

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للطب



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

Etude des activités pharmacologiques et toxicologiques de
Centaurea africana (L.)

Présentée par : Mohamed ZAOUANI

Soutenue le : 22 / 02 / 2018

Les membres du jury :

Président:	S.TEMIM	Pr.	ENSV- Alger
Directeur de thèse	M.H.BEN-MAHDI	Pr.	ENSV- ESSAIA- Alger
Examineur 1	D.MOHAMMEDI	MCA	ENSV- Alger
Examineur 2	H.BOUDIS	MCA	Départ. Pharmacie université Alger 1
Examineur 3	D.SMATI	Pr.	Départ. Pharmacie université Alger 1
Examineur 3	H.BOUDENDOUNA	MCA	Départ. Pharmacie université Alger 1

Année universitaire : 2017/2018

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

Etude des activités pharmacologiques et toxicologiques de
Centaurea africana (L.)

Présentée par : Mohamed ZAOUANI

Soutenue le : 22 / 02 / 2018

Devant le jury :

Président:	S.TEMIM	Pr.	ENSV- Alger
Directeur de thèse	M.H.BEN-MAHDI	Pr.	ENSV- ESSAIA- Alger
Examineur 1	D.MOHAMMEDI	MCA	ENSV- Alger
Examineur 2	H.BOUDIS	MCA	Départ. Pharmacie Université Alger 1
Examineur 3	D.SMATI	Pr.	Départ. Pharmacie Université Alger 1
Examineur 3	H.BOUDENDOUNA	MCA	Départ. Pharmacie Université Alger 1

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

À Madame **BEN-MAHDI H.M**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Directrice du Laboratoire de Recherche "Santé & Productions Animales", Directrice de l'ESSAIA, ma directrice de thèse qui m'a accueilli dans son Laboratoire, m'a confié ce travail et l'a dirigé avec rigueur, efficacité, une patience extrême et pour la confiance qu'elle m'a témoignée au cours de sa réalisation, je tiens à lui exprimer ma vive reconnaissance.

Je remercie chaleureusement le Professeur **TEMIM.S** de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, de l'honneur qu'elle me fait en acceptant spontanément la lourde tâche de présider le jury de cette thèse. Qu'elle voit ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

A Madame **SMATI .D**, Professeur au département de pharmacie de la Faculté de Médecine d'Alger, Directrice du Laboratoire de Botanique, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je remercie vivement le **Dr BOUDIS .H**. Maître de conférences à au département de pharmacie de la Faculté de Médecine d'Alger pour avoir aimablement accepté d'examiner mon travail de thèse et aussi de faire partie du jury malgré tous ses engagements.

Je remercie vivement le **Dr BOUDENDOUNA .H**. Maître de conférences au département de pharmacie de la Faculté de Médecine d'Alger pour avoir aimablement accepté d'examiner mon travail de thèse. Qu'il trouve dans ces quelques mots l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur **MOHAMMEDI. D**, Maître de conférences, à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, qui n'a cessé de m'encourager et a aimablement accepté d'examiner ce travail, je lui exprime ma profonde gratitude.

Je souhaite remercier chaleureusement, Monsieur le Professeur **BAZ** de l'Ecole Normal Supérieure de Kouba pour son aide et ses conseils.

J'adresse mes sincères remerciements à Dr **CHADER. H**. Responsable du Service Pharmacotoxicologie (LNCPP) pour son aide et ses conseils.

A tous mes collègues et amis de l'ENSV et à tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici ma haute considération.

Enfin, que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, trouvent ici l'expression de mes sentiments de reconnaissance.

M.ZAOUANI

Résumés

Résumé

L'objectif du présent travail est de valoriser une plante médicinale endémique de l'Afrique du Nord (Algérie et Tunisie): *Centaurea africana*. Cette plante a retenu notre attention du fait de son usage traditionnel et le peu d'informations que nous avons tiré des recherches bibliographiques. En vue d'atteindre cet objectif, une enquête ethnobotanique sur les utilisations des plantes médicinales en générale et de cette plante en particulier a été menée dans certains villages de la région de Tizi-Ouzou. Puis, une contribution à l'étude chimique des trois extraits a été réalisée et une évaluation de leurs activités pharmacologiques et toxicologiques a été effectuée. L'enquête ethnobotanique a révélé que *Centaurea africana* est largement appréciée par la population locale dans le traitement des brûlures (34%) suivi par le traitement des plaies (28%) et escarres (26%), seule la racine de la plante est utilisée. Le criblage phyto-chimique des différents extraits a révélé la présence de plusieurs composés actifs : polyphénols, flavonoïdes, tanins, coumarines, triterpènes et les anthocyanes. Le dosage préliminaire quantitatif basé sur le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavonols et des tanins condensés par spectrophotométrie classique ont démontré la présence de composés polyphénoliques en quantités importantes dans le méthanol et que le l'acétone possède les meilleures capacités à extraire les tanins. L'activité anti-oxydante des trois extraits de la poudre de racine de *Centaurea africana* a été évaluée par le potentiel de scavenger des radicales libres selon la méthode DPPH, qui a montré que l'extrait méthanolique de *Centaurea africana* était le plus actif. Les différents extraits ont été également soumis à un criblage pour leur activité antibactérienne. Le spectre d'action a été évalué par la méthode de diffusion sur disques et la méthode de micro-dilution sur 04 souches de référence, qui ont montré un effet antibactérien aussi bien sur les bactéries à Gram positif que négatif. *Staphylococcus aureus* a présenté les plus grandes sensibilités à l'extrait méthanolique. Cependant *Pseudomonas aeruginosa* a montré une plus grande sensibilité à l'extrait aqueux et acétonique. Par ailleurs, *Bacillus subtilis* s'est montré très sensible à l'extrait aqueux. Ces résultats ont été confirmés dans la seconde étape de notre partie expérimentale qui a permis de quantifier cette déterminant activité en des CMI et CMB. La recherche des propriétés gastro-protectrices contre les ulcérations provoquées par le mélange acide chlorhydrique/éthanol/eau chez les rats ont montré que les trois extraits à la concentration de 300 mg/kg ont un effet supérieur que le produit de référence et le puissant pouvoir cyto-protecteur a été observé également pour l'extrait méthanolique. L'activité hémostatique *in vivo* et *in vitro* a été évaluée en déterminant le temps de saignement dans un premier temps. L'extrait méthanolique a montré une activité hémostatique significative, avec un temps moyen de saignement de $1.41 \pm 0,12$ (32.71% de la valeur du groupe témoin). Dans un deuxième temps, le test de l'action hémostatique a été évalué par le pouvoir coagulant des prélèvements sanguins. A la lumière des résultats obtenus, dans les deux modèles, parmi les trois extraits testés, il ressort que L'extrait méthanolique et l'extrait aqueux ont montré un temps de coagulation considérablement réduit par rapport aux lots témoins. L'évaluation toxicologique témoigne de la bonne tolérance de l'extrait et de la pommade par voie orale et cutanée chez le rat. L'efficacité de la pommade à 5 et 10% de l'extrait méthanolique a été démontrée par le test d'activité antiinflammatoire locale sur des rats par l'inhibition du développement de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton. L'activité cicatrisante a été évaluée par deux modèles de cicatrisation, par excision et par incision. La pommade à 10 % affiche des propriétés cicatrisantes évidentes dans les deux modèles étudiés confirmée par le dosage de la teneur en hydroxyproline et les coupes histologiques examinées

Mots-Clés : Antioxydant, *Centaurea africana*, Cicatrisation, Extraits végétaux, Formulation, Gastroprotecteurs, Hémostatiques, Pommade antiinflammatoires, Pouvoir antimicrobien.

الهدف من هذا العمل هو تطوير النباتات الطبية المستوطنة في شمال أفريقيا (الجزائر تونس): سونتوريا أفريكانا (*Centaurea africana*).

وقد شهدت هذه النبتة انتبهنا لاستعمالها التقليدي وللقليل من المعلومات التي استوحيناها من المراجع. و لتحقيق هذا الهدف ، قمنا ببحث إثنونباتي عن كيفية إستعمال النباتات الطبية بشكل عام و هذه النبتة بصفة خاصة في إحدى قرى ولاية تيزي وزو. ساهمنا أيضا في دراسة كميافية لثلاث مقتطفات و تم إجراء تقييم لأنشطتها الدوائية و السمية . و افرجت الدراسة اثنوباتية على كثيرة الاستحسان على نطاق واسع من قبل السكان المحليين في علاج الحروق (34%) ، يليه علاج الجروح (28%) وقرحة الضغط (26%) ، مع العلم أن فقط جذور النبتة مستعملة. وكشف الفحص الكيمائي النباتي لمختلف المقتطفات وجود أكثر نشاطا للمركبات (البوليفينول، الفلافونويد والعفص والكومارين، التربينات والانتوسيانين). وأظهر الفحص الأولي الكمي بناء على تقرير من البوليفينول الكلي، الفلافونويد، مركبات الفلافونول والعفص مكثف من قبل القياس الطيفي الكلاسيكي و وجود مركبات بوليفينول بكميات كبيرة في الميثانول والأسيتون لديه القدرة على أفضل استخراج العفص. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة من ثلاثة مقتطفات من مسحوق الجذر سونتوريا أفريكانا المحتملين زبال الجذور الحرة وفقا لطريقة DPPH، والذي أظهر أن مستخلص الميثيلي ل: سونتوريا أفريكانا كان الأكثر نشاطا . تعرض مقتطفات مختلفة أيضا إلى الكشف عن نشاطهم المضاد للبكتيريا. تم تقييم الطيف للعمل من خلال طريقة أقراص طريقة نشر و تخفيف الصغيرة على 04 السلالات المرجعية، التي أظهرت تأثير مضاد للجراثيم. أظهرت المكورات العنقودية الذهبية أعظم حساسية لمستخلص الميثانول. ومع ذلك الزائفة الزنجارية أظهرت قدر أكبر من الحساسية ومائي استخراج الأسيتون. وعلاوة على ذلك، فقد أظهرت عصيات *subtilis* حساسة جدا للمستخلص المائي. و قد تأكدت هذه النتائج في المرحلة الثانية من القسم التجريبي لدينا وكما هذا النشاط من خلال إيجاد قيم CMI و CMB. وأظهرت خصائص البحث المعدي وقائية ضد تفرح الناجم عن مزيج من حمض الهيدروكلوريك / الإيثانول / المياه في الفئران التي مقتطفات من ثلاث بتركيز 300 ملغ / كغ يكون لها تأثير أكبر من المنتج إشارة والقوي وقد لوحظ قدرة خلوي واقية أيضا من خلال المستخلص الميثيلي. وأجري اختبار النشاط مرقي في الجسم الحي وخارج الجسم في أول تجربة ، من خلال تحديد زمن النزيف ، مقارنة بالمجموعة الشاهد، بعد تناوله من العينات موضعيا . أظهر المستخلص الميثيلي النشاط تخثر الدم كبيرا، حيث يبلغ متوسط الوقت نزيف من 1.41 ± 0.12 (32.71%) من قيمة المجموعة الضابطة. في التجربة الثانية ، اختبار وتقييم العمل مرقي من تجلط الدم لعينات الدم. في ضوء النتائج التي تم الحصول عليها في كلا النموذجين مقتطفات من ثلاث اختبارها ، ويبدو أن المستخلص الميثيلي والمستخلص المائي أظهر وقت تجلط الدم بشكل ملحوظ خفضت مقارنة مع المجموعات ، وفعالية وقد تجلى استخراج الميثانول في جميع الاختبارات. كشفت صياغة تركيز مرهم اثنين من بين 5 و 10% مع المستخلص الميثيلي العنصر النشط ، أجري الاختيار إلى أن مرهم أصفر، فطيرة، متجانسة ومستقرة وذات أس هيدروجيني يتراوح 5.13- 5.83. يوضح تقييم السمية والتسامح جيدة للاستخراج والجردان عن طريق الفم والجلد مرهم. وقد تجلى فعالية مرهم من مستخلص الميثانول من اختبار النشاط المضادة للالتهابات المحلي على الفئران عن طريق تثبيط تطور ذمة الأذن الناجم عن النفط كروتونيم تقييم النشاط الشفاء من خلال نموذجين يشفي، استئصالية والجراحي. مرهم 10% تظهر الخصائص العلاجية واضحة في كلا النموذجين دراستها وأكده قياس محتوى الهيدروكسيل البرولين والمقاطع النسيجية فحص

كلمات المفتاح : كوتيريا أفريكانا ، المستخلصات النباتية، والطاقة المضادة للميكروبات، ومضادات الأكسدة، مرقي، حماية المعدة ، ووضع مرهم مضاد للالتهابات، وتضميد الجراح.

Abstract

The objective of this work is to develop a medicinal plant endemic to North Africa (Algeria and Tunisia): *Centaurea africana*. This plant has caught our attention because of its traditional use and the little information we have derived from bibliographic research. In order to achieve this objective, an ethnobotanical survey on the uses of medicinal plants in general and this plant in particular was carried out in some villages in the province of Tizi-Ouzou. Then, a contribution to the chemical study of the three extracts was carried out and an evaluation of their pharmacological and toxicological activities was carried out. Ethobotany revealed that *Centaurea africana* is widely appreciated by the local population in the treatment of burns (34%) followed by treatment of wounds (28%) and ulcers (26%), only the root of the plant is used. The phyto-chemical screening of the various extracts revealed the presence of several active compounds: polyphenols, flavonoids, tannins, coumarins, triterpenes and anthocyanins. Preliminary quantitative determination of total polyphenols, flavonoids, flavonols and condensed tannins by conventional spectrophotometry demonstrated the presence of polyphenol compounds in large amounts in methanol and that acetone has the best capacity to extract the tannins. The antioxidant activity of the three extracts of the *Centaurea africana* root powder was evaluated by the scavenger potential of the free radicals according to the DPPH method, which showed that the methanolic extract of *Centaurea africana* was the most active. The various extracts were also screened for antibacterial activity. The spectrum of action was evaluated by the disk diffusion method and the micro-dilution method on 04 reference strains, which showed an antibacterial effect on both Gram-positive and negative bacteria. *Staphylococcus aureus* showed the greatest sensitivity to methanol extract. However, *Pseudomonas Aeruginosa* showed a greater sensitivity to the aqueous and acetone extract. Moreover, *Bacillus subtilis* was very sensitive to the aqueous extract. These results were confirmed in the second step of our experimental part which allowed quantifying this activity by finding values of CMI and CMB. The investigation of gastro-protective properties against hydrochloric acid/ethanol/water-induced ulceration in rats showed that the three extracts at the concentration of 300 mg/kg had a higher effect than the reference product and the potent Cyto-protective power was also observed through the methanol extract. The *in vivo* and *in vitro* hemostatic activity test was performed in a first experiment, determining the bleeding time after scalpel incision in the tail of the rats, compared to the control, after local administration of the samples. The methanol extract demonstrated significant hemostatic activity, with an average bleeding time of 1.41 ± 0.12 (32.71% of control group value). In the second experiment, the haemostatic action test was evaluated by the coagulant capacity of the blood samples. In the light of the results obtained, in both models, among the three extracts tested, it appears that the methanol extract and the aqueous extract showed a considerably reduced coagulation time compared to the control batches. Methanolic extract has been demonstrated through all tests. The formulation of the ointment at two concentrations of 5 and 10% with methanol extract as active ingredient, the control carried out revealed that the ointment is yellow, pasty, homogeneous, stable and with a pH varying from 5.13 to 5.83. The toxicological evaluation demonstrates the good tolerance of oral and dermal extract and ointment in rats. The efficacy of the ointment of the methanol extract was demonstrated by the local anti-inflammatory activity test in rats by the inhibition of the development of ear edema induced by croton oil. The healing activity was evaluated by two models of healing, excision and incision. The 10% ointment exhibited obvious healing properties in the two models studied and confirmed by the determination of the hydroxy proline content and the histological sections examined.

Keywords: *Centaurea africana*, Plant extracts, Antimicrobial power, Antioxidant, hemostatics, Gastroprotective, Formulation ointment anti-inflammatory, healing.

