of *Centaurea incana*. *Phytochemistry*, 25(1), 258-261.
- [12] Bentamène, A., Benayache, S., Crèche, J., Petit, G., Bermejo-Barrera, J., Leon, F., & Benayache, F. (2005). A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L.(Asteraceae). *Biochemical systematics and ecology*, 33(10), 1061-1065.

- [13] Christensen, L.P., & Lam, J. (1990). Acetylenes and related compounds in Cynareae. *Phytochemistry*, 29(9), 2753-2785.
- [14] Benayache, F. (1992). Benayache. S. Medjroubi, K., Massiot, G., Aclinou. P., Drozdz. B. and Nowak, G... *Phytochemistry*, 31, 4360.
- [15] Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N., & Aclinou, P. (1997). Guaianolides from *Centaurea musimomum*. *Phytochemistry*, 45(7), 1449-1451.
- [16] Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Kaabeche, M., Tillequin, F., & Seguin, E. (1998). Eudesmanolide from *Centaurea granata*. *Phytochemistry*, 49(8), 2425-2427.
- [17] Serin, S. (1997). Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*. *Phytochemistry*, 46(3), 545-548.
- [18] Ahmed, Z. F., Hammouda, F. M., Rizk, A. M., & Ismail, S. I. (1971). Phytochemical studies of certain *Centaurea* species. *Planta medica*.
- [19] Kurmaz, B. V. (1961). [Chemical investigations on *Centaurea breviceps* Iljin alkaloids]. *Farmatsevtichnyi zhurnal*, 17, 40-44.
- [20] Bohlmann, F., Burkhardt, T., & Zdero, C. (1973). *Naturally occurring acetylenes*. London: Academic Press.
- [21] Christensen, L. P. (1991). Flavones and other constituents from *Centaurea* species. *Phytochemistry*, 30(8), 2663-2665.
- [22] Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., & Tillequin, F. (2003). Flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia*. *Chemistry of natural compounds*, 39(2), 219-220.
- [23] Kamanzi, K., Raynaud, J., & Voirin, B. (1982). The flavonoid glycosides from *centaurea-melitensis* l (compositae). *pharmazie*, 37(6), 454-455.
- [24] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., and Jay, M. (1997). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 361.

- [25] Fleurentin, J. (1991). *Ethnopharmacologie : sources, méthodes, objectifs : actes du 1er Colloque européen d'ethnopharmacologie, Metz, Centre Internationale des Congrès, 23-25 mars 1990* (Vol. 1). IRD Editions.
- [26] Trease, G. E., & Evans, W. C. (1983). Textbook of pharmacognosy. 12th edition (Balliere. Tindall, London).
- [27] Quezel, P. et Santa, S. (1963): Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome II, Edition CNRS, Paris.
- [28] Kobayashi et al. Frag J, Manufacture and physiological activities of hydroxyproline. 31(3): 37-43. 2003.
- [29] Fox C. From Self-tanners to sunscreens as skin protectants *Cosmetics&Toiletries* 118(10): 26-32. 2003.
- [30] Miquey-Pallandre PL et al, Derscan, Evaluation et comparaison des effets anti rides, hydratant et raffermissant d'un actif formulé contre un placebo. n°98609.
- [31] Wichtl M., Anton R. Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème édition, Ed. TEC & DOC, 2003.
- [32] Jamet J.-F. Phytothérapie n°25. Phytothérapie et médecines naturelles, p.10, Institut National de Phytothérapie et Collège Français des Médecines de Terrain et Sciences Appliquées, juin 1988.
- [33] Prescrire. Bien utiliser les plantes en situations de soins, numéro spécial été 2007, T. 27, n° 286.
- [34] Leclerc H. Traité de phytothérapie - Thérapeutique par les plantes, Ed. Masson, 1999.
- [35] Edzard E. The desktop guide to complementary and alternative medicine, 2ème edition, Grande-Bretagne, Ed. Mosby, 2001.
- [36] Moreau B., maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie, 2003.