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION GENERALE -----	1
Chapitre I : Generalites-----	4
I.1 Aperçu historique sur l'utilisation des plantes médicinales-----	4
I.2 La medecine par les plantes-----	5
I.3 Importance et les niveaux de l'utilisation des plantes médicinales -----	6
1.3.1 Utilisation de la Plante Médicinale en usage traditionnel -----	6
1.3.2 - Utilisation de la Plante Médicinale en médecine -----	7
1-3-3 Utilisation scientifique de la plante médicinale -----	8
I.4 Composés phytochimiques d'intérêt pharmacologique-----	10
1.4.1 Les composés phénoliques-----	11
a. Flavonoïdes -----	12
b. Coumarines -----	13
c. Lignanes, néolignanes et composés apparentés-----	13
d. Anthocyanosides-----	14
e. Tanins-----	14
f. Quinones-----	15
1.4.2 Les terpénoïdes et les stéroïdes-----	15
1.4.3. Les alcaloïdes -----	16
Chapitre II: Presentation de la plantes étudiée -----	17
II-1 L'ordre des Asterales-----	17
II-2 Présentation de la famille des Astéracées-----	17
II-2-1 Description botanique-----	17
II-2-2 Position systématique de la famille des Astéracées d'après APG III-----	18
II-2-3 Utilisations et intérêts économiques des Astéracées -----	19
II-3. Présentation du genre <i>Centaurea</i> -----	20
II.3. Présentation de l'espèce <i>Centaurea africana</i> -----	21
Chapitre III: Generalites sur quelques activites biologiques et pharmacologiques	22
III.1 Stress oxydant et antioxydants -----	22
III.1.1 Généralités -----	22
III.1.2 Origine du stress oxydant-----	22
III.1.3 Pathologies liées au stress oxydant-----	23
III.1.4. Mécanismes de défense contre le stress oxydant-----	24
III.1.5 Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire-----	25
III.2. Activité antimicrobienne-----	26
III.2.1. Introduction-----	26
III.2.2 Méthodes d'essai des propriétés antimicrobiennes des extraits végétaux -----	27
III.2.3 Caractéristiques des souches bactériennes utilisées -----	27
III.3. Activité antiulcéreuse-----	27
III.3. 1.Généralités sur les ulcères gastriques-----	27
III.3. 2.Physiopathologie de la maladie ulcéreuse-----	28
III.3. 3. Histologie de l'estomac-----	28
III.3. 4. Traitements des ulcères-----	29
III.4. Activité hémostatique-----	29
III.4.1. Hémostase primaire-----	30
III.4.2. Hémostase secondaire ou coagulation plasmatique -----	31
III.4.3. Méthodes explorant l'hémostase-----	32

III.4.3.1 Les principaux tests explorant l'hémostase primaire -----	32
III.4.3.1.1 La numération plaquettaire-----	32
III.4.3.1.2 Le temps de saignement -----	32
III.4.3.1.3 Le facteur Willebrand -----	32
III.4.3.2 Les principaux tests explorant l'hémostase secondaire -----	32
III.4.3.2.1 Le temps de Quick (TQ) -----	32
III.4.3.2.2 Le taux de prothrombine-----	32
III.4.3.2.3 Le temps de céphaline activée -----	32
III.4.3.2.4 Le temps de thrombine -----	33
III.4.4. Les médicaments hémostatiques -----	33
III.5. Activité anti inflammatoire-----	33
III.5.1 La réaction inflammatoire -----	33
III.5.2 L'inflammation aiguë-----	34
III.5.3 L'inflammation chronique-----	36
III.5.4 Les anti-inflammatoires-----	37
III.5.4.1 Les anti-inflammatoires non stéroïdien -----	37
III.5.4.2 Classification des anti-inflammatoires non stéroïdien -----	37
III.5.4.3 Principaux AINS commercialisées -----	38
III.5.4.4 Principaux AIS commercialisées -----	39
III.6. Activité cicatrisante -----	39
III.6.1. Rappels anatomophysiologiques de la peau-----	39
III.6.1.1. Structure de la peau-----	40
III.6.2. Physiologie de la cicatrisation cutanée-----	41
III.6.2.1 Phase initiale -----	42
III.6.2.1 Phase de remodelage-----	43
III.6.2.3 Phase de renforcement -----	43
III.6.3 Facteurs influençant la cicatrisation-----	43
III.6.4 Traitements topiques des cicatrices -----	44
III.6.4.1 Application topique d'antibiotiques et d'antiseptiques -----	44
III.6.4.1 Glycerol / glycerine -----	45
III.6.4.2 oligo- éléments et vitamines -----	45
III.6.4.3 Le miel -----	46
III.6.4.4 Plantes à activité cicatrisantes -----	46
PARTIE PRATIQUE	
I- Problématique & objectifs -----	48
II. Matériels & méthodes-----	49
II.1: Enquete ethnobotanique-----	49
II.1.1 Présentation de la région d'étude-----	49
II.1.1.1 Facteurs climatiques-----	51
II.1.1.2 Les températures-----	51
II.1.2 Méthode d'étude-----	52
III. matériel vegetal, criblage phytochimique et extraction.....	53
III.1 Identification de la plante-----	53
III.2 Extractions-----	53
III.3 Analyse phyto-chimique -----	54
III.3.1 Analyse qualitative -----	54
III.3.2 Analyse quantitative-----	54
II.3.2.1 Dosage des Polyphénols-----	54

III.3.2.2 Dosage des Flavonoïdes -----	55
III.3.2.3 Dosage des Tanins-----	56
VI Evaluation toxicologiques et activites biologiques et pharmacologiques	56
IV.1 Etude toxicologique -----	56
IV.1.1 Détermination de la toxicité aiguë-----	56
IV.1.1 Expérimentations animales-----	57
IV.1.2 Toxicités aiguës cutanées (test limite)-----	57
IV.1.3 Toxicités aiguës orales (test limite)-----	57
IV.2 Evaluation des activités biologiques-----	57
IV.2.1 Détermination de l'activité anti-oxydante-----	57
IV.2.1.1 Calcul de la concentration inhibitrice de 50% (IC50) -----	58
IV.2.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne (test <i>in vitro</i>) -----	58
IV.2.2.1 Méthode de diffusion par disque -----	58
IV.2.2.2 Méthode de micro dilution sur milieu liquide -----	60
IV.2.2.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)-----	60
IV.2.3 Activité hémostatique <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> -----	61
IV.2.3.1 Mesure <i>in vivo</i> de l'activité hémostatique-----	61
IV.2.3.1.1 Mesure du temps de saignement -----	61
IV.2.3.2 Mesure <i>in vitro</i> de l'activité hémostatique-----	62
IV.2.3.2 Mesure du temps de coagulation-----	62
IV.2.3.3 Analyse statistique-----	62
IV.2.4 Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet cytoprotecteur sur l'ulcère gastrique -----	63
IV.2.4.1 Protocole -----	63
IV.2.4.2 Analyse statistique-----	64
V Formulation de pommade à 5 Et 10% -----	65
V.1 Caractéristiques des excipients utilisés-----	65
V.1.1 Graisse de laine -----	65
V.1.2 L'alcool cétylique -----	65
V.1.3 La vaseline -----	65
V.1.4 La paraffine liquide -----	65
V.2 Technique de la préparation-----	66
V.3 Contrôle de la qualité du produit fini -----	68
V.3.2 Contrôles physiques -----	68
V.3.2.1 Examen des caractéristiques macroscopiques-----	68
V.3.2.1.1 Caractéristiques organoleptiques-----	68
1- Test de l'homogénéité -----	68
2- Test de centrifugation -----	68
V.3.2.2 Examen des caractéristiques microscopiques-----	68
V.3.2.2.3 Test de limpidité -----	69
VI Evaluation toxicologique -----	70
VI.1 Tolérance cutanée -----	71
VI.2 Evaluation de la toxicité subchronique-----	72
VII. Evaluation des propriétés pharmacologiques -----	74
VII.1 activité anti-inflammatoire locale -----	74
VII.2 Evaluation de la cicatrisation chez le rat-----	75
VII.3 Modèle par incision -----	75
VII.3 Modèle par excision -----	75

VII.4 Détermination de la teneur en hydroxyproline-----	76
VII.5 Étude histopathologie-----	77
VII.6 Analyse statistique -----	77
RESULTATS & DISCUSSION-----	80
I. Resultats de l'étude ethnobotanique -----	80
2. L'âge -----	80
3. Niveau d'instruction -----	80
4. Les maladies -----	81
II. Resultats de l'étude phytochimique-----	88
II. 1 Rendements d'extraction-----	88
II. 2 Analyse qualitative-----	89
II. 3 Analyse quantitative-----	90
II. 3.1 Dosages spectrophotométriques des polyphénols-----	90
II. 3.1.1 Dosages des phénoliques totaux-----	90
II. 3.1.2 Dosages des flavonoïdes -----	92
II. 3.1.3 Dosages des tanins -----	93
III. Resultats des activités biologiques -----	95
III.1 Activité antioxydante-----	95
III.2 Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits-----	98
III.2.1 Méthode des disques-----	98
III.2.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), de la concentration minimale bactéricide (CMB) et rapport CMB/CMI -----	100
III.3 Résultats de l'activité hémostatique -----	103
III.4 Activité antiulcéreuse-----	106
III.4.1 Activité protectrice de la muqueuse gastrique -----	106
IV. Contrôle de la pommade formulée -----	111
IV.1 Détermination potentiométrique du pH-----	111
IV.2 Caractères-----	111
IV.2.1 Aspect / Couleur -----	111
IV.3 Test de l'homogénéité -----	112
IV.3.1 Test macroscopique-----	112
IV.3.2 Test de centrifugation -----	112
IV.3.3 Test microscopique -----	113
IV.3.4 Test de limpidité-----	114
IV.3.5 Tests d'influence de l'air et de la température-----	114
V Resultats de l'évaluation toxicologique-----	114
V.1 Toxicité aiguë administrée par voie orale-----	115
V.2. Toxicité aiguë administrée par voie cutanée -----	115
V.3 Évaluation de la tolérance locale -----	115
V.2.4.. Toxicité subchronique-----	117
V.2.4.1. Paramètres biochimiques et hématologiques mesurées -----	118
VI Resultats des activités pharmacologique-----	122
VI.1 Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> -----	122
VI.1.1 Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez le rat -----	122
VI.2 Activité cicatrisante -----	123
VI.2.1 Modèle par incision -----	123
VI.2.2. Modèle par excision -----	124
VI.2.2.1 Teneur en hydroxyproline-----	128

VI.2.2. 2 Evaluation histologique----- 128
Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Filière plante médicinale_____	10
Figure 2 : Classification des Astéracées d'après APG III. _____	18
Figure 3 Structure histologique de la paroi gastrique _____	28
Figure 4 : Étapes de l'hémostase_____	30
Figure 5 : Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins _____	35
Figure 6 : Architecture générale de la peau (a) Représentation schématique (b) HE X 15 ____	40
Figure 7 : Situation géographique de la wilaya de Tizi-Ouzou_____	50
Figure 8 : Répartition des précipitations et températures moyenne quotidienne. _____	51
Figure 9 : Principe de la méthode de diffusion par disque. _____	59
Figure 10 : Différentes étapes de préparation de la pommade de l'extrait méthanolique. ____	67
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux. 91	
Figure 12 : Teneur en polyphénols totaux des différents extraits. _____	91
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux. ____	92
Figure 14 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits. _____	92
Figure 15 : Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des tanins condensés. _____	93
Figure 16 : Teneur en tanin des différents extraits. _____	94
Figure 17 : Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique et des extraits de <i>Centaurea africana</i> .96	
Figure 18 : Évaluation histopathologique des sections de tissu gastrique des rats traités par les différents extraits_____	109
Figure 19 : Aspect histologique des prélèvements hépatique, néphrotique et pancréatique chez les rats témoins et traités par l'extrait méthanolique a la dose de 1g/kg par voie orale. ____	121
Figure 20 : Pourcentage de réduction de l'œdème induit chez le rat par l'huile de croton par l'application de la pommade préparée à base d'extrait méthanolique des racines de <i>Centaurea africana</i> . _____	122
Figure 21 : Evolution macroscopique des surfaces des plaies des lots traités et contrôle. __	127
Figure 22 : Coupes histologiques des biopsies cutanées colorées par l'hématoxyline/éosine des lots traités les pommades à base d'extrait méthanolique de <i>Centaurea africana</i> (5 et 10 %) et les lots contrôle _____	130

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1 : <i>Centaurea africana</i> dans son espace naturel (photo personnelle). _____	21
Photo 2 : Incision de la queue et dépôt des gouttes de sang toutes les 30s sur le papier filtre. _____	61
Photo 3 : Différentes étapes du test de limpidité de la pommade formulée. _____	69
Photo 4 : Différentes étapes du modèle de cicatrisation par incision. _____	75
Photo 5 : Modèle de cicatrisation de plaie par excision chez le rat. _____	76
Photo 6 : Différentes étapes de la détermination de la teneur en hydroxyproline. _____	77
Photo 7 : Zones d'inhibition obtenues par les extraits (méthanoliques, aqueux, et acétonique) de <i>Centaurea africana</i> _____	99
Photo 8 : Résultats des temps de coagulation du sang in vivo des trois extraits de <i>Centaurea africana</i> . _____	105
Photo 9 : Aspect macroscopique de la muqueuse gastrique des lôts témoin et traité à l'éthanol. _____	106
Photo 10 : Etalement de la pommade® formulé sur surface plane. _____	112
Photo 11 : L'échantillon de pommade après le test de centrifugation. _____	112
Photo 12 : Observation microscopique de la pommade formulée (Gx40) _____	113
Photo 13 : Observation microscopique de pommade formulée (Gx100) _____	113
Photo 14 : Filtration de pommade. _____	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Aperçu non exhaustif des différents tests utilisés dans la mesure de la capacité antioxydante globale du plasma et des matrices alimentaires. _____	25
Tableau 2 : Cellules et médiateurs de l'inflammation _____	34
Tableau 3 : Classification des principaux AINS en fonction de leur sélectivité d'action anti-COX. _____	38
Tableau 4 : Principales spécialités des AINS. _____	38
Tableau 5 : Principales spécialités des AIS. _____	39
Tableau 6 : Circonstances favorisant le retard de cicatrisation. _____	44
Tableau 7 : Préparation de la pommade d'extrait méthanolique à 80% _____	66
Tableau 8 : Echelle d'évaluation de la tolérance cutanée _____	71
Tableau 9 : les maladies traitées par les plantes médicinales en pourcentage _____	81
Tableau 10 : Liste des plantes médicinales utilisées spontanément par la population locale _	83
Tableau 11 : Rendement des extraits : méthanolique, acétonique et aqueux _____	88
Tableau 12 : Résultats du criblage phytochimique des différents extraits de racine de la plante étudiée. _____	89
Tableau 13 : Valeurs de l'IC50 de l'acide ascorbique et des extraits méthanolique, acétonique et aqueux de <i>Centaurea africana</i> _____	95
Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne _____	98
Tableau 15 : Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide (mg/ml) et rapport CMB/CMI des extraits des racines de <i>Centaurea africana</i> _____	101
Tableau 16 : Temps de coagulation du sang humain en tube en présence des extraits de racines sèches de <i>Centaurea africana</i> en secondes _____	103
Tableau 17 : Résultats du temps de coagulation du sang <i>in vivo</i> sur le groupe contrôle et les groupes traités par les extraits méthanolique, acétonique et aqueux (Moyenne \pm SD). ____	104
Tableau 18 : Activité protectrice de la muqueuse gastrique des extraits méthanolique, aqueux et acétonique des racines de <i>Centaurea africana</i> sur les ulcères gastriques induits par le mélange éthanol-HCl-eau chez les rats mâles. _____	107
Tableau 19 : Mesure de la variation du pH pendant 5 jours de suite. _____	111
Tableau 20 : Indice d'irritation primaire de la pommade formulé à 10 % et pommade véhicule. _____	116
Tableau 21 : L'indice d'irritation primaire de la pommade formulé à 10 % et pommade véhicule. _____	116
Tableau 22 : L'indice d'irritation primaire de la pommade formulé à 10 % et pommade véhicule _____	117
Tableau 23 : Valeurs moyennes des pesées hebdomadaires (g) des rats témoins et des rats traités par l'extrait méthanolique de racine de <i>Centaurea africana</i> par voie orale et cutané	118
Tableau 24 : Effet de l'extrait méthanolique de racine <i>Centaurea africana</i> sur les paramètres biochimiques des rats après 28 jours de traitement par voies orale et cutanée _____	119

Tableau 25 : Effet de l'extrait méthanolique de racine <i>Centaurea africana</i> sur les paramètres hématologiques des rats après 28 jours de traitement par voies orale et cutanée. _____	120
Tableau 26 : Effet de la pommade préparée à base d'extrait méthanolique de racines de <i>Centaurea africana</i> sur l'œdème induit chez le rat par l'huile de croton. _____	122
Tableau 27 : Effet de l'application topique de l'extrait méthanolique de <i>Centaurea africana</i> sur la résistance à la traction du modèle de la rupture par incision : _____	124
Tableau 28 : Evolution de la réduction des surfaces des plaies (Moy \pm SEM) durant toute la période d'expérimentation (4j, 8j, 12j et 16j) et la période d'épithélialisation. _____	125
Tableau 29 : Teneurs tissulaires en hydroxyproline des plaies des quatre lots au 12e jour de traitement _____	128

INTRODUCTION GENERALE

I- Introduction générale

Les vertus thérapeutiques des plantes sont connues depuis la préhistoire. Ainsi, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80 % de la population dépend de la médecine traditionnelle plutôt que de molécules de synthèse surtout en milieu rural du fait de la proximité et de l'accessibilité de ce type de soins et surtout des difficultés d'accès de ces populations à la médecine moderne (**Békro, 2010 ; PAGM, 1998**). Par conséquent, la médecine traditionnelle peut être considérée comme partie intégrante des soins de santé primaire, pour améliorer l'accès aux soins. Cependant, le potentiel des plantes comme source pour la production de nouveaux médicaments est largement inexploité (**Hamburger et Hostettmann, 1991**). Il existe environ 500 000 espèces de plantes sur terre, dont au moins 80,000 possèdent des propriétés médicinales (**Quyoun, 2003**). En effet, sur ce nombre, seulement 6% ont été testés pour leur activité biologique et 15 % ont été évalués sur le plan phytochimique (**Verpoorte, 2000**). Ainsi, il faut évaluer l'efficacité clinique, garantir l'inocuité des plantes médicinales, renforcer les connaissances et les performances des herboristes tradithérapeutes et garantir un suivi suffisant des patients (**Zeggwagh, 2013**).

L'Algérie, offre grâce à son immense superficie, sa situation géographique et son climat, des potentialités végétales énormes. Dans des travaux de la valorisation des ressources naturelles, plusieurs substances naturelles d'origines végétales ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont avérées utiles pour des buts thérapeutiques (**Elhouiti, 2017**).

La phytothérapie est à nouveau un sujet d'actualité. En effet, avec un consommateur de plus en plus réticent vis-à-vis des produits contenant des molécules issues de la synthèse chimique, un certain nombre de secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules d'origine naturelle aux caractéristiques chimiques et biologiques originales dans leurs formulations. Les ethnopharmacologues observent également avec attention le succès grandissant des pharmacopées anciennes, au titre d'une « vague verte » qui un peu partout dans le monde, apparaît comme une alternative à la médecine chimique (**Chominot, 2000**). La valorisation de ces principes actifs d'origines naturelles représente donc un potentiel économique énorme. Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice végétale d'origine. L'obtention de ces molécules nécessite des investigations phyto-chimiques par des méthodes analytiques. Ces études sont souvent longues et coûteuses, telles que l'extraction, l'isolement par des essais bio-guidés (**Michel, 2011**), le screening

pharmacologique pour le dépistage d'activité biologique. Les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais également comme matières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (**OMS, 1998**). De nos jours on peut considérer qu'entre 25 et 50% des médicaments actuellement commercialisés trouvent leur origine dans la nature (**Kingston, 2010**) et 20.000 à 25.000 plantes sont utilisées comme médicaments (**Strobe, 1996**).

Le travail entrepris dans le cadre de cette thèse se propose d'approfondir les connaissances sur une espèce végétale très peu étudiée mais jouissant de nombreux emplois traditionnels, il s'agit de *Centaurea africana* appartenant à la famille des Asteraceae.

Le genre *Centaurea* est répandu non seulement sur le territoire Algérien mais également en Europe, dans le bassin méditerranéen, à l'ouest de l'Asie et au continent Américain. Seulement, l'espèce *Centaurea africana* est endémique en Algérie et en Tunisie, d'où le terme Africana (**Quezel et al, 1963**).