- [37] Institut Européen des Substances Végétales (page consultée le 15/10/08). Phytothérapie clinique individualisée : pour une médecine des substances végétales. <http://www.iesv.org/phytotherapie.php>.
- [38] Monnier C. Les plantes médicinales - vertus et traditions, Ed. Privat, 2002.
- [39] Agence du Médicament. Les Cahiers de l'Agence 3 - Médicaments à base de plantes, Paris, 1998.
- Arnal-Schnebelen B., Les entretiens du Carla (page consultée le 22/10/09). La Phytothérapie de seconde génération. <http://www.entretiens-ducarla.com/publication.php>.
- [40] Sevenet T. Plantes, molécules et médicaments, Paris, Ed. Nathan, CNRS éditions, 1994.
- [41] Académie des sciences (page consultée le 19/09/08). Fonds Charles Marie de La Contamine. [http://www.academiesciences.fr/archives/fonds\\_archives/Condamine/archives\\_Condamine\\_oeuvre.htm](http://www.academiesciences.fr/archives/fonds_archives/Condamine/archives_Condamine_oeuvre.htm).
- [42] Debuigne G. Larousse des plantes qui guérissent, Ed. Larousse, 1974.
- [43] Pelt J.-M. Les drogues. Leur histoire, leurs effets, Ed. Doin, 1980.
- [44] Mansar-Benhamza, I., Watrelot, D., Sarsat, J., & Gastellu, J. (2008). Les tumeurs mammaires chez la chienne: étude histologique. *sciences & technologie c*, (27), 57-66.
- [45] Iserin, P., Masson, M., & Restellini, J. P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparations, soins. *Larousse, Paris*.
- [46] Bernardo Ticli, De Vecchi., (1997). L'herbier de la santé.
- [47] Duraffourd, A., & Duraffourd, J. M. (1987). *U.S. Patent No. 4,668,516*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [48] Trevithick, J. R., Creighton, M. O., Sanwal, M., Brown, D. O., & Bassen, H. I. (1987). Histopathological studies of rabbit cornea exposed to millimeter waves. In *Proc. Ann. Conf. IEEE EMBS* (Vol. 9, pp. 695-697).
- [49] Malan, K., Dusart, G., Marion, C., Loukou, Y., Simeon, M., De Buochberg Pélissier, Y., & Attisso, M. (1986). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Hyptis pectinata* L. *Plant. Méd. Phytothér.*, 20(4), 323-329.
- [50] Denoël, A. (1958). *Matière médicale végétale: pharmacognosie*. Presses Universitaires de Liège.

- [51] Chief, R. (1982). Les plantes médicinales. *Solor*, 2276-2277.
- [52] Youn, B. S., Zhang, S. M., Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Antol, K., Fraser, M., & Kwon, B. S. (1998). Characterization of CK $\beta$ 8 and CK $\beta$ 8-1: two alternatively spliced forms of human  $\beta$ -chemokine, chemoattractants for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and potent agonists at CC chemokine receptor 1. *Blood*, 91(9), 3118.
- [53] Hostettmann, K., Potterat, O., & Wolfender, J. L. (1997). Strategy in the search for new bioactive plant constituents. *Pharmazeutische Industrie*, 59(4), 339-347.
- [54] Radny, P., Eigentler, T. K., Soennichsen, K., Overkamp, D., Raab, H. R., Viebahn, R., ... & Rassner, G. (2006). Metastatic glucagonoma: treatment with liver transplantation. *Journal of the American Bloor*, D., & EBNOTHER, D. (1976). Sociologie de la logique. Les limites de l'épistémologie. *Academy of Dermatology*, 54(2), 344-347.
- [55] Barbier, B., Ouedraogo, H., Dembélé, Y., Yacouba, H., Barry, B., & Jamin, J. Y. (2011). L'agriculture irriguée dans le Sahel ouest-africain. *Cahiers Agricultures*, 20(1), 24-33.
- [56] Bayer, R. J., & Starr, J. R. (1998). Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the trnL intron and trnL/trnF intergenic spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 242-256.
- [57] C., Guignard, B., Fletcher, D., Sessler, D. I., Dupont, X., & Chauvin, M. (2001). Intraoperative small-dose ketamine enhances analgesia after outpatient knee arthroscopy. *Anesthesia & Analgesia*, 93(3), 606-612.
- [58] Quézel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales-v. 1-2.
- [59] García-González, R. (1984). L'emploi des épidermes végétaux dans la détermination du régime alimentaire de l'Isard dans les Pyrénées occidentales.
- [60] Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N., & Aclinou, P. (1997). Guaianolides from *Centaurea musimomum*. *Phytochemistry*, 45(7), 1449-1451.
- [61] Flamini, G., Ertugrul, K., Cioni, P. L., Morelli, I., Dural, H., & Bagci, Y. (2002). Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C. pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* and *C. hadimensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(10), 953-959.
- [62] Parra, M., Picher, M. T., Seoane, E., & Tortajada, A. (1984). New xanthonés isolated from *Centaureum linarifolium*. *Journal of natural products*, 47(1), 123-126.