Les études phytochimiques effectuées sur les espèces du genre *Centaurea* ont révélé leurs richesses en métabolites secondaires tels que les lactones sesquiterpéniques (**Gonzalez et al, 1984 ; Medjroubi et al, 1997**), les stéroïdes (stérols) (**Picher et al, 1984 ; Flamini et al., 2002**), les composés phénoliques de type flavonique et à degré moindre les alcaloïdes (**Ahmed et al, 1970**). En plus, une vingtaine de lactones sesquiterpéniques a été isolée des espèces du genre *Centaurea* poussant en Algérie (**Benayache et al, 1997**). Bien que le genre *Centaurea africana* a été étudié sur le plan botanique et chimique mais ses différentes activités biologiques et toxicologiques n'ont pas été évaluées.

Traditionnellement, les racines de *Centaurea africana* sont utilisées pour la cicatrisation des plaies et jusqu'à présent, aucune étude scientifique n'a été rapportée pour valider son utilisation et confirmer son usage traditionnel.

Par conséquent :

- Dans une première partie, nous présentons une synthèse bibliographique décrivant les notions essentielles à la compréhension de ce travail (classification et intérêt des composés phytochimiques, description et travaux antérieurs de l'espèce étudiée, les antioxydants, les propriétés antibactériennes, antiulcéreuses, hémostatiques et cicatrisantes).

- La seconde partie décrit la partie expérimentale, qui est scindée en trois parties :
 - La première partie présente les études ethnobotaniques ;
 - La deuxième partie présente les techniques d'extractions, les dosages spectrophotométriques, les tests d'activités anti-oxydantes et antimicrobiennes, les tests d'activités gastro-protecteurs et hémostatiques) des trois extraits (méthanolique, acetonique et aqueux) des racines de la plante *Centaurea africana*.

- La troisième partie décrit la formulation d'une pommade à base d'extrait méthanolique et la mise en évidence des propriétés cicatrisantes et anti-inflammatoires de *Centaurea africana*.

- Les résultats obtenus seront présentés et discutés.

PREMIÈRE PARTIE
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES

I.1 Aperçu historique sur l'utilisation des plantes médicinales

L'histoire de la pharmacie et du médicament est indissociable de celle de la phytothérapie et de l'aromathérapie. L'usage des plantes à des fins thérapeutiques remonte à la naissance de l'humanité. Tracer l'histoire des plantes médicinales en phytothérapie conduit à retracer celle de l'humanité. Dès son origine, l'homme a cherché à calmer ses maux, en se tournant vers les ressources présentes dans son environnement naturel. La place primordiale des plantes dans l'arsenal thérapeutique ne s'est jamais démentie. Il faut souligner que la plupart des plantes utilisées en thérapeutique de nos jours, a été découverte bien avant les méthodes scientifiques d'exploration. Toutes les civilisations antiques (mésopotamienne, chinoise, égyptienne, grecque, indienne, etc...) étaient en possession d'un arsenal thérapeutique végétal (**Bruel, 2015**).

Les plus anciens documents, relatifs à la pharmacologie sont ceux que nous ont été légués par les civilisations du Proche-Orient Antique, d'Egypte et surtout de Mésopotamie. A ce sujet, Wallis Budge rappelle la contribution de l'assyriologue Campbell Thompson qui a montré que de nombreux noms de plantes dérivait du sumérien via l'arabe et le grec tels que coloquinte, caroube, cumin, myrrhe, mandragore, sésame, cyprès, lupin (**Budge, 1978 ; Guy Mazars, 2002**).

Héritière du savoir et des connaissances médicales accumulées d'Egypte, de Perse et de Babylone la version occidentale de la phytothérapie est née dans le berceau de la civilisation occidentale en Grèce.

Les remèdes à base de plantes dans la Chine ancienne remontent à plus de 4 000 années. La découverte de matières médicinales dans l'antiquité était étroitement liée à la vie et au travail des gens et à leurs conditions naturelles de vie. On s'était rendu compte que beaucoup de matières naturelles pouvaient être utilisées pour traiter des maladies, et une grande expérience dans ce domaine s'est progressivement accumulée. Le répertoire chinois de médicaments est l'une des sources les mieux documentées et les plus étendues, ainsi que celui dont l'utilisation est la plus intense ; il comprend plus de 7 000 espèces de plantes médicinales (**O.M.S. 1998**). L'Ayurveda est un système médical pratiqué principalement en Inde depuis près de 5000 ans. Il comprend des remèdes à base de plantes et d'herbes, tout en mettant l'accent sur l'harmonie entre le corps et l'esprit dans la prévention et le traitement des maladies (**Morgan, 2002**).

La conquête des pays méditerranéens par l'islam a donné lieu à l'échange des connaissances entre l'est (Chine, Inde, Perse) et l'ouest, permettant la floraison de toutes les sciences, spécialement la médecine et la pharmacologie. La pharmacologie arabe est fondamentalement à l'origine d'importantes découvertes (préparation des essences par distillation...) et a compté de célèbres praticiens. Les grandes figures scientifiques du calife arabe étaient Ibn el Razi Avicenne, Abulcasis, Ibn el Baytar et bien d'autres (**Ravina, 2011**).

Les plantes médicinales ont continué à être la principale source de produits utilisés pour l'entretien de la santé dans la médecine traditionnelle occidentale jusqu'au XIX^e siècle, lorsque Friedrich Wohler a synthétisé par voie accidentelle l'urée en 1828. Cette première synthèse organique dans l'histoire humaine a inauguré l'âge des composés synthétiques. Au cours des 100 années qui suivèrent, les drogues de synthèse sont devenues le pilier de la médecine occidentale (**Mendonca-Filho, 2000 ; Mohamed, 2012**).

I.2 La médecine par les plantes

Un grand nombre de médicaments vendus en pharmacie sont d'origine végétale. La tendance s'accroît. Selon des statistiques françaises et américaines, 40 % des spécialités pharmaceutiques actuelles dérivent de végétaux et, dans la seule pharmacopée française, l'on compte plus de 8 000 plantes ou principes actifs d'origine végétale dont les pays africains sont les premiers fournisseurs (**Aké- Assi, 1983**).

La notion de plante médicinale s'applique à tout végétal renfermant, dans un ou plusieurs de ses organes, des substances qui peuvent être utilisées directement à des fins thérapeutiques ou bien servir dans les synthèses chimio-pharmaceutiques partielles.

La drogue végétale désigne la partie de la plante médicinale directement employée dans la préparation des formes médicamenteuses (**UNESCO, 1979**). En France, comme en Europe, l'usage des plantes médicinales est réglementé par divers textes et dispositions, qui ont pour objectif de fixer un cadre général et des règles de sécurité. Depuis 1941, après la suppression du diplôme d'herboriste, les plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée relèvent du monopole pharmaceutique (Article L4211-1 du Code de la Santé Publique). La Pharmacopée française dépend de l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) et détermine une liste de plantes médicinales qu'elle définit comme des « drogues végétales possédant des propriétés médicamenteuses » (**Lapraz, 2011**).

Au sens de la pharmacopée française XI^e édition (2012), les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Selon la pharmacopée européenne VII^e édition, (2010), le terme de « plante médicinale » est réservé à

la désignation d'une espèce végétale dont au moins une partie contient des composés chimiques possédant une action thérapeutique établie (principe actif), utilisé soit -le plus souvent- sous forme séchée, soit à l'état frais. Par extension, on appelle souvent « plante médicinale » ou « plante » non seulement l'entité botanique, mais aussi la partie utilisée.

Une « drogue végétale » est (entre autres) une plante ou une partie de plante, utilisée en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais. Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques. Pour ces diverses utilisations, il s'agit soit des mêmes parties de plantes, soit de parties différentes (**Pharmacopée française 2000**).

I.3 Importance et niveaux d'utilisation des plantes médicinales

1.3.1 Utilisation de la plante médicinale en usage traditionnel

Les plantes ont constitué le premier et principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme et ce, pendant de nombreux siècles. Dans de nombreuses civilisations et sur tous les continents, les pharmacopées végétales se sont développées et enrichies grâce à une longue et riche expérience héritée des Ancêtres (**Khan, 2012 ; Khan, 2014**).

La modernité ou les révolutions culturelles n'ont pas altéré la sagesse approfondie de ce paradigme de médecine naturelle.

Avec un don d'observation inégalé, les anciens ont pu mettre en évidence des propriétés des plantes médicinales qui n'ont jamais été démenties par l'usage (**Carillon, 2009**).

En Afrique, les plantes utilisées par la médecine traditionnelle ont fait très souvent l'objet d'études ethnobotaniques, ethnopharmacologiques, chimiques, pharmacologiques et toxicologiques (**Tabuti et al, 2012 ; Singh et al, 2012**). La recherche de nouveaux principes actifs menée par les laboratoires pharmaceutiques et universitaires a permis d'expliquer et de justifier certaines utilisations traditionnelles (**Guedje, 2012**).

Cependant la médecine traditionnelle comporte un certain nombre de risque, elle est souvent source d'effets secondaires chez les patients : toxicité de certaines plantes, interaction avec les médicaments conventionnels (**Hmamouchi, 2012**). Ces pratiques traditionnelles doivent donc être encadrées du point de vue éthique et réglementaire, et il est nécessaire de s'assurer de leur innocuité, efficacité, qualité et de leur usage rationnel (**CIB, 2010**).

Le bassin méditerranéen figure parmi les régions les plus riches du monde sur le plan floristique. Il compte de 25000 à 30000 espèces et sous-espèces qui représenteraient plus de 4,3 % des végétaux de la planète. Environ 50 % de ces taxons sont endémiques (**Medail,**

1997, 1999 ; Ghrabi-Gammar, 2009 ; Quezel, 1985 ; Greuter, 1991 ; Myers et al, 2000). Près de 60 % de ces espèces ne se trouvent nulle part ailleurs. Cette richesse naturelle est due à la multiplicité des habitats : 40 600 km de côtes rocheuses et sableuses, de nombreuses chaînes de montagnes, des zones arides, des régions humides, des falaises, des plaines. Sur ses 5 000 îles et îlots, une flore spécifique s'est développée et certaines espèces très anciennes s'y sont maintenues jusqu'à aujourd'hui, à l'abri des perturbations (**KBF 2011**).

L'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée avec une superficie de 2 381 741° km². Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays. Ce sont des savoir-faires ancestraux transmis de génération en génération chez les populations, le plus souvent rurales. C'est aussi un héritage familial oral, dominant en particulier chez les femmes âgées et illettrées (**Ibert, 2016**). Dans les grandes villes comme Alger, il existe des herboristes, essentiellement au niveau des marchés, et leurs étals sont fréquentés par un large public qui va de l'adepte assidu, convaincu des bienfaits des médecines douces, au patient indigent en quête d'un traitement accessible (**Hammiche, 2013**).

1.3.2 - Utilisation de la plante médicinale en médecine

Historiquement parlant, la médecine classique n'existerait pas sans la phytothérapie. C'est avec le développement particulièrement de la pharmacognosie et les avancées des sciences biologiques, pharmacologiques, de la chimie et de la modélisation moléculaire, que l'on a pu isoler des composants purifiés des plantes et produire leurs dérivés partiellement synthétiques, puis fabriquer de nouvelles molécules synthétisées chimiquement, pour finalement les introduire dans l'arsenal de la médecine classique. Un grand nombre de principes actifs, qui ont aujourd'hui de l'importance, proviennent de la nature du moins en ce qui concerne leur structure de base (**HTA, 2005**). En effet, on estime qu'environ 40% de tous les médicaments sont soit des produits naturels, soit leurs dérivés semi-synthétiques (**Jacob, 2009**).

Le marché mondial annuel des herbes médicinales s'élève à 60 milliards de dollars (**Tilburt et Kaptchuk 2008**). À l'heure actuelle, les herbes sont appliquées au traitement des affections chroniques et aiguës et de diverses affections et problèmes tels que les maladies cardiovasculaires, les problèmes de prostate, la dépression. Les plantes demeurent indéniablement une source majeure de médicaments dans l'arsenal thérapeutique contemporain par leurs constituants et principes actifs. L'importance du règne végétal n'a jamais été démentie. Le pavot à opium qui est un très vieil analgésique et une plante

médicinale sédatrice (*Papaver somniferum*), a donné naissance à quatre médicaments importants qui sont utilisés aujourd'hui : la morphine, la codéine, la nalcopine et la papavérine. La tubocurarine, le relaxant musculaire le plus puissant, est dérivé du curare (*Chondroëndron tomentosum*). D'autres anesthésiants proviennent de plantes : la cocaïne, par exemple, est tirée du coca (*Erythroxylum coca*), la quinine (dérivée du genre *Cinchona*), qui est employée contre la malaria, l'une des maladies les plus mortelles. L'un des autres alcaloïdes présents dans l'écorce du cinchona : la quinidine, a montré un effet anti-arythmique et est utilisé aujourd'hui pour le traitement des maladies cardiaques. Un ancien remède bien connu la digoxine (du genre *Digitalis*), qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine (du genre *Ephedra*), que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes.

Depuis les années 1940 à nos jours, les composés naturels représentent 55 % des produits mis sur le marché en oncologie. Si l'on considère uniquement les petites molécules (sont exclus les vaccins et les composés biologiques), ce pourcentage atteint près de 80 % des médicaments pour la période 1981-2010, et 65 % depuis la commercialisation du premier anticancéreux dans les années 1940 (**Chast, 2012 ; Newman et Cragg, 2012 ; Pierre, 2012**).

Les médicaments dérivés de sources naturelles offrent une opportunité remarquable pour la découverte de médicament. L'extraction des ressources biologiques récoltées dans la nature conduit à de nouveaux principes actifs servant de modèles pour la synthèse des composés pharmacologiquement actifs. Les plantes médicinales ont souvent conservé leur popularité pour des raisons historiques et culturelles. La plante médicinale est un élément important de la médecine indigène, en effet dans le monde entier La botanique ethnique fournit une ressource riche pour la recherche et le développement de médicaments naturels grâce aux activités biologiques des métabolites secondaires naturels.

1-3-3 Utilisation scientifique de la plante médicinale

La valorisation des plantes médicinales peut apparaître sous la figure d'une polarité entre usages traditionnels, ancrés dans les cultures locales, et sources de principes actifs et de matières premières, qui servent à l'élaboration de composés chimiques semi-synthétiques, de modèle pour de nouveaux composés synthétiques et peuvent aussi être employées comme indicateurs taxonomiques pour la découverte de nouveaux composés pour la grande industrie internationale (**Ondui, 1993 ; Chominot, 2000**). Dans la recherche pharmaceutique moderne, de très nombreuses étapes de validation pharmacologiques et surtout toxicologiques aboutissant précédent les essais cliniques sur l'homme. Pour garantir la qualité, l'efficacité et

la sécurité des médicaments à base de plantes, il faut commencer par l'exploration ethnopharmacologique des pratiques ancestrales nécessitant la collaboration étroite entre plusieurs disciplines. Cela doit être un modèle de dialogue entre les tradipraticiens, l'ethnologue, l'ethnopharmacologue et le médecin. Ainsi, cette recherche contribue à mettre sur la piste et oriente plus rapidement vers la molécule susceptible d'avoir l'activité recherchée **(Desnottes, 1998 ; Moretti et al, 1993)**. Parallèlement une vérification botanique avec identification des espèces végétales s'impose. A cet effet, l'information requise comprend l'appellation binominale latine admise, les synonymes et les noms vernaculaires. Les travaux expérimentaux en chimie et en pharmacologie sur ces plantes médicinales peuvent aboutir à des validations d'usage **(Bruneton, 1992 ; Sevenet, 1994 ; IRD – SFE 2002)**. Il est absolument indispensable que les produits soient conformes aux dispositions réglementaires. Cependant, une des principales problématiques concernant la plante médicinale est le cloisonnement des connaissances scientifiques actualisées au sein des différentes disciplines concernées. C'est ainsi que l'on peut décrire une chaîne dynamique allant du produit plante médicinale jusqu'au patient/consommateur, avec un flux « connaissance » et un flux « produit » (Figure 1).

Chaque maillon de cette chaîne, représenté par une discipline, est dépendant, au niveau de la connaissance et donc des travaux de recherche qui en résultent, du maillon en amont et « nourrit » celui en aval. Cette approche multidisciplinaire est une nécessité pour une utilisation scientifique de la plante médicinale, dans toutes ses potentialités et en toute sécurité **(Duraffourd C, Lapraz, 2002)**.

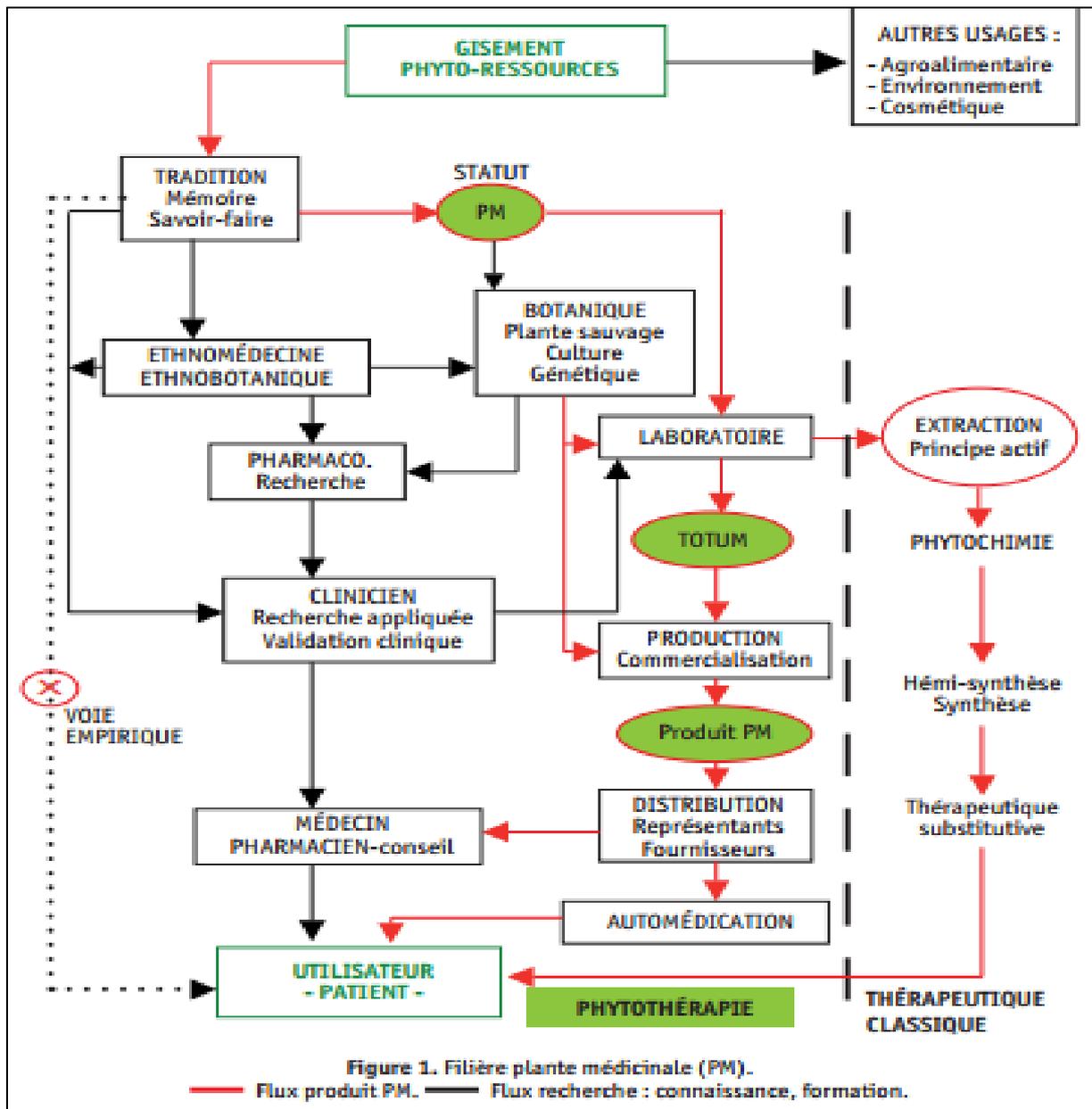


Figure 1 : Filière plante médicinale (Duraffourd, 2002).

I.4 Composés phytochimiques d'intérêt pharmacologique

Les plantes produisent un large éventail de composés organiques avec des structures très diverses. Ces composés organiques des plantes sont divisés en deux catégories :

La première catégorie englobe les métabolites primaires interviennent dans l'ensemble des voies de synthèse de la plante assurant les fonctions de base de la plante telles que la croissance, le développement, la respiration, la nutrition, ou la reproduction. Ces métabolites primaires rassemblent les acides aminés, les lipides, les carbohydrates et les acides nucléiques. Tous ces composés sont impliqués dans la structure et la physiologie des cellules

et des tissus et assure la croissance et la survie de la plante (**Sauvion et al, 2013**). Ces composés ont été largement perçus comme biologiquement insignifiants et ont historiquement reçu peu d'attention de la plupart des biologistes végétaux (**Croteau et al, 2000**).

La deuxième catégorie contrairement aux métabolites primaires, ne participent pas directement à la croissance et au développement de la plante (**Springob, 2009 ; Roze et al, 2011**). Ces composés diffèrent en fonction des espèces et interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont essentiels à la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que les parasites, les pathogènes et les prédateurs, mais aussi les pollinisateurs et les disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires (**Krief, 2003 ; Bouabid, 2016**)

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés et selon leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires des plantes peuvent être divisés en trois grands groupes :

- Composés polyphénoliques;
- Terpénoïdes;
- Alcaloïdes et composés soufrés.

Chacune de ces classes renferment une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales (**Gravot, 2008 ; Thomas, 2009**). La concentration des métabolites secondaires chez les plantes est variable et dépend du climat, de l'altitude ainsi que des différents stress biotiques et abiotiques (**Jost, 2016**).

1.4.1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une des principales classes de métabolites secondaires des plantes dont 8000 ont été isolés et décrits (**Ramos, 2007**). Ce sont des molécules organiques ubiquitaires du règne végétal également dénommés les polyphénols, cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substance aux structures variées. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther méthylique, ester, sucre, ...). Un critère supplémentaire, biosynthétique, permet de bien cerner les limites de ce groupe : un composé phénolique est un dérivé non azoté dont le ou les cycles aromatiques

sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate (**Brunton, 1993 ; Vercauteren, 1998**). Les familles de polyphénols sont nombreuses, on les subdivise en : phénols simples, acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques et coumarines, naphthoquinones, stilbénoides, auxquels s'ajoutent les formes polymérisées : lignanes, lignines ou tanins condensés (**Mehinagic, 2011**).

De nombreuses données scientifiques récentes suggèrent que les polyphénols ont la capacité de réguler une diversité de processus cellulaires et moléculaires par interaction avec des cibles protéiques, leur conférant des propriétés anti-athérogéniques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-carcinogéniques et neuroprotectrices. Les polyphénols sont aussi capables de diminuer d'autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires impliqués dans le syndrome métabolique (**Pietta, 2003 ; Amiot, 2009**).

L'expression du métabolisme phénolique au niveau des organes végétaux présente de très grandes différences à la fois qualitatives et quantitatives en fonction de multiples facteurs. De plus, les produits dérivés des végétaux après transformation (conservation, fermentation, broyage ...) est très souvent totalement différente de celui d'origine (**Fleuriet, 2013**).

a. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels les plus abondants contenus dans les végétaux qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (**Erlund, 2004**). Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havsteen, 2002**).

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques. Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (**Di Carlo, 1999**). La présence de plusieurs fonctions phénol confère à ces composés des propriétés antioxydantes. Leur abondance dans divers aliments et boissons, dont la consommation est réputée avoir des effets protecteurs contre différentes affections chroniques, notamment cardio-métabolique. Ainsi, des études chez l'animal ont montré l'impact d'une supplémentation du régime en divers flavonoïdes pour améliorer le profil des lipides sanguins, augmenter la vasodilatation, la pression sanguine ou la sensibilité à l'insuline, ralentir le développement des lésions d'athérosclérose, et réduire l'inflammation ou le stress oxydant (**Del Rio, 2013 ; Morand, 2014**).

b. Coumarines

La Coumarine a été isolé en 1820, doit son nom de classe à « Coumarou », le nom vernaculaire dans une langue amérindienne tupi de Guyane d'un arbre poussant en Amérique tropicale : le gaiac de Cayenne (*Dipteryx odorata*) de la famille des Fabacées (**Bruneton, 1999**). Il existe quatre sous-types principaux de coumarine : les coumarines simples, les furanocoumarines, les pyranocoumarines et les coumarines substituées par des pyrones. (**Ojala, 2001**). Présentes dans de nombreux végétaux, les coumarines ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides ortho-hydro cinnamiques. Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense contre les micro-organismes (y compris fongiques) (**Collin, 2011**). Les coumarines les plus répandus dans la nature sont l'umbelliférone et la scopolétine, qui sont présentés ci-dessous. L'umbelliférone est utilisée dans les écrans solaires en raison de sa capacité à absorber les rayons UV. La scopolétine, isolée du fruit de la passion, est couramment utilisée pour réguler la tension artérielle. Les dérivés de la coumarine sont des composés ayant été utilisé dans l'industrie pharmaceutique en tant que précurseur dans la synthèse d'un certain nombre de produits pharmaceutiques anticoagulants synthétiques (**Jain, 2012**), en commençant avec du dicoumarol (retiré de la thérapie actuelle). Jusqu'à présent, certaines coumarines, sont utilisées dans plusieurs pays. Les plus remarquables sont la warfarine et l'acénocoumarol (**Daly, 2013 ; Milatova, 2013**).

c. Lignanes, néolignanes et composés apparentés

Les lignanes et les néolignanes de nature polyphénolique sont très répandus chez les végétaux supérieurs et constituent un vaste groupe de substances naturelles. Le terme lignane a été introduit pour décrire un groupe de dimères de phénylpropanoïdes dans lesquels les unités phénylpropanes sont liées par le carbone central (C8) de chaque chaîne propyle.

Des centaines de molécules ont déjà été identifiées dans plusieurs dizaines de familles de plantes. Leur structure chimique se caractérise par le couplage de deux unités dérivées du 1-phénylpropane, provenant elles-mêmes du métabolisme de la phénylalanine et de précurseurs appelés monolignols, ce qui les rapproche des lignines qui entrent dans la composition de la paroi des cellules végétales (**Lamblin, 2008**). Chez les plantes, lignanes et néolignanes jouent un rôle encore assez mal connu, mais sans aucun doute important pour leur défense : des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antinutritives ont été décrites pour de nombreuses molécules de ce groupe (**Bruneton, 2016**).

d. Anthocyanosides

Les anthocyanes sont des métabolites secondaires de la famille des flavonoïdes avec des caractéristiques particulières, produits par les angiospermes. Ce sont des pigments colorés responsable de la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines. Les anthocyanes possèdent une structure de base, le 2-phenyl-1-benzopyrillium, (**Samouelian, 2009**) composé d'une génine telle que le malvidol, le delphinidol, le cyanidol, le pétunidol associé à un sucre : galactose, rhamnose ou xylose. Ce sont des molécules très oxygénées possédant des propriétés vitaminiques P par amélioration de la résistance des capillaires et diminution de leur perméabilité. Comportant trois cycles aromatiques, cette structure porte plusieurs fonctions hydroxyle dont l'une est glucosylée par différents oses (glucose, galactose, rhamnose, arabinose), oligosides ou hétérosides. Les structures finales des anthocyanes sont ainsi très variées et complexes (**Martini, 2011**). Les anthocyanes ont une action anti-inflammatoire, et selon les familles, elles possèdent des propriétés antidiarrhéiques, antibacillaire, antidiabétique, cholagogue, spasmolytique, astringente. A forte dose, les anthocyanes peuvent être toxiques (**Verbois, 2003**).

e. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénolique, hydrosolubles, très répandus dans le règne végétal, tous les organes végétaux peuvent en renfermer (racines, écorces, feuilles...).

Les tanins sont classés en tanins hydrolysables, dérivés de l'acide gallique combinés à des sucres. Ce sont des esters du glucose (ou de molécules apparentées et d'acides phénols) qui sont soit l'acide gallique (on parle alors des tanins galliques) ou soit de l'acide ellagique. C'est un dimère de l'acide gallique (on parle alors de tanins ellagiques) et en tanins dérivés de catéchol non hétérosidiques, n'ayant pas tous des propriétés tannantes, résultant de la polymérisation d'un nombre variable (flavane) de même squelette que les flavonoïdes et les anthocyanes mais à un degré d'oxydation plus faible (**Gazengel, 2013 ; Martini, 2011**).

Dans l'arsenal thérapeutique traditionnel, les tanins sont doués des propriétés astringentes prononcées qui hâtent la guérison des blessures et des muqueuses enflammées. En usage externe, ils sont utilisés, pour traiter les ulcères variqueux, les hémorroïdes, les engelures et les brûlures, et comme bains de bouche pour le traitement de l'inflammation et des maladies périodontales. En usage interne ils traitent la diarrhée et l'hypersécrétion des muqueuses intestinales (**Sereme, 2008**).

f. Quinones

Les quinones, sont des métabolites secondaires principalement dérivés de plantes. Plus de 1200 quinones furent décrites à la fin des années 1990. Ce sont des composés oxygénés résultant de l'oxydation de dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5- diénique (ortho-quinones).les quinones naturelles ont leur dione conjuguée aux double liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinone) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé naphthalène (naphthoquinones), anthracène (anthraquinones), naphthodianthrène (**Bruneton, 2009**).

Les quinones sont doués des différentes propriétés thérapeutiques, exploités pour leurs activités antimicrobiennes, purgatives, anti-protazoaires et antivirales, certaines quinones ont montré des effets anticancéreux (**Aithal, 2009 ; Brink, 2012**). Par ailleurs les quinones sont des composés irritants et fréquemment répulsifs.

1.4.2 Les terpénoïdes et les stéroïdes

Avec 15000 structures moléculaires connues les composés terpénoïdes constituent la famille la plus vaste et la plus diversifiée des composés organiques végétaux (**Gersbenzon, 1991**).

Ces composés chimiques sont similaires aux terpènes et sont dérivés d'isoprène à cinq atomes de carbone. Selon, le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : les monoterpénoïdes (2 unités isoprène : C10), les sesquiterpénoïdes (3 unités isoprène : C15), les diterpénoïdes (4 unités isoprène : C20), les sesterterpénoïdes (5 unités isoprène : C25), les triterpénoïdes (6 unités isoprène (**Jost, 2016**)). Les terpénoïdes des plantes sont largement utilisés depuis l'antiquité en herboristerie traditionnelle pour leurs qualités aromatiques : menthol et carvone comme arômes notamment et le camphre comme vasodilatateur des voies respiratoires par exemple. Certains terpènes présentent un intérêt thérapeutique : le taxol (diterpène) est un anticancéreux, l'artémisinine (sesquiterpène) qui permet aussi de lutter contre la malaria, l'acide rétinoïque (tétraterpène) quant à lui est un cicatrisant (**Santelli, 2012**).

On peut citer par ailleurs les stéroïdes et stérols qui sont des triterpènes tétracycliques. Ils sont synthétisés à partir d'un triterpène acyclique. Les stéroïdes qui possèdent un groupement alcool, ce qui est le cas chez pratiquement toutes les plantes, sont appelés stérols. Les stérols fréquemment abondants chez les plantes sont les stigmastérols et les sitostérols (**Hopkins, 2003**).

1.4.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment le groupe de substances végétales qui a la plus grande valeur taxonomique, précisément parce qu'ils sont les plus nombreux, les mieux connus et les plus faciles à identifier (**Hegnauer, 1969**). Les alcaloïdes sont chimiquement des matières organiques composés de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène, métabolites secondaires produits à partir d'acides aminés par des végétaux, des champignons ou certaines espèces animales, (**Schauenburg, 2005**). Les alcaloïdes figurent parmi les substances les plus importantes pour leurs propriétés pharmacologiques et médicinales. L'intérêt qu'on leur a porté reposait traditionnellement sur leur action physiologique et psychologique particulièrement violente chez l'homme. Leurs activités biologiques très variées (analgésiques, antimicrobiennes, antitumorales, antipaludiques ...) justifient l'intérêt qu'ils suscitent. Parmi les alcaloïdes qui ont incité le développement de plusieurs médicaments on peut citer la morphine, la cocaïne, la caféine, la nicotine et l'atropine (**Raven, 2013**). Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, de nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques (**Ziegler, 2008**).

CHAPITRE II : PRESENTATION DE LA PLANTES ETUDIEE

II-1 Ordre des Astérales

L'ordre des astérales comprend deux familles principale : les campanulacées avec 2200 espèces et les astéracées, la plus grande famille de plantes à fleurs avec au moins 23 000 espèces (**Guillot, 2010**). Les astérales sont des herbes pseudanthiales, dont les inflorescences sont des capitules des fleurs régulières et/ ou irrégulières, gamopétales, inférovariées. La soudure des anthères (synanthérée ou coalescence), temporaire ou permanente, se retrouve souvent dans cet ordre. Chez les campanulacées, le regroupement en inflorescences est moins systématique que chez les astéracées (**Spichiger, 2002**).

II-2 Présentation de la famille des Astéracées

Connues sous le nom de Composées (Composacées, Compositae). Selon le système de classification proposée par **Cronquist (1981)**, les astéracées constituent une importante famille de plantes appartenant à l'embranchement des Spermaphytes (plantes à graines) au sous embranchement des Angiospermes (plantes à fleurs, graine protégée par une enveloppe), classe des dicotylédones et à la sous-classe des Gamopétales (pétales soudés).

Les botanistes les considèrent comme les plantes les plus évoluées parmi les dicotylédones (**Grimaud, 2009**). La flore algérienne comprend environ 109 genres et plus de 408 espèces (**Quezel, 1963**).

Les Astéracées connaissent une distribution géographique mondiale et peuvent se rencontrer sur toute la surface du globe, elles sont particulièrement diversifiées dans les régions sèches, comme le Bassin Méditerranéen, l'Afrique australe, le Mexique et le Sud- Ouest des Etats-Unis, les régions arides d'Amérique du sud (**Botineau, 2009**).

II-2-1 Description botanique

Les astéracées sont des plantes érigées ou grimpantes, parfois arbustes ou arbres, annuelles, bisannuelles ou pérennes. Les feuilles des Astéracées sont habituellement alternes ou opposées, parfois en rosettes basales, simples, entières ou découpées, parfois composées. Les inflorescences, caractéristiques, en Capitule (plan convexe ou concave) entouré d'un involucre de bractées, présence ou non de bractées stériles sur le réceptacle capitulaire, entre les fleurs. Suivant le type de fleur composant le capitule, les inflorescences suivantes sont observées : tubuleuses composées uniquement de fleurs actinomorphes ; ligulées composées uniquement

de fleurs zygomorphes ligulées à cinq dents ; labiatiflores composées uniquement de fleurs zygomorphes bilabiées et, enfin, radiées, composées de fleurs zygomorphes ligulées à trois dents à la périphérie et de fleurs actinomorphes tubulées au centre (**Spichiger, 2002**).

La formule florale des Asteraceae est $5S/5P/5E/2C$. Les fleurs sont sessiles cyclique, gamopétale, hétérochlamyde, actinomorphe ou zygomorphe, isostémone, épigyne, bisexuée, unisexuée ou stérile. Celles-ci pouvant être tubuleuses, de forme identique ou non (bleuet, centaurée), ou encore les unes tubuleuses, les autres ligulées (marguerite, tournesol). La corolle est tubuleuse, régulière, ligulée ou bilabiée. Les étamines, au nombre de 5, sont insérées sur la corolle, les filets sont libres et les anthères sont soudées pour former un tube autour du style (synanthie). Le fruit est akène généralement surmonté d'un pappus (cypsèle) provenant du développement du calice. Graine à embryon droit sans albumen (**Cronquist, 2001 ; Singh, 2004**).

II-2-2 Position systématique de la famille des Astéracées d'après APG III

La classification actuelle des angiospermes (APG) place les astéracées dans l'ordre des *astérales* et reconnaît cinq sous-familles principales (**figure 2**) :

- Les deux premières sont des arbustes ou des plantes herbacées. Il s'agit de formes archaïques d'Astéracées, dont les fleurs sont à corolle zygomorphe bilabiée 1/4 (Barnadesioïdées) ou bilabiée 2/3 (Mutisioïdées); cette dernière comprenant le Gerbera, plante sud-africaine cultivée chez nous en serre pour ses beaux capitules en forme de marguerite; malgré les apparences de fleurs ligulées au centre et de fleurs tubulées en périphérie, toutes les fleurs sont en fait bilabiées.