- [63] Ahmed, Z. F., Rimpler, H., Rizk, A. M., Hammouda, F. M., & Ismail, S. I. (1970). the flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt. *Phytochemistry*, 9(7), 1595-1601
- [65] Méliopoulos, A., Levacher, C., & Robert, L. (1998). *La peau: structure et physiologie*. Tec & Doc Lavoisier; Ed. médicales internationales.
- [66] Wilson, A., & Ross, M. (2003). The identity function of autobiographical memory: Time is on our side. *Memory*, 11(2), 137-149.
- [67] Briese, M., Richter, D. U., Sattelle, D. B., & Ulfig, N. (2006). SMN, the product of the spinal muscular atrophy-determining gene, is expressed widely but selectively in the developing human forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 497(5), 808-816.
- [68] Meynaud-Collard, P., Mathon, D., Asimus, E., & Autefage, A. (2001). La densitométrie: revue bibliographique. *Revue Méd. Vét*, 152(1), 49-60.
- [69] ALTRINGHAM, J. D., & JOHNSTON, I. A. (1990). Scaling effects on muscle function: power output of isolated fish muscle fibres performing oscillatory work. *Journal of Experimental Biology*, 151(1), 453-467.
- [70] Cours semiologie cdef 2009.
- [71] *Ann Dermatol Venereol*, VASCULAIRE, É. (2005). Cicatrisation cutanée , 132, 8S49-68.
- [72] Manufacture and physiological activities of hydroxyproline. Kobayashi et al. *Frag J*, 31(3): 37-43. 2003.
- [73] From Self tanners to sunscreens as skin protectants. Fox C. *Cosmetics&Toiletries* 118(10): 26-32. 2003.
- [74] Evaluation et comparaison des effets anti rides, hydratant et raffermissant d'un actif formulé contre un placebo. Miquey-Pallandre PL et al, *DermScan*, n°98609.
- [75] Awika, J. M., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90(1), 293-301.

- [76] Hursting, S. D., Switzer, B. R., French, J. E., & Kari, F. W. (1994). Inhibition of rat mononuclear cell leukemia by corn oil gavage: in vivo, in situ and immune competence studies. *Carcinogenesis*, 15(2), 193-199.
- [77] Journal officiel de la république française du 26 décembre 1996, page 19818-19819
- [78] Koca, U., Süntar, I. P., Keles, H., Yesilada, E., & Akkol, E. K. (2009). In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. Ex Spreng. *Journal of ethnopharmacology*, 126(3), 551-556.
- [79] La plante médicinale traditionnelle hongroise *Centaurea sadleriana* Janka accélère la cicatrisation des plaies chez les rats( *journal of Ethnopharmacology, Volume 127, Issue 1, 8 January 2010, Pages 193-195* Dezső Csupor, , Gábor Blazsó, , Ágnes Balogh, , Judit Hohmann).
- [80] Naeini, A. T., Miri, R., Shafiei, N., Tabandeh, M. R., Oryan, A., & Nazifi, S. (2012). Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. *Comparative Clinical Pathology*, 21(3), 253-257.
- [81] Agrawal, S., Mohale, D., & Talele, G. S. (2010). Pharmacological activities of *Tridax procumbens* (Asteraceae). *Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 2(2), 73-78.
- [82] Alemdaroğlu, C., Değim, Z., Çelebi, N., Zor, F., Öztürk, S., & Erdoğan, D. (2006). An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, 32(3), 319-327.