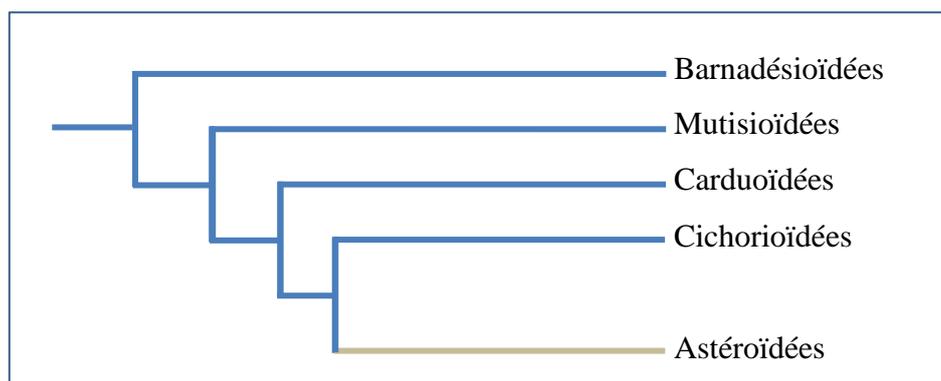


Figure 2 : Classification des Astéracées d'après APG III (**Dupond, 2012**).

- Les Carduoïdées possèdent des fleurs typiquement roses, bleues ou pourpres, toutes en tubes, comme celles du capitule du bleuet. Les chardons et beaucoup d'Astéracées épineuses méditerranéennes se retrouvent dans cette sous-famille.

- Les Cichorioïdées correspondent à des Astéracées à latex, dont le nom est évoqué dans les noms comme Lactuca, Laitue, Laiteron. C'est lui qui donne un goût amer aux chicorées et aux endives. Les capitules ne portent que des fleurs ligulées terminées par cinq dents, formant une languette typiquement jaune, parfois bleue.
- Les Astéroïdées, forment l'essentiel des Astéracées avec 16 000 espèces. Ce groupe diversifié caractérisé par ses capitules « radiés », comportant au centre, des fleurs tubulées généralement jaunes et à la périphérie des fleurs ligulées terminées par 3 dents, blanches comme chez la Pâquerette ou la Marguerite ou d'autres couleurs. Dans ce groupe on inclue aussi des espèces ayant perdu secondairement leurs fleurs ligulées comme la Tanaïsie, l'Eupatoire, la Santoline et les Armoises. Les Astéroïdées sont-elles mêmes divisées en nombreuses tribus (**Dupond, 2012**).

II-2-3 Utilisations et intérêts économiques des Astéracées

Le meilleur exemple de l'importance économique de cette famille est certainement la production de tournesol, cultivé pour ses graines oléagineuses. L'huile de tournesol avec 12,6 millions de tonnes en 2010 représente 9 % de la consommation mondiale en huiles végétales (tous usages confondus), ce qui la place au 4^e rang derrière les huiles de palme (leader depuis 2005), de soja et de colza (**Jouffret et al, 2011**). Les cultures de tournesol et de carthame offrent des débouchés multiples et possèdent de nombreuses applications potentielles comme lubrifiants, détergents, plastiques, peintures, produits cosmétiques, pharmaceutiques (**Evrard, 1993**) ainsi que dans la recherche de nouvelles énergies renouvelables (biodiesel Diester[®]) et la chimie renouvelable (peinture, liants pour bitume routier) (**Merrienn, 2012 ; Sensöz et al, 2008**). D'autres espèces d'Asteraceae sont des plantes à la base de l'alimentation comme les laitues (genre *Lactuca*), l'artichaut (*Cynara*), la chicorée (*Cichorium*). Le latex de certaines espèces, peut être utilisé pour fabriquer du caoutchouc naturel. D'autres espèces sont ornementales : *Aster*, *Tagetes*, *Chrysanthemum*, *Dahlia*, *Zinnia*. De nombreux usages et propriétés diverses ont été attribués aux Astéracées, notamment des propriétés anti tumorale, cytotoxique antimicrobienne, antivirale, antifongique, leishmanicide, trypanocide, antipaludique, antidiabétique et hémolytique (antioxydante, antiacétylcholinestérase antiinflammatoire, antinocioceptive, cicatrisante et anti-ulcéreuse (**Capelari-Oliveira, 2011 ; Zapata, 2014 ; Tundis, 2009 Sobrinho, 2016 ; Mi Seo, 2014 ; Ghatnekar, 2011**). Cette liste est loin d'être exhaustive.

II-3. Présentation du genre *Centaurea*

L'étymologie de *Centaurea* vient de « kentaurion », nom de diverses plantes médicinales dédiées au Centaure Chiron. La légende veut que le Centaure Chiron, moitié homme moitié cheval, précepteur du fils d'Ulysse, Télémaque, ait découvert les vertus médicinales des Centaurées dont le Bleuet. La plante le sauva de terribles douleurs dont il était l'objet après qu'une flèche empoisonnée se soit plantée dans son genou (**André, 1956 ; Beloued, 1998**).

Le genre *Centaurea* est l'un des plus importants, appartenant à la famille des astéracées, il comprend 700 espèces (**Amberger, 1960 ; Hellwig, 2004**).

Les centaurées sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou le plus souvent vivaces. Les feuilles non décurrentes, sur la tige ; les inférieures pennatifides ; les supérieures entières et linéaires. Capitules solitaires au sommet de la tige ou des rameaux. Capitules multiflores à fleurs homomorphes ou dimorphes. Involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Bractées soit homomorphes soit dimorphes, soit polymorphes. Fleurs marginales généralement neutres et souvent rayonnantes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes ; celles du disque hermaphrodites et ± irrégulières. Anthères sagittées à la base. Style à branches courtes. Akènes oblongs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non. Aigrette soit absente, soit présente et simple ou double, persistante ou caduque. Le réceptacle plan ou subplan est garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque (**Quézel et al 1963**).

En Algérie, Le genre *Centaurea* est représenté par 45 espèces dont 7 au sud (**Mabberley, 1987 1987 ; Quézel & Santa 1963**). Les espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités antiinflammatoire (**Erel, 2014**), antibactérienne (**Skliar et al, 2005**), antifongique (**Skaltsa et al, 2000**), antidiabétique (**Dalar, 2014**), cicatrisante (**Akkol, 2009**), anti-rhumatismale, hépatoprotectrice (**Shoeb, 2006 ; Flamini, 2002**) et antiulcéreuse (**Gurbuz, 2007**). Les études phytochimiques des différentes espèces de ce genre ont montré leur richesse en sesquiterpènes, triterpènes, stéroïdes, alcaloïdes, lactones sesquiterpènes et en composés phénoliques notamment les flavonoïdes (**Flamini et al, 2002 ; Flamini et al, 2004 ; Massiot et al, 1985 ; Sarker et al, 2001**).

II.3. Présentation de l'espèce *Centaurea africana*

L'espèce *Centaurea africana* est connue sous plusieurs dénominations scientifiques à savoir *Rhaponticoides africana* (Lam.), (Agab. & Greuter, 2003), *Centaurea tagana* var. *africana* (Lam.) (Batt ; 1889). L'espèce est endémique en Algérie et Tunisie : *Centaurea africana* est très répandue en particulier dans l'Est et le Sud-Est, et surtout dans les communes suivantes : Ouagnoun, Draa El Mizane et Tizi Rached.

Centaurea africana (Photo 1) est une plante annuelle, vivace, ferme, dressée et puissante (60-150 cm). Sur sa racine poussent plusieurs tiges droites, glabres, un peu rameuses, et hautes de quatre pieds.



Photo 1 : *Centaurea africana* dans son espace naturel (photo personnelle).

Ses feuilles radicales indivisées, oblongues ou elliptiques, dentées (rarement lyrées-pinnatifides) radicales sont amples. Akènes à aigrette deux fois plus courte. Capitules globuleux, de 15-20 mm de diamètre. Plante vivace, vert glauque. Feuilles pennatiséquées à segments aigus. Capitules à fleurs jaunes. Bractées de l'involucre à marge hyaline. Les tiges sont hautes de trois ou quatre pieds, glabres, et plus abondamment garnies de feuilles droites, glabres, un peu rameuses et hautes (Quézel & Santa 1963, Panckoucke, 1783).

L'espèce *centaurea africana* appartient au sous-embranchement des angiospermes, la classe des dicotylédones, l'ordre des Asterales, la famille des Compositae, sous famille des tubuliflores, tribus des cynarées et le genre de *centaurea* (Quezel et al, 1963).

CHAPITRE III : GENERALITES SUR QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES

III.1 Stress oxydant et antioxydants

III.1.1 Généralités

Au milieu des années 1950, (**Gerschman et al, 1954**), montrent que l'oxygène, molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme. Inspiré par ces travaux, en 1956, Harman propose la théorie radicalaire du vieillissement selon laquelle les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les organismes aérobies induiraient des dommages oxydatifs sur les biomolécules qui, en s'accumulant, seraient responsables du vieillissement. En 1969, date clé dans l'histoire du stress oxydant, les américains McCord et Fridovich (**McCord, 1969**) isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant : la super oxyde dismutase (SOD) qui élimine le radical libre anion superoxyde produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale montre indirectement que des radicaux libres sont produits dans notre organisme. Ceci est alors le point de départ de très nombreuses recherches sur les sources de production de l'anion superoxyde et sur ses rôles pathologique et physiologique (**Defraigne, 2008**).

III.1.2 Origine du stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont produites en permanence par différents types cellulaires. Cette synthèse est assurée par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants semblent être les NAD(P) H oxydases, les NO synthases et la chaîne respiratoire mitochondriale (**Beaudeau, 2006**). Les ERO sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables dont la production est stimulée par des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines (**Morel, 1998**) et leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques). (**Delattre, 2005**). Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. Cependant cette homéostasie redox peut être rompue, soit par une production excessive d'ERO (comme dans le vieillissement ou l'athérosclérose), soit par une diminution des capacités antioxydantes (comme chez les personnes souffrant d'obésité et les fumeurs). On parle alors de stress oxydant (**Migdal, 2011**).

Toutes les macromolécules cellulaires sont des cibles potentielles des ERO. Ainsi, les bases nucléiques sont susceptibles d'être oxydées, conduisant notamment à la formation de 8-oxo-guanine, à l'origine de mutations géniques. Les protéines sont aussi la cible des ERO, en particulier certains acides aminés comme la cystéine, la méthionine et la tyrosine. Cette oxydation joue un rôle dans la signalisation mais peut aussi conduire à une toxicité cellulaire. Les ERO réagissent aussi avec les acides gras insaturés, conduisant à la formation d'hydroperoxydes. Ils contribuent aussi à la glycation des protéines et à la formation des dérivés de cette glycation qu'on appelle les AGE (*advanced glycation endproducts*). Néanmoins, il serait erroné de voir uniquement les ERO que sous l'angle de leur toxicité. Les ERO, et plus généralement les réactions d'oxydo-réduction, jouent un rôle physiologique considérable, en particulier dans les cascades de signalisation. Le NO en est un exemple classique, puisqu'en activant la guanylate cyclase cytosolique, il exerce des fonctions physiologiques dans le système vasculaire, immunitaire, neuronal et métabolique (**Barouki, 2006 ; Finkel, 2003**).

III.1.3 Pathologies liées au stress oxydant

Les conséquences du stress oxydant ont été associées, directement ou indirectement à de nombreuses pathologies. Ainsi les ERO ont été impliquées dans la genèse de certains cancers. L'effet cancérigène des radicaux libres oxygénés résulte du pouvoir oxydant qu'ils exercent sur les chaînes d'ADN (mutagénèse) sur les protéines (dysfonctionnement, perte de structure) ou les lipides membranaires (lipoperoxydation). Ces composés oxydants peuvent être d'origine exogène (rayonnement, intoxication) ou endogène. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (**Girodon et al., 1997; Sohal et al., 2002**). Le stress oxydatif serait impliqué dans des plus importantes maladies contemporaines. Les maladies dégénératives seraient imputables au stress oxydatif généré par les radicaux libres. Ainsi la maladie de parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose amyotrophique ont été associées à un phénomène oxydatif (**Libbey, 2007**). D'autres affections humaines ou animales incluent donc un stress oxydant, local ou général, dans leur pathogenèse au même titre que l'inflammation à laquelle il est souvent associé. Notamment le cas des pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire), les altérations cardiaques, comme les arythmies post-infarctus, dues à l'ischémie suivie de reperfusion. Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas des

maladies à composante infectieuse comme le sida ou le choc septique, ou encore le diabète, la maladie de Parkinson ou l'insuffisance rénale (**Baudin, 2006 ; Favier, 2006**).

III.1.4. Mécanismes de défense contre le stress oxydant

La production physiologique d'ERO est régulée par des systèmes de défense composés de :

- *Métalloprotéines, enzymes (superoxyde dismutases (SODs))*, qui permettent l'élimination des anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) ou tout au moins de les maintenir à un niveau de concentration assez bas, par dismutation en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en une molécule d'oxygène (O_2).

- *Catalase*, permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier en libérant de l'oxygène et de l'eau, son rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux. Elle est considérée comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO.

- *Glutathion peroxydases (GPx's)* : ces enzymes réduisent le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG). Ils jouent ainsi un rôle très complexe dans la régulation de l'apoptose mais aussi dans la transcription de gènes pro- et anti-inflammatoires ou de gènes codant pour l'expression d'enzymes antioxydantes.

- *Molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone, ...)* et *de protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine)* qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation d'ERO.

- *Certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium* sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn-SOD, MnSOD, SeGPx).

- *Les flavonoïdes (quercétine, rutine, resvératrol, pycnogénol)* (**Goudable et al. 1997 ; Moran, 2001 ; Gardès-Albert., 2003 ; Pincemail, 2002**).

III.1.5 Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire

Plusieurs méthodes sont utilisées aujourd'hui pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante de nombreuses substances biologiques par piégeage de radicaux (tableau 01) différents, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity ou Capacité d'absorption des radicaux libres); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) ; ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'existe pas de méthode universelle pour mesurer quantitativement l'activité antioxydante d'une façon précise. Pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires (Cristina et al, 2009).

Tableau 1 : Aperçu non exhaustif des différents tests utilisés dans la mesure de la capacité antioxydante globale du plasma et des matrices alimentaires.

Méthode	Nom	Générateur de radicaux libres/oxydant	Standard	Mesure/calcul
Tests SET				
TEAC	<i>Total equivalent antioxidant capacity</i>	ABTS + horseradisch peroxydase + peroxyde d'hydrogène → formation du radical (ABTS••)	Trolox	Décoloration du radical ABTS•• : $\lambda = 734$ nm unité : équivalent Trolox
FRAP	<i>Ferric reducing ability of plasma</i>	Réduction du Fe(III)(TPTZ) ₂ Cl ₃	Fe(II)	Changement d'absorbance, à $\lambda = 593$ nm unité : Frap par rapport à une solution de Fe(II)
CUPRAC assay	<i>Cupric reducing antioxidant capacity</i>	Réduction du cuivre (II) néocuproïne	Acide urique	Absorbance à $\lambda = 450$ nm unité : équivalent d'acide urique
DPPH assay	2,2-diphényl-L-picrylhydrazyl	DPPH	Trolox	Diminution de l'absorbance à $\lambda = 515$ nm unité : équivalent Trolox
Tests HAT				
Crocin Bleaching assay		2,2'-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (AAPH) → radicaux peroxydes de nature hydrophyle	Trolox	Blanchiment de la crocine à $\lambda = 443$ nm unité : équivalent Trolox
TRAP assay	<i>Total radical trapping parameter</i>	2,2'-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (AAPH) → radicaux peroxydes de nature hydrophyle *	Trolox	Diminution de la fluorescence de la β -phycoérythrine ($\lambda_{ex} = 495$ nm et $\lambda_{em} = 575$ nm) unité : équivalent Trolox
ORAC assay	<i>Oxygen radical antioxidant capacity</i>	2,2'-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (AAPH) → radicaux peroxydes de nature hydrophyle *	Trolox	Diminution de la fluorescence de la fluorescéine f ($\lambda_{ex} = 485$ nm ; $\lambda_{em} = 520$ nm) unité : équivalent Trolox

(RPE). SET: single électron transfert ; HAT : hydrogen atom transfert

(Pincemail, 2014)

III.2. Activité antimicrobienne

III.2.1. Introduction

La lutte contre les souches microbiennes est liée à leur pathogénicité et se fait principalement par l'usage d'antibiotiques (**Aouni, 2013**). Un antibiotique est une molécule naturelle, synthétique ou semi-synthétique dont le rôle est de détruire des micro-organismes et bactéries (effet bactéricide) ou d'en freiner la multiplication sans les détruire radicalement (effet bactériostatique). Quatre catégories d'antibiotiques peuvent être distinguées par rapport à leur mode d'action (**Buxeraud, 2014**).

Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne ; les antibiotiques inhibant la synthèse des protéines ; les antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'ADN ; les antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique. Les antibiotiques sont l'une des plus importantes découvertes du XX^e siècle. Les premiers furent les sulfamides développés en 1935 puis la pénicilline au lendemain de la seconde guerre mondiale. Si l'apparition de ces antibiotiques avait suscité un espoir de voir les maladies infectieuses à jamais jugulées, les prescripteurs furent déçus très rapidement par l'apparition de bactéries résistantes. L'apparition de phénomènes d'antibiorésistance qui se traduisent par la capacité d'un microorganisme à résister aux effets des antibiotiques entraînant leur inefficacité. Par ailleurs, la multiexposition fréquente des individus aux différents types d'antibiotiques à usage sanitaire, agroalimentaire ou environnemental et le développement inquiétant des mécanismes de résistance de nombreuses souches microbiennes exposées fréquemment à cet arsenal d'antibiotiques devenant de moins en moins efficace (**Aouni, 2013**).

La propagation de souches de bactéries résistantes aux antibiotiques multiplie les situations d'impasse thérapeutique, et entraîne des dizaines de milliers de décès humains par an. Cette dramatique progression est essentiellement liée aux mauvais usages, tant chez l'homme que chez les animaux. Il a été graduellement démontré que les bactéries – humaines et animales – peuvent se transférer leurs résistances lorsqu'elles entrent en contact (**Berger, 2016**). Face à ce phénomène, la découverte de nouvelles molécules antibactériennes, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces, est devenue une nécessité absolue.

Les plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine, la morphine, la quinine ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche, pour découvrir de nouveaux principes actifs pouvant annoncer une révolution de la médecine (**Barchan, 2016**).

III.2.2 Méthodes d'essai des propriétés antimicrobiennes des extraits végétaux

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'un principe actif se fait grâce à la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La CMI de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures (Basli, 2012) et de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) qui correspond à la concentration en principe actif permettant de tuer 99,9 % des bactéries à 24 heures.

La CMI est actuellement la seule valeur pour laquelle il existe un consensus en termes de définition et d'utilisation, pour l'évaluation des activités antibactériennes et antifongiques. Les protocoles permettant de déterminer la CMI apparaissent dans de nombreuses recommandations : le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) pour la France (Jehl, 2014) ; l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Kahlmeter et al, 2006) au niveau européen ; le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) au niveau américain (CLSI, 2012). A cette liste de recommandations, il convient également de citer les normes issues de l'ISO (International Organization for Standardization) dont fait partie l'AFNOR (Association Française de Normalisation). Trois méthodes sont fréquemment utilisées et citées dans la littérature : la dilution du principe actif en milieu solide ou « macrométhode en milieu gélosé » (considérée par beaucoup d'auteurs comme la méthode de « référence ») ; la diffusion du principe actif en milieu solide ou « méthode des disques » ; et la dilution du principe actif en milieu liquide, macro- ou micro-méthode en milieu liquide (Fontanay, 2015).

III.3. Activité antiulcéreuse

III.3. 1. Généralités sur les ulcères gastriques

L'ulcère résulte du déséquilibre entre l'agression chlorhydropeptique et les mécanismes de défense (barrière muqueuse) en un point précis de la muqueuse. La barrière muqueuse a une composante pré-épithéliale (mucus, sécrétion de bicarbonates et phospholipides), épithéliale (cellules de surface) et sous-épithéliale (flux sanguin muqueux). Les prostaglandines (PGS) stimulent ces mécanismes de protection (CDU-HGE, 2012). L'ulcère, qu'il soit gastrique ou duodénal, entraîne une perte de substance plus ou moins étendue de la paroi digestive qui atteint la couche musculaire. Il guérit en laissant une cicatrice. On le différencie des érosions, abrasions, exulcérations superficielles qui n'atteignent pas la couche musculaire et qui guérissent sans cicatrice (Togola, 2014).

II.3. 2. Physiopathologie de la maladie ulcéreuse

Les ulcères résultent d'un déséquilibre entre les facteurs de protection de la muqueuse (production de bicarbonate, résistance de la muqueuse, production de prostaglandines, circulation sanguine...) et les différents mécanismes de destruction de celle-ci. Le mécanisme physiopathologique qui aboutit à la formation de l'ulcère est complexe, et fait intervenir de nombreux médiateurs de l'inflammation, et des facteurs environnementaux sur un terrain génétique particulier (**Bouarioua, 2007**). Ces mécanismes impliquent notamment *H.pylori*, dans 90 % des cas, ainsi certaines pathologies, la prise de certains médicaments comme l'ingestion chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), l'hypersécrétion gastrique acide, par la consommation importante d'alcool, de tabac, de caféine, de certaines substances illicites, par le stress et les antécédents familiaux.

III.3. 3. Histologie de l'estomac

La paroi gastrique est constituée d'une muqueuse, d'une sous-muqueuse, d'une musculuse, et d'une sous séreuse. Histologiquement au niveau de la muqueuse gastrique on distingue les cryptes et les glandes (figure, 3). L'épithélium de surface est en continuité avec les cryptes gastriques plus en profondeur, les glandes communiquent avec le fond des cryptes.

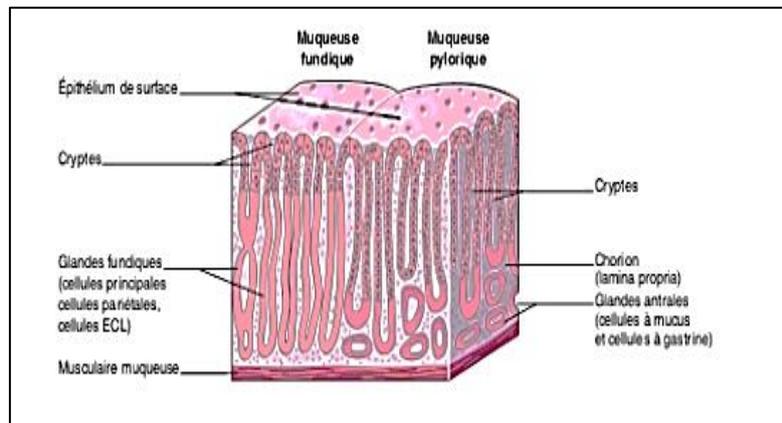


Figure 3 Structure histologique de la paroi gastrique (**Wendum, 2013**).

En pathologie, certaines lésions atteignent de manière préférentielle la muqueuse fundique ou antrale. Une gastrite chronique est définie par une diminution du volume glandulaire. Les pertes de substance sont définies par la profondeur de l'atteinte de la paroi. L'érosion est une perte de substance de l'épithélium de surface, l'ulcération une perte de substance limitée à la muqueuse ou la sous muqueuse, l'ulcère est une perte de substance atteignant la musculuse (**CDU-HGE, 2014**).

III.3. 4. Traitements des ulcères

Le traitement médical reste identique que l'ulcère soit gastrique ou duodénal. L'objectif est non seulement de diminuer l'acidité gastrique, ce qui permet aux ulcères de guérir tout en éliminant les douleurs, mais aussi d'éradiquer la bactérie *Helicobacter pylori* (Togola, 2014).

La cicatrisation de la lésion ulcéreuse est obtenue plus ou moins rapidement, selon le siège de l'ulcère et l'importance de la réduction sécrétoire obtenue (Grouzard, 2016). Il repose essentiellement sur l'utilisation d'inhibiteurs de la pompe à protons (oméprazole, lansoprazole) stoppant spécifiquement la sécrétion d'acide chlorhydrique. Cette famille de molécules se lie de manière covalente à cette pompe et ce pour toute la vie de la cellule. Ainsi tant que la cellule ne synthétise pas de nouvelles pompes, la sécrétion d'acide ne peut reprendre. Ceci explique qu'une seule dose journalière d'inhibiteurs à protons suffit (Cargile, 2004).

En pratique aujourd'hui, le traitement de la maladie ulcéreuse repose sur une trithérapie capable d'éradiquer dans 90% des cas *Helicobacter pylori*. Le traitement d'éradication de première ligne associe :

- Un inhibiteur de la pompe à protons (IPP) matin et soir (dose pleine ou demi-dose selon la molécule) ;
- Deux antibiotiques parmi les suivants selon les contre-indications: amoxicilline (1g × 2/j), clarithromycine (500mg × 2/j), métronidazole (500 mg × 2/j).

En cas d'ulcère gastrique, le traitement d'éradication de 7 jours est systématiquement complété par 3 à 7 semaines supplémentaires d'IPP à pleine dose (Grouzard, 2016).

III.4. Activité hémostatique

Toute rupture de l'intégrité du circuit vasculaire est à l'origine d'une fuite sanguine. Il met en jeu une série de processus cellulaires et biochimiques assurant l'obturation de la brèche et le contrôle de l'hémorragie. L'hémostase est une fonction physiologique complexe faisant intervenir un ensemble de phénomènes indépendants, mécaniques cellulaires et biochimiques, qui assurent en permanence un équilibre entre agrégation plaquettaire, coagulation et fibrinolyse. Trois étapes essentielles se succèdent (figure, 4) : la formation rapide d'un amas dit "clou" plaquettaire : hémostase primaire ; puis sa consolidation par la formation d'un réseau de fibrine et d'un caillot sanguin : hémostase secondaire ou coagulation sanguine ; enfin, un processus de fibrinolyse qui intervient par la suite, à la fois pour limiter l'extension du caillot et assurer son élimination progressive après réparation des parois vasculaires lésées (Deniau, 2013 ; Revel, 2004).

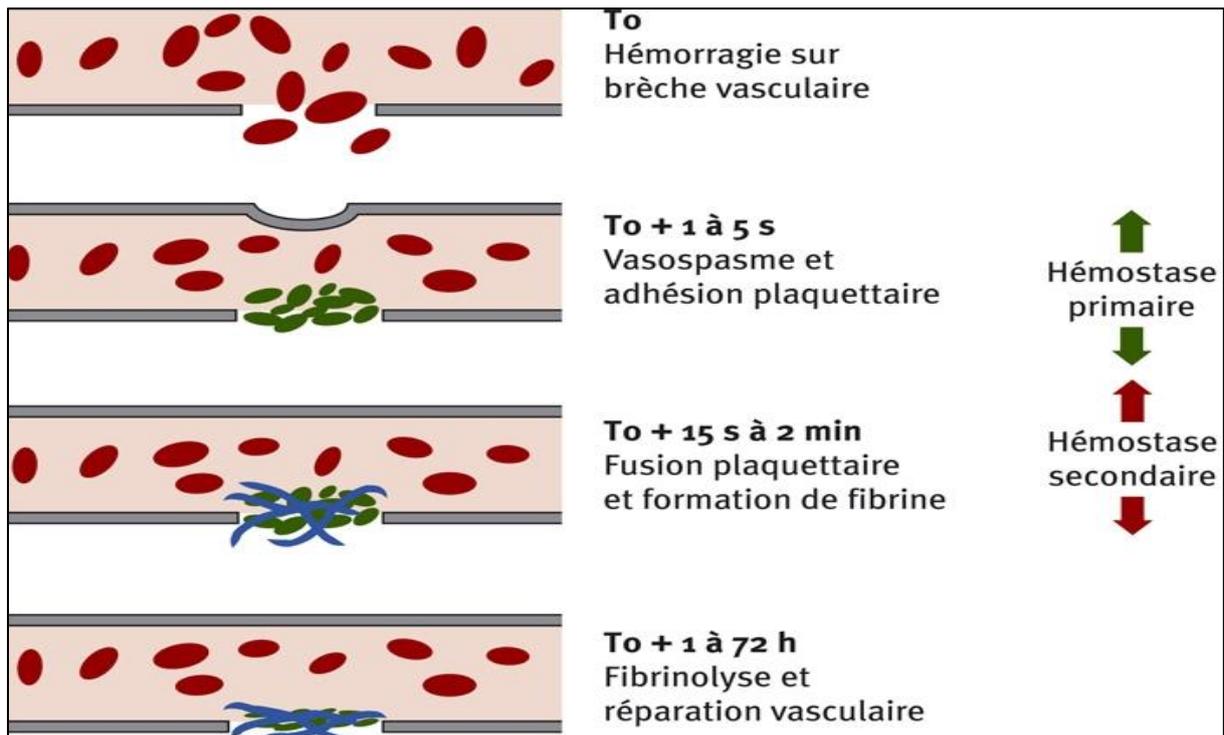


Figure 4 : Étapes de l'hémostase (Guyton, 2003).

L'ensemble de ces processus est étroitement régulé par la mise en œuvre d'un système très complexe d'activateurs et d'inhibiteurs, permettant à l'hémostase de se développer au foyer même de la brèche vasculaire sans extension à distance (Revel, 2004).

III.4.1. Hémostase primaire

L'hémostase primaire est l'ensemble des phénomènes qui contribuent à l'arrêt du saignement par formation d'un caillot ou clou plaquettaire. Elle fait intervenir la paroi vasculaire, les plaquettes et deux facteurs plasmatiques, le facteur de von Willebrand (vWF) et le fibrinogène (Harif, 2015).

Il existe quatre étapes successives principales :

- La vasoconstriction, qui constitue la réponse immédiate à toute lésion vasculaire en grande partie secondaire à un réflexe neurogène du système sympathique (Kumar, 2005) ;
- L'adhésion plaquettaire au sous-endothélium au niveau de la brèche vasculaire, par l'intermédiaire du VWF, du collagène et de différentes glycoprotéines situées sur la membrane plaquettaire (Lehot, 2011) ;
- La sécrétion plaquettaire correspondant à la libération du contenu des granules intraplaquettaires dont des facteurs de coagulation et des molécules activatrices des plaquettes qui vont amplifier l'activation plaquettaire et les phénomènes de coagulation.

- L'agrégation plaquettaire en réponse à l'activation des plaquettes par différents stimuli tels que la thrombine, l'adénosine disphosphate (ADP), le collagène et l'acide arachidonique (**Dargaud, 2010**).

III.4.2. Hémostase secondaire ou coagulation plasmatique

La coagulation plasmatique est l'un des principaux éléments de l'hémostase. Elle consiste en une cascade enzymatique faisant intervenir des protéines plasmatiques, les facteurs de la coagulation qui pour la plupart sont synthétisées par le foie (**Diquélou, 2006**).

Cette cascade aboutit à la formation de thrombine à l'endroit de la lésion vasculaire. Les molécules de fibrine adhèrent à la surface du vaisseau lésé et forment un réseau fibrillaire lâche qui emprisonne des cellules sanguines y compris les plaquettes. Celle-ci transforme le fibrinogène plasmatique soluble en réseau de fibrine insoluble à l'origine d'un thrombus, la fibrine est ensuite dégradée par le système fibrinolytique.

Le facteur plasmatique de la coagulation, le facteur X, est sollicité et convertit la prothrombine en thrombine ; le facteur X est lui-même présent dans le plasma sous forme inactif et doit être activé par un autre facteur lui-même activé et ainsi de suite par de réactions successives dans laquelle chaque élément devient l'enzyme ou le cofacteur nécessaire à la réaction suivante. Dans l'ensemble douze facteurs plasmatiques participent à la transformation du fibrinogène soluble en un réseau de fibrine insoluble. Ces facteurs sont désignés par des chiffres romains. Normalement, ils sont toujours sous forme inactive dans le sang (**Sherwood, 2015**).

Le phénomène de coagulation comporte deux voies d'activation : la voie intrinsèque, purement sérique dans laquelle tous les éléments nécessaire de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur, et la voie extrinsèque qui pour être activée nécessite la présence d'éléments tissulaire appelés thromboplastine tissulaire (**Codine, 2005**). Ces deux voies convergent vers une voie commune aboutissant à la formation de thrombine et à la transformation de fibrinogène en fibrine (**Chassot, 2017**).

III.4.3. Méthodes explorant l'hémostase

III.4.3.1 Les principaux tests explorant l'hémostase primaire

III.4.3.1.1 La numération plaquettaire

C'est un test primordial. Il fait partie de tout bilan sanguin. Les plaquettes interviennent dans la première étape de l'hémostase primaire pour participer à la formation du « clou plaquettaire » en cas de brèche. La numération plaquettaire permet de détecter une thrombopénie et toute thrombopénie doit être vérifiée sur un prélèvement effectué sur un tube citraté ou hépariné (Codine, 2005).

III.4.3.1.2 Le temps de saignement (TS) correspond au délai nécessaire à l'arrêt d'un saignement provoqué par une petite incision au niveau des vaisseaux superficiels. Le TS est le seul test d'exploitation globale de l'hémostase primaire, mais il manque de sensibilité et de spécificité. Ainsi, la réalisation isolée d'un TS ne permet pas à elle seule de prédire un risque hémorragique spontané ou provoqué. Il n'est pas réalisé dans le bilan de première intention.

III.4.3.1.3 Le facteur Willebrand, présent dans le plasma et les plaquettes. Il existe deux méthodes de dosage : une méthode immunologique qui quantifie le facteur Willebrand par son antigénicité et une méthode fonctionnelle qui quantifie le facteur de Willebrand par son activité cofacteur de la ristocline.

III.4.3.2 Les principaux tests explorant l'hémostase secondaire (Berthélémy, 2014)

III.4.3.2.1 Le temps de Quick (TQ) est le temps (en secondes) pendant lequel le plasma coagule en présence d'un réactif, la thromboplastine. Il explore la voie extrinsèque de la coagulation, en particulier trois des quatre facteurs vitamine K dépendants (II, VII et X).

III.4.3.2.2 Le taux de prothrombine, exprimé en pourcentage. Il explore la voie extrinsèque de coagulation, correspond au TQ comparé au temps d'un plasma témoin. Il correspond à l'activité du complexe prothrombinique.

III.4.3.2.3 Le temps de céphaline activée (TCA) est le temps de coagulation d'un plasma citraté déplaquetté en présence de calcium, d'un substitut plaquettaire (la céphaline) et d'un activateur de la phase contact. Ce test explore la voie intrinsèque de la coagulation. Il est exprimé en secondes.

III.4.3.2.4 Le temps de thrombine (TT) est le temps de coagulation d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, en présence de thrombine. Il explore la transformation du fibrinogène en fibrine. Il est exprimé en secondes.

III.4.4. Les médicaments hémostatiques

De nombreux médicaments hémostatiques appartiennent à plusieurs classes pharmacologiques sont disponibles pour traiter ou prévenir des manifestations hémorragiques survenant en l'absence de toute anomalie caractérisée de l'hémostase ou chez des porteurs d'une anomalie de l'hémostase, qu'elle soit congénitale ou acquise. Les antifibrinolytiques, la desmopressine, les traitements hormonaux ont une place importante dans le traitement des ménométrorragies. Ces médicaments sont également utilisés dans certaines chirurgies très hémorragiques, en complément de l'hémostase chirurgicale afin de contrôler les pertes sanguines et de limiter les transfusions (**Lillo-Le Louët, 2006**). Parmi eux certains produits sont issus ou dérivés de substances naturelles, généralement d'origine végétale « Alginate : Algostéril® ; Cellulose oxydée régénérée : Surgicel 1®, Surgicel 2®, Surgicel fibrillaire® ; Amidon modifié : Hémostase MPH® » (**HAS, 2011**).

III.5. Activité anti inflammatoire

III.5.1 La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est un processus physiologique de défense de l'organisme à toute agression ou lésion tissulaire quelle que soit sa cause (infectieuse, physique, chimique ou ischémique). La réponse inflammatoire permet d'éliminer ou d'isoler l'agent agresseur (bactérie, virus, parasite, tissu lésé) du reste de l'organisme. Cette réaction de défense est biphasique :

- Une première phase, agressive, a pour but de mettre en jeu les facteurs humoraux et les acteurs cellulaires de système immunitaire à l'origine de la dégradation des agents pathogènes (tableau 2) ; elle permet aussi une réaction de défense antihémorragique d'origine plaquettaire au niveau capillaires ;
- Une deuxième phase, réparatrice, va permettre la réparation tissulaire par un processus de cicatrisation et une néoangiogenèse des tissus cicatriciels (**Bouhassira, 2009**).