## VI ANNEXES

### DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE :

Etuve	<b>Réactifs :</b>
Dessiccateur	- Hydroxyproline standard.
Bain marie	-Hydroxyproline étalon de travail.
Balance électronique	- Potassium tampon borate.
Ph mètre	-Chloramine T solution.
Centrifugeuse	-Sodium thiosulfate
Autoclave	-Le réactif d'Ehrlich.
Agitateur	-Azote gaz
Vortex	
Barreau magnétique	
Papier aluminium	
Para film	
Support	
Tube de culture en verre	
Eau distillé	
Hcl	
Four	
Eau déminéralisé	

**CYTOTOXICITE :**

<b><u>1) Equipements,petits materiels et consommables:</u></b>
- Incubateur a CO2, 37°C, 5% CO2, hygrométrie >90%
-Hotte a flux laminaire vertical
-Microscope inversé
-Lecteur de microplaques automatique
-Agitateur de microplaques
-Système de numération de cellules (cellules de malassez)
-Chronomètre
-Micropipettes de 5 -100-200 micro litres
-Embouts pour micropipettes de 5-100-200 micro litres
-Microplaque de 96 puits
<b><u>2) Réactifs :</u></b>
DMEM
SVF
PBS
TRYPISINE-EDTA
Rouge neutre (Sigma)
Solution d'extraction (acide acétique ; ethanol)
Pénicilline et streptomycine
<b><u>3) lignées cellulaires :</u></b>
ATCC

**CICATRISATION IN VIVO :**

<b>1) <u>Molécules pharmacologiques :</u></b>
Cycatril , Extrait methanolique de la plante Centarea Africana 5% et 10% ; Véhicule ,Thiopental Sodique
<b>2) <u>Matériel :</u></b>
Emporte pièces
Seringue
Lame de bistouri
Pince édenté
Gant

### Résumé :

*Centaurea africana* est une plante appartenant à la famille des astéracées endémiques de l'Afrique du Nord. La racine de cette plante est utilisée en médecine traditionnelle dans certaines régions rurales d'Algérie pour le traitement de la cicatrisation et des brûlures.

Des études sur les constituants chimiques appartenant à cette plante ont été réalisées ; cependant ces effets biologiques non pas été mis clairement en évidence.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet cicatrisant par application topique d'une pommade à deux concentrations 5 et 10 % préparée à partir de l'extrait méthanolique de la racine de *Centaurea africana* sur le modèle par excision chez le rat wistar.

Les résultats obtenus montrent une activité cicatrisante significative des rats traités par la pommade formulée par rapport au lot traité par la pommade véhicule .cela confirme les vertues attribuées par les tradipraticiens lors de son utilisation.

**Mots clés :** *Centaurea africana*, extrait méthanolique, excision, pommade, cicatrisation.

### Summary:

*Centaurea africana* is a plant belonging to the family Asteraceae endemic to North Africa. The root of this plant is used in traditional medicine in some rural areas of Algeria for the treatment of wound healing and burns.

Studies on the chemical constituents belonging to this plant were carried out; However, these biological effects not been clearly identified.

That is why we were interested in evaluating the healing effect by topical application of an ointment to two concentrations 5 and 10% prepared from the methanol extract of the root of the *Centaurea africana* by excision model in the Wistar rat.

The results show significant healing activity of the rats treated with the ointment formulated with respect to the group treated with the ointment vehicle that confirms the virtues attributed by traditional practitioners in its use.

**Keys words:** *Centaurea africana*, methanol extract, excision, ointment, healing,

### ملخص:

سانتوريا افريكانا هو نبات ينتمي إلى عائلة استراسيا المستوطنة في شمال أفريقيا. يستخدم جذر هذا النبات في الطب التقليدي الشعبي في بعض المناطق الريفية في الجزائر لعلاج التئام الجروح والحروق.

العديد من الدراسات أجريت على المكونات الكيميائية التي يحتوي عليها هذا النبات؛ ومع ذلك، فإن الآثار البيولوجية لم يتم تحديدها بشكل واضح.

ولهذا السبب اهتمنا في دراستنا بتقييم مدى الالتئام عن طريق التطبيق الموضعي للمرهم بتركيز 5 و10٪ والذي أعد من مستخلص ميثانولي من جذر سانتوريا افريكانا بواسطة نموذج الاستئصال في فئران الويستر.

أظهرت النتائج المحصل عليها أن الفئران التي تلقت العلاج بالمرهم الذي تمت صياغته مع المستخلص الميثانولي قد أبدت نشاطا علاجيا معتبرا مقارنة بالفئران التي تمت معالجتها بالمرهم الخالي من المستخلص وهذا يؤكد فرضية الأطباء التقليديين في التداوي بهذا النبات.

**الكلمات المفتاحية:** سانتوريا افريكانا، مستخلص ميثانولي، الإستئصال، المرهم، الإلتئام.