Tableau 2 : Cellules et médiateurs de l'inflammation

Cellules de l'inflammation	Médiateurs humoraux de l'inflammation
<u>Cellules sanguines circulantes</u> Basophiles Lymphocytes Monocytes Plaquettes Polynucléaires éosinophiles Polynucléaires neutrophiles	<u>Systèmes d'activation plasmatique</u> Coagulation, fibrinoformation Complément Fibrinolyse Système contact
<u>Cellules résidentes tissulaires</u> Cellules endothéliales Fibroblastes Macrophages, histocytes, cellules apparentées Mastocytes Plasmocytes	<u>Médiateurs cellulaires</u> Amines vasoactives (histamine, sérotonine) Cytokines Eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes) Neuromédiateurs Molécules d'adhésion Platelet activating factor Protéases de destruction tissulaire Radicaux libres

(Blétry, 2006).

La réaction inflammatoire comprend quatre phases : une phase vasculo-exsudative qui correspond à une congestion active des vaisseaux associée à une exsudation inflammatoire formant un œdème, et la migration au lieu de l'inflammation de leucocytes pour constituer la phase du granulome inflammatoire. Cette dernière est ensuite suivie d'une phase de détersion qui comporte l'élimination des tissus nécrotiques, des germes, des corps étrangers éventuels et du liquide d'œdème. On distingue : – la détersion interne assurée par l'action des macrophages ; – la détersion externe qui peut être naturelle (fistulisation à la peau d'un abcès des parties molles) ou artificielle (drainage chirurgical d'un abcès). Enfin, la phase de cicatrisation qui se manifeste par la formation d'un bourgeon charnu qui évoluera vers une fibrose cicatricielle. Les cellules inflammatoires diminuent tandis que les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales se divisent et repeuplent ce tissu inflammatoire (Zeghal, 2013). En absence d'une résolution, s'installe une inflammation chronique.

III.5.2 L'inflammation aigue

L'étape initiale de la phase cellulaire consiste en une marginalisation des cellules de la circulation sanguine. Elle peut se développer en quelques minutes ou plusieurs heures selon le type et la sévérité de la lésion tissulaire et persiste quelques heures voir quelques jours. Les neutrophiles marginés, vont traverser la paroi grâce à l'effet chimiotactique de différentes molécules (Figure 5).

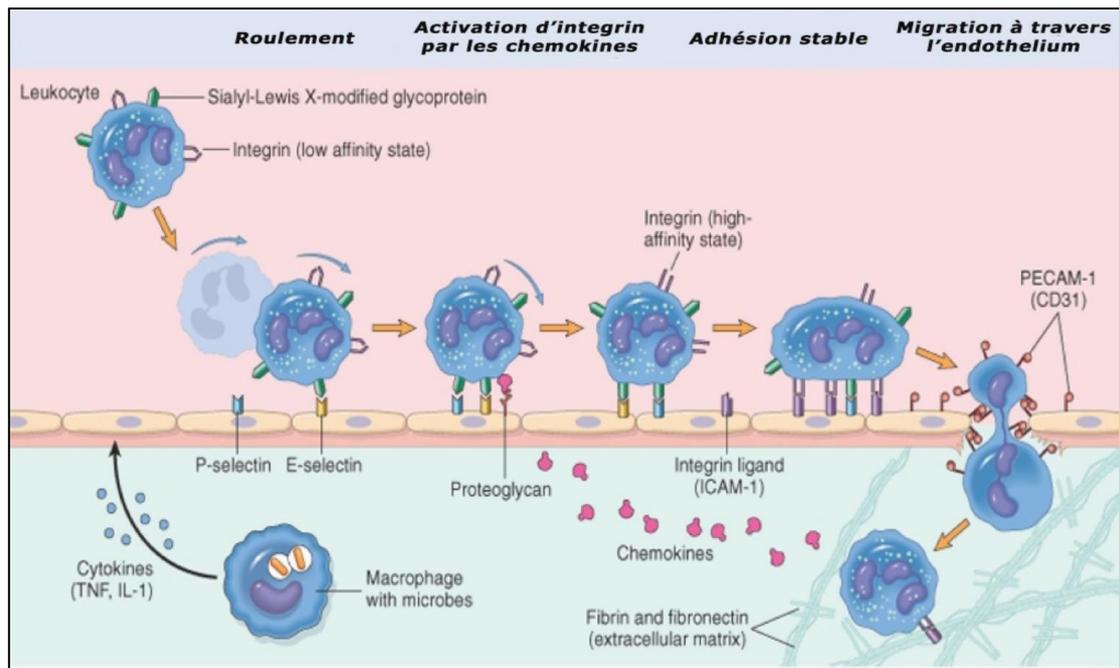


Figure 5 : Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins (**Kumar, 2007**).

La première étape implique la fixation réversible des leucocytes à l'endothélium vasculaire (**Weill, 2003**). La vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la migration et l'activation des neutrophiles sont des phénomènes étroitement interdépendants dont l'association est nécessaire à une réponse complète. Immédiatement au niveau de la plaie et à sa périphérie, on peut observer une courte phase de contraction des artérioles suivie par une phase de vasodilatation. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée. Simultanément, des pores se forment entre les cellules endothéliales des capillaires permettant la fuite d'un plasma riche en protéines vers le tissu. Les capillaires dilatés sont gorgés de globules rouges et le flux sanguin ralentit puis s'arrête. Cette activation leucocytaire provoque le contact des polynucléaires neutrophiles avec des cellules endothéliales. Les molécules d'adhésion qu'ils présentent à la surface de leurs membranes se fixent sur les récepteurs complémentaires des cellules endothéliales et les immobilisent. Les neutrophiles activés se fixent plus sur les cellules endothéliales. Pendant ce temps, à l'intérieur du tissu, les protéines d'origine plasmatique subissent diverses modifications. Le complément est au carrefour de l'inflammation médiée par les immunoglobulines qui se fixent sur tous les microorganismes pathogènes qu'elles immobilisent, formant des complexes immuns. Les monomères de fibrine se lient entre eux pour former des polymères de fibrine immobilisant tous les organismes pathogènes présents et fournissent un support aux neutrophiles pour leur déplacement. L'afflux liquidien dans le tissu provoque une accélération du débit de la lymphe

qui transporte les complexes immuns et le matériel antigénique vers les ganglions lymphatiques dans lesquels une réaction immunitaire spécifique apparaît en quelques jours ; les polynucléaires neutrophiles traversent la membrane basale de l'endothélium et se déplacent selon un gradient de concentration de facteur chimiotactiques. Lorsqu'ils arrivent sur le site de la lésion, les neutrophiles activés phagocytent les débris de tissu nécrotique et tous les organismes pathogènes. L'activation des neutrophiles augmente leurs capacités de phagocytose. L'ensemble de ce processus est régulé par une multitude de médiateurs chimiques provenant du tissu lésé, des protéines plasmatiques et des leucocytes (Stevens, 2004).

III.5.3 L'inflammation chronique

L'inflammation chronique est variable suivant qu'elle succède à une phase d'inflammation aiguë ou, qu'elle est d'emblée chronique. L'inflammation chronique survient lorsque l'agent déclenchant persiste longtemps (Sherwood, 2015). A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phénomènes vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas dans le temps mais coexistent et s'associent très tôt dans l'évolution des phénomènes de destruction tissulaire par l'intervention des cellules de l'inflammation et de leurs produits et de réparation, en particulier la fibrose (Russo-Marie, 1998). Les cellules mononucléées et particulièrement les macrophages sont au premier plan de l'inflammation chronique, alors que dans l'inflammation aiguë, un rôle central est dévolu aux polynucléaires neutrophiles. Après multiplication et différenciation les macrophages d'origine médullaire par et afflux vers le foyer inflammatoire à travers la paroi des microvaisseaux. Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle dans les phénomènes de destruction tissulaire, et les polynucléaire éosinophiles dans la réaction d'hypersensibilité de type I. La présence de lymphocytes T et des plasmocytes dans les inflammations chroniques d'essence immunitaire, traduit la mise en place de la réponse immunitaire tardive. Avec le temps se constitue un infiltrat mixte lympho-macrophagique. Le remodelage précoce du tissu conjonctif aboutit à sa destruction et à son remplacement par un tissu fibro-inflammatoire riche en collagène. Ces phénomènes sont sous la dépendance des phagocytes et des fibroblastes. Une phase de réparation succède à la destruction tissulaire, les fibroblastes et les cellules endothéliales produisent un tissu cicatriciel monomorphe, fibreux dont la production nécessite l'intervention coordonnée de multitude de cellules spécialisées (Weill, 2003).

III.5.4 Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des molécules aux propriétés pharmacologiques diverses, la principale étant, comme leur nom l'indique, leur capacité antinflammatoire puissante, on distingue les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anti-inflammatoires stéroïdiens.

III.5.4.1 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le contexte de la prescription médicale ou de l'automédication. Leurs propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques sont connues depuis la fin du siècle dernier et expliquent leur large utilisation à visée symptomatique. Les AINS inhibent la biosynthèse des prostaglandines. Elles sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique- lui-même issu des phospholipides membranaires grâce à la cyclooxygénase (COX), dont on distingue essentiellement deux iso-enzymes, COX1 et COX2. La première, constitutive, catalyse la formation de PG impliquées dans l'homéostasie ; la seconde, essentiellement inductible, conduit à la libération de PG qui interviennent dans divers processus physiologiques et pathologiques (**Pillon, 2014 ; Blain, 2000, Bouhassira, 2009**).

III.5.4.1.1 Classification des anti-inflammatoires non stéroïdiens

Différentes classifications des AINS sont possibles, basées soit sur la structure des AINS, soit sur leur puissance, soit encore sur leurs modalités d'action, soit selon le suivi de pharmacovigilance, et/ou leur sélectivité anti-COX.

Les classifications fondées sur la structure n'ont qu'un intérêt relatif pour la pratique, et plusieurs grands groupes sont décrits : les oxicams (piroxicam), les pyrazolés, les dérivés de l'acide carboxylique, qui comprennent les salicylés (aspirine), les propioniques (ibuprofène, kétoprofène, naproxène, flurbiprofène, etc.), les anthraniliques (acide niflumique, etc.) et les dérivés de l'acide acétique, qui regroupent les pyrrolacétiques (kétorolac, etc.), les indolacétiques (indométacine) et les phénylacétiques (diclofénac, etc.).

La classification fondée sur la sélectivité des AINS vis-à-vis des iso-enzymes de la COX est la mieux adaptée. En effet, les différences de structure ne permettent pas de comprendre les différences pharmacodynamiques entre les inhibiteurs COX-2 et les anti-COX-2/anti-COX-1 des principaux AINS utilisés ou prochainement utilisables (**Cuvillon, 2002**). Le tableau 3 propose une classification schématique des AINS fondées sur leur activité anti-COX-2.

Tableau 3 : Classification des principaux AINS en fonction de leur sélectivité d'action anti-COX.

Groupes	AINS
Inhibiteurs sélectifs de COX-1	Aspirine à faible posologie
Inhibiteurs non sélectifs des COX	Majorité des « AINS classiques
Inhibiteurs préférentiels de COX-2	Méloxicam, nimésulide, nabumétone
Inhibiteurs sélectifs de COX-2	Coxibs.

(Tréchet, 2014)

III. 5.4.1.2 Principaux AINS commercialisés

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ne forment pas une famille homogène mais sont regroupés par familles chimiques : dérivés salicylés, pyrazoliques, anthraniliques, propioniques, etc (tableau 4). Il n'ya pas d'efficacité supérieur d'un AINS par rapport à un autre mais il existe des habitudes d'utilisation thérapeutiques, de la part du prescripteur ou du patient (Stora, 2013).

Tableau 4 : Principales spécialités des AINS.

Famille chimique	Dénomination Internationale	Dénomination commerciale
Salicylés	Acide acétylsalicylique	Aspirine
Arypropioniques	Ibuprofène	Nurofen
	Diclofenac	Voltaire
Coxibs	Célécoxib	Celebrex
Oxicams	Piroxicam	Feldene
Divers	Acide niflumique	Nifluril
	Indométacine	Indocid

(Stora, 2013)

III.5.4.2 Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les corticoïdes représentent une classe thérapeutique essentielle, introduite puis généralisée à toutes les spécialités médicales dans la seconde moitié du xxe siècle. Ce sont des dérivés synthétiques du cortisol, principale hormone glucocorticoïde sécrétée par la surrénale. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et immunosuppressives (Hallouët, 2009 ; Béchade, 2004).

L'action anti-inflammatoire des corticoïdes résulte de différents mécanismes, notamment l'inhibition de certaines fonctions leucocytaires, macrophagiques en particulier, impliquées dans la réaction inflammatoire. Ils agissent également sur les cellules endothéliales en inhibant certaines de leurs fonctions, notamment en diminuant la perméabilité capillaire et donc l'arrivée et le passage des leucocytes aux sites inflammatoires. Les corticoïdes possèdent ainsi une action anti-inflammatoire systémique et tissulaire en agissant sur les trois étapes de l'inflammation vasodilatation et hyperperméabilité vasculaire ; chimiotactisme des leucocytes et phagocytose ; prolifération fibroblastique et synthèse de collagène et de mucopolysaccharides (**Pagnoux, 2010**).

III. 5.4.2.2 Principaux AIS commercialisés

Le tableau 5 reprend les différents anti-inflammatoires stéroïdiens actuellement commercialisés. Les glucocorticoïdes sont administrés par voie orale ou parentérale et aussi par voie inhalée cutané, oculaire et nasale. Les glucocorticoïdes sont toujours classés en fonction de leurs caractéristiques en prenant pour référence le cortisol à qui a été attribué un effet anti-inflammatoire et minéralocorticoïde de niveau 1 (**Trduyer, 2000**).

Tableau 5 : Principales spécialités des AIS.

Nom commercial	Dénomination commune internationale (DCI)
Célestène®	Bétaméthasone
Cortancyl®	Prednisone
Cortisone®	Cortisone
Dectancyl®	Dexaméthasone acétate
Diprostene®	Bétaméthasone
Hydrocortisone®	Hydrocortisone
Solupred®	Prednisolone

(**Mondenard, 2002**)

III.6. Activité cicatrisante

III.6.1. Rappels anatomophysiologiques de la peau

La peau est une barrière entre le milieu extérieur et intérieur de l'organisme, elle protège l'organisme des agressions extérieures, permet la régulation des échanges thermiques, et constitue un réservoir de graisse avec des métabolismes propres (Vitamine D, élimination ou absorption de substances diverses). Elle est aussi un organe immunologique, cible de manifestations allergiques et inflammatoires (**Guillet, 1998**).

III.6.1.1. Structure de la peau

Sur un plan structural, la peau est constituée de trois tissus superposés : le tissu le plus externe est l'épiderme, le tissu intermédiaire est le derme et le tissu le plus profond est l'hypoderme (Mélissopoulos and Levacher, 1998) (figure 6).

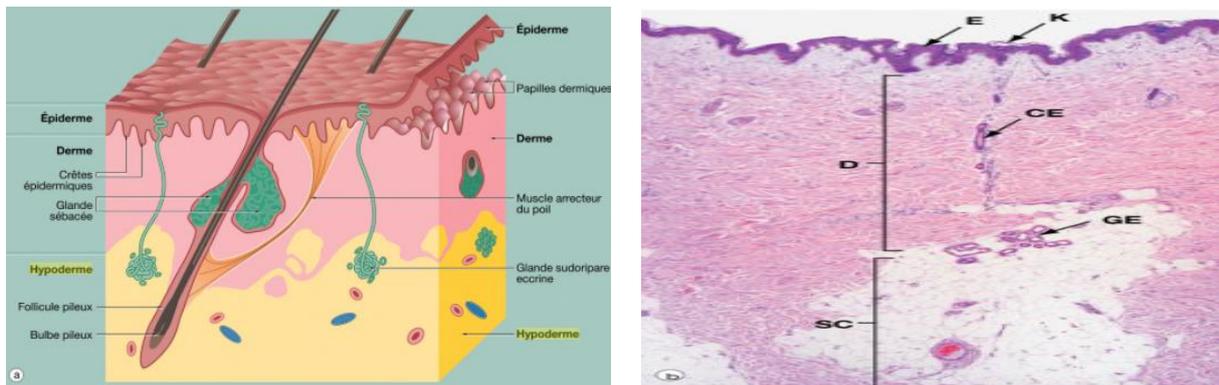


Figure 6 : Architecture générale de la peau (a) Représentation schématique (b) HE X 15 (Wheater, 2015)

(E) La couche superficielle et l'épiderme ; (K) la kératine ; (D) Le derme disposées horizontalement ; (SC) la couche la plus profonde le tissu sous cutané ; (GE) annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées, glandes eccrines et leurs canaux (CE)

- L'épiderme

L'épiderme est un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux, orthokératosique, non vascularisé mais innervé. Formé de plusieurs populations cellulaires : les kératinocytes représentent 80 % de l'ensemble de ses cellules, d'origine ectoblastique. Ce sont eux qui en migrant, donnent à l'épiderme ses caractéristiques morphologiques : stratification en plusieurs couches et cellules superficielles pavimenteuses et anuclées. Les 20 % de cellules des autres types sont dispersés entre les kératinocytes. Ce sont les mélanocytes, provenant des crêtes neurales, les cellules de Langerhans, issues de la moelle hématopoïétique, et les cellules de Merkel, dérivant des cellules souches de l'épiderme embryonnaire (Squarcioni, 2006).

- Le derme

Le derme nourrit et supporte l'épiderme, constitué de fibres de collagène comme support structural. Il comprend deux régions : le derme superficiel se compose de tissu conjonctif aréolaire contenant des vaisseaux sanguins, des nerfs, des follicules pileux, les papilles du derme et les corpuscules tactiles capsulés ; le derme profonde se compose de tissu conjonctif

dense irrégulier contenant du tissu adipeux, les follicules pileux, des nerfs, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (**Tortora, 2017**).

- L'hypoderme ou tissu adipeux

L'hypoderme ou tissu sous-cutané est constitué de tissu adipeux compartimenté par des septa fibreux qui fixent le derme réticulaire aux fascias profonds (**Guillet, 1998**). Il est constitué de cellules adipeuses, ou adipocytes, séparées par une mince couche de matrice extracellulaire comprenant des fibres de collagène et de nombreux vaisseaux (**Bastard, 2013**).

- Les annexes

Les annexes cutanées sont d'origine ectoblastique. Ils regroupent les glandes cutanées et les phanères. Les glandes cutanées comprennent les glandes sudoripares eccrines, les glandes sudoripares apocrines et les glandes sébacées. Les phanères cutanés comportent les poils et les ongles. En règle générale, les glandes sébacées sont annexées aux poils constituant ainsi le follicule pilosébacé. Les glandes sudoripares apocrines sont annexées aux follicules pilosébacés avec un canal excréteur qui débouche dans le conduit pilosébacé en aval de la glande sébacée. Alors que les glandes sudoripares eccrines sont toujours indépendantes des poils. Par contre, les glandes sudoripares eccrines sont indépendantes des poils et s'ouvrent directement à la surface de la peau. Ainsi, la face superficielle de l'épiderme est criblée d'une multitude de petits orifices correspondants aux ostiums pilaires et aux pores sudoraux (**Dréno, 2009 ; Prost-Squarcioni, 2006**).

- Vascularisation cutanée

Tient compte de plusieurs nécessités fonctionnelles : la nutrition de la peau et de ses annexes, l'augmentation du flux sanguin. L'augmentation du flux sanguin facilite la déperdition calorifique en cas de chaleur, la vasoconstriction pour les diminuer lorsqu'il fait froid. Les artères nourricières sont situées dans l'hypoderme, où elle donne naissance à des ramifications qui remontent et forme deux plexus vasculaires. Le plus profond appelé plexus cutané et le superficiel appelé plexus sous-papillaire (**Wheater, 2015**).

III.6.2. Physiologie de la cicatrisation cutanée

La cicatrisation est un phénomène complexe et prolongé qui a pour but de réparer une plaie. La peau est un modèle d'étude de la cicatrisation. Mais les mécanismes physiopathologiques sont les mêmes pour les autres tissus, quelques variantes liées au tissu concerné mises à part. La

cicatrisation peut être plus ou moins « réussie », en fonction de la cause du traumatisme, de l'état nutritionnel et de maladies acquises ou génétiques. De tous temps, l'humanité a cherché comment obtenir la meilleure cicatrisation (**Dubrana, 2011**). Les études chez l'animal, *in vivo* et *in vitro*, ont montré que le processus de cicatrisation se faisait en trois phases consécutives dans le temps : une phase initiale, que l'on peut qualifier d'inflammatoire, une seconde phase de cicatrisation, dite de remodelage, puis une troisième phase, tardive, de renforcement de la cicatrice (**Scepi, 2013**).

III.6.2.1 Phase initiale

Immédiatement après la lésion, un processus inflammatoire avec activation des cellules de l'inflammation, sécrétion de protéases et de radicaux libres oxygénés qui vont dégrader les macromolécules de la matrice extracellulaire. Elle est caractérisée par la formation d'un caillot de fibrine, qui forme une matrice extracellulaire provisoire, rapidement envahie par des cellules inflammatoires. Le caillot, bien que constitué de 95 % de fibrine, comporte également des composants qui vont jouer un rôle important dans les étapes ultérieures.

Il s'agit essentiellement de protéines plasmatiques. Le caillot de fibrine contient également des facteurs de croissance d'origine plasmatique ou plaquettaire, tous facteurs polypeptidiques favorisant la migration et la prolifération des cellules nécessaires au processus de réparation tissulaire. La lyse progressive du caillot de fibrine par les polynucléaires neutrophiles puis les macrophages, aboutit à son élimination finale et libère des fibrinopeptides qui possèdent par eux-mêmes de nombreuses activités biologiques.

Ainsi, les fibrinopeptides libérés par la plasmine sont capables d'amplifier la réaction inflammatoire par leurs effets chimiotactiques sur les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages. Les produits de dégradation de la fibrine sont également capables de stimuler la production de matrice extracellulaire, la prolifération des fibroblastes et la revascularisation des tissus lésés, ce qui contribue à initier la phase de réparation tissulaire. Des facteurs de croissance sont libérés et la croissance du tissu conjonctif de granulation repousse le caillot fibrineux vers la surface faisant apparaître le bourgeon épidermique sur les bergers. Le tissu de granulation constitué de néovaisseaux, de fibroblastes et de myofibroblastes permet la synthèse du collagène et la matrice extracellulaire se réorganise (**Chavoïn, 2011 ; Clark, 1982 ; Reinkes, 2011**).

III.6.2.1 Phase de remodelage

Elle consiste en la formation, le développement et l'orientation dans le sens de la traction de fibres de collagène. De façon concomitante à ces deux phases, une prolifération vasculaire extrinsèque et intrinsèque (berges de la lésion), se développe. Cette phase « vasculaire », parallèle, dure environ 4 à 6 semaines. La contraction de la plaie est achevée vers le 21^e jour. Le contenu en collagène est maximal à cette date, mais la résistance de la cicatrice à l'étirement n'atteint qu'environ 15 % de celle de la peau normale. Le remodelage va accroître la résistance à la cicatrice, jusqu'à 80 à 90 % de sa force finale vers la sixième semaine d'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 et une reconstitution d'une matrice extracellulaire désorganisée (Scepi, 2013 ; Revuz, 2009 ; Maquart, 2015).

III.6.2.3 Phase de renforcement

Elle correspond à une prolifération et à un renforcement des fibres de collagène. L'organisation de ces fibres se poursuit et progressivement la récupération de leurs propriétés biomécaniques se réalise (Scepi, 2013).

III.6.3 Facteurs influençant la cicatrisation

La cicatrisation résulte d'une cascade de processus physiologiques dont l'objectif est d'aboutir à une restitution de l'intégrité cutanée. Plusieurs facteurs locaux ou généraux peuvent entraver le déroulement normal des différentes phases de la cicatrisation. Les causes de ces retards de cicatrisation sont multiples et souvent intriquées (Tableau 6). Celle-ci dépend non seulement du type de traumatisme et de sa prise en charge, mais également de facteurs intrinsèques de chaque individu, tel l'éthnie, l'âge, le mode de vie, les comorbidités et d'autres facteurs qui demeurent encore inconnus (Chaput, 2012).

Tableau 6 : Circonstances favorisant le retard de cicatrisation.

	Causes nutritionnelles	Causes protéiques, vitaminiques, en zinc...
Causes générales	Causes vasculaires Causes endocriniennes Maladies du tissu conjonctif Troubles de la coagulation Hémopathies Causes iatrogènes Divers	Insuffisance artérielle, veineuse, Diabète, hypercorticisme Syndrome d'Ehler, Danlos, déficit en prolidase Thrombopathies, déficit en prolidase Syndromes myéloprolifératifs, anémies hémolytiques héréditaires (drépanocytose...) Corticoïdes, radiothérapie, chimiothérapie. Déficits immunitaires, insuffisance cardiaque, vieillissement, tabac.
Causes regionales	Infection Hématome Neuropathies Erreurs de traitement local Présence de débris fébrineux, necroptiques	

(Cano, 2006)

III.6.4 Traitements topiques des cicatrices

L'apparence des cicatrices installées ne peuvent être atténuée que par la chirurgie. Cependant, on peut accélérer et améliorer l'apparence des futures cicatrices par des topiques réparatrices. Lorsqu'elles sont appliquées dès le premier jour, sur une plaie propre, elles peuvent avoir un effet apaisant et réparateur. Les cicatrices seront ainsi plus belles et moins prononcées. Deux facteurs principaux établissent l'efficacité des médicaments topiques : le principe actif lui-même, il doit être administré à une concentration adéquate et appliqué sur la peau dans une préparation appropriée et l'excipient pour sa contribution dans la diffusion du médicament (Habif, 2012).

III.6.4.1 Application topique d'antibiotiques et d'antiseptiques

Les antibiotiques topiques protègent la plaie de l'infection en favorisant la cicatrisation normale. Cependant, ils n'ont aucun effet sur les tissus morts, les hématomes ou les enzymes protéolytiques. Les antibiotiques doivent être présent en quantité suffisante au moment de l'invasion bactérienne pour éliminer les germes pathogènes. Le choix de l'antibiotique administré par voie topique doit être adapté selon son spectre d'activité, sa posologie, sa pharmacocinétique, sa toxicité tissulaire et sa forme pharmaceutique (lavage, pommade, crème ou poudre) (Doughty, 2005 ; Krahwinkel, 2006 ; Johnston, 1990 ; Kirpensteijn,

2015). L'antibiothérapie est indiquée sur les plaies anciennes de plus de 4 heures. Par rapport aux antibiotiques, les antiseptiques, comme les composés à base d'iode, la chlorhexidine ou les solutions d'hydrochlorite ont comme principal avantage d'avoir un spectre d'activité plus large et moins de problèmes d'antibiorésistance. L'application des antiseptiques doit se faire sur la peau non lésée pour éviter une inflammation tissulaire qui diminue la résistance à l'infection. Chez l'homme les antiseptiques sont toxiques pour les kératinocytes et les fibroblastes (Kirpensteijn, 2015)

III.6.4.1 Glycérol / glycérine

En médecine humaine, la glycérine a été utilisée dans le traitement des oedèmes cérébraux, dans les sirops pour la toux ainsi, qu'en tant que laxatif. Ses effets bénéfiques sur la peau sont connus depuis longtemps. Elle améliore l'hydratation du *stratum corneum* et accélère les processus de cicatrisation. La glycérine présente également un léger effet antibactérien.

III.6.4.2 Oligoéléments et vitamines (liste non exhaustive)

Les oligo-éléments sont impliqués dans de nombreux processus biologiques intervenant dans la cicatrisation.

- La croissance, les divisions cellulaires et la cicatrisation de plaies sont directement dépendantes du zinc. Depuis les années 1960, des études ont été entreprises pour démontrer l'effet du zinc sur la cicatrisation. Toutefois, en application locale la concentration de zinc dans la plaie est élevée et cette administration topique de zinc provoque un «autodébridement» avec un effet anti-infectieux tout en favorisant la granulation et l'épithélialisation (Lansdown, 2007 ; Imoberdorfa, 2010).

- Les sels de cuivre sous forme de sulfates sont à la base d'un antiseptique très ancien, et coagulent les protéines. Le coagulat constitue une barrière limitant la colonisation bactérienne.

- La vitamine A et les huiles de poisson qui en contiennent. Les kératinocytes la transforment en rétinol puis en acide rétinoïque. Les rétinoïdes augmentent la production par les fibroblastes, du collagène et de la fibronectine (Martini, 2011).

III.6.4.3 Le miel

Par la combinaison de ses trois propriétés physiques. Très forte concentration en glucose et lévulose (effet osmotique), un pH d'acide faible établi entre 3,2 et 5,4, une faible teneur en eau et la présence de 4 ingrédients actifs majeurs, le miel possède trois propriétés pharmacologiques démontrées : antimicrobienne, cicatrisante et anti inflammatoire, conduisant à des indications thérapeutiques aujourd'hui objectivées par de nombreuses études cliniques à travers le monde dans la cicatrisation quel que soit l'origine: plaies post opératoires, brûlures, ulcères et escarres (**Lechaux,2017**).

III.6.4.4 Plantes à activité cicatrisantes

Nous citerons à titre d'exemples :

- L'hydrocotyle ou *Centella asiatica* (Madecassol®) d'une efficacité reconnue et actuellement parmi les plus actifs pour l'amélioration et la prévention des vergetures (**Martini, 2011**).
- Consoude (*Symphiticum officinalis*) borraginacées. Son usage externe, sous forme de cataplasme, accélère la cicatrisation. Elle n'existe pas pour usage externe, la plante n'est représentée que sous forme de teinture mère (**Chaumont,2011**).
- Le souci (*Calendula officinalis* Astéracées renferme une huile essentielle (alpha-cadinol, ionones), connu pour ces propriétés cicatrisantes antinflammatoires et antibactériennes (**Chaumont,2011**).
- *Aloe Vera* ou *Aloe Barbadosis Miller* est une plante verte de la famille des Liliacées à feuilles charnues évoquant un cactus, originaire d'Afrique du Sud. Cette plante est indiquée pour le traitement et la guérison d'un grand nombre de pathologies cutanées traumatiques (blessures, brûlures, irritations, etc.) ou non traumatiques (les dermatoses en général) et entre ainsi dans la composition de nombreuses pommades, crèmes et lotions vendues en pharmacies et dans les grandes surfaces (**Geagea, 2014**).
- *Artemisia herba alba* Asso (Armoise blanche ; Chih) En usage externe, la poudre d'armoise blanche est employée en cataplasme comme cicatrisant des brûlures et des plaies (**Salhi, 2010**).
- *Lawsonia inermis L.* (Henné ; Henna) Les feuilles sous forme de pâte sont utilisées en application locale pour la teinture et le traitement des cheveux. Elle se caractérise par ses multiples usages contre l'eczéma, mycoses, ses propriétés astringente, antiseptique, cicatrisante des plaies et des blessures (**Hseini, 2007**).
- *Le thym* (*Thymus vulgaris*) est l'une des plantes les plus utilisées comme condiment et

extraits à fort pouvoir antibactérien et anti inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle. En effet, le thym est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en usage externe comme cicatrisant et antiseptique **(EL Ouali Lalami, 2013)**.

- *Ormenis mixta* (L.) Dumort. hellâla (Arabe), camomille du Gharb (Français). La décoction des capitules est employée contre la fièvre et les douleurs abdominales. Les capitules sont frottés sur les boutons pour les assécher et sur les petites blessures pour les cicatriser **(Bellakhdar, 1997)**.

DEUXIÈME PARTIE
PARTIE EXPERIMENTALE

I- Problématique & objectifs

Une enquête prospective préliminaire quantitative effectuée dans le but de dresser un inventaire des plantes médicinales utilisées en pharmacopée traditionnelle a permis de sélectionner, une espèce végétale très peu étudiée mais jouissant de nombreux emplois traditionnels, il s'agit de *Centaurea africana* appartenant à la famille des Asteraceae.

Le genre *Centaurea* est répandu non seulement sur le territoire Algérien mais également en Europe, dans le bassin méditerranéen, à l'ouest de l'Asie et au continent Américain. Seulement, l'espèce *Centaurea africana* est endémique en Algérie et en Tunisie, d'où le terme Africana (Quezel et al, 1963).

Les études phytochimiques effectuées sur les espèces du genre *Centaurea* ont révélé leurs richesses en métabolites secondaires tels que les lactones sesquiterpéniques (Gonzalez et al, 1984 ; Medjroubi et al, 1997), les stéroïdes (stérols) (Picher et al, 1984 ; Flamini et al, 2002), les composés phénoliques de type flavonique et à degré moins les alcaloïdes (Ahmed et al, 1970).

L'espèce *Centaurea africana* localement connu sous le nom de « Amarsgous » a fait l'objet de peu d'investigations tant sur le plan phytochimique, pharmacognosique que pharmacotoxicologique. Bien que les racines de cette plante, sont très utilisées en thérapie traditionnelle pour le traitement et la prise en charge d'un large éventail de types de plaies.

Afin de contribuer à sa valorisation en Algérie et de confirmer ou infirmer son usage traditionnel, La démarche poursuivie dans la réalisation de cette thèse a eu pour objectif :

l'extraction et l'analyse qualitative et quantitative de différents composés chimiques susceptibles d'avoir une activité pharmacologique suivie par l'évaluation des propriétés potentiellement intéressantes dans le processus de la cicatrisation et le traitement des plaies (antioxydante, antibactérienne, hémostatique et antiulcéreuse) de trois extraits (méthanolique, acetonique et aqueux) de la racine de *centaurea africana*. Parmi ces extraits, nous sommes plus particulièrement intéressés au plus actif (l'extrait méthanolique) pour assigner notre deuxième objectif portant sur la formulation d'une pommade à la concentration de 5 et 10% et l'évaluation de ses propriétés cicatrisante et antinflammatoire ainsi que son innocuité *in vivo* chez le rat.

II-Matériels & Méthodes

Ii-1: Enquete ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique avait pour objectif de valoriser et répertorier certaines connaissances ancestrales des plantes médicinales, qui sont transmises par tradition orale de génération en génération et de sélectionner une plante réputée pour ses multiples usages (cicatrisante, traitement des brûlures et pathologie de la peau) et entreprendre une étude scientifique originale et approfondie de ses activités pharmacologiques et toxicologiques.

La présente enquête ethnobotanique a été réalisée dans trente villages de la région de Tizi-Ouzou. Cette région a été choisie en raison des connaissances des villageois en matière de plantes médicinales et de leurs utilisations traditionnelles. De plus, cette région se situe dans des zones montagneuses caractérisées par une diversité floristique importante et des conditions bio-climatiques particulières.

II.1.1 Présentation de la région d'étude

La wilaya de Tizi-Ouzou se situe à une centaine de kilomètres d'Alger. Elle s'étend sur une superficie de 2957.93 km², dominée par des ensembles montagneux faisant partie de l'atlas tellien, un potentiel agricole cultivable très faible (32%), et une ouverture sur la mer méditerranée (70 kms de côte).

Elle est délimitée au Nord par la Mer Méditerranée, à l'Est et au Sud par la chaîne du Djurdjura et à l'Ouest par Oued Isser et son affluent Oued Djemââ (**Figure 7**). Son relief est très accidenté, constitué essentiellement de montagnes qui couvrent la majeure partie du territoire soit depuis le littoral jusqu'au sommet du Djurdjura, avec quelques vallées et dépressions qui la découpent en zones bien distinctes (**Direction de l'Urbanisme de Tizi - Ouzou, 2011**).

La population de la wilaya de Tizi Ouzou est estimée à 1.270.000 habitants au 31/12/2006 dont 70 % vivant en milieu rural (comportant plus de 1400 villages avec une densité moyenne de 429 hab/km²) répartie en 21 Dairas et 67 communes.

Les activités des habitants de la région de Tizi Ouzou s'orientent vers les commerces de proximité, l'artisanat, l'arboriculture (olivier et figuier), les cultures maraîchères qui constituent une source précieuse de revenus ainsi que l'élevage (bovin, ovin, caprin et apicole) surtout dans les zones rurales. La gestion de ces animaux est intéressante d'un point de vue ethno-vétérinaire. L'activité industrielle n'est pas si élevée.

La physionomie de la végétation est dominée par les formations forestières dont la plus commune est le maquis où prédominent de vastes étendues d'oliveraies centenaires, du chêne vert et du chêne liège ainsi que d'autres arbustes, tels que l'arbousier, la bruyère, le myrte, le laurier, le lentisque, etc. On trouve également le cèdre de l'Atlas en haute altitude, au niveau de Tala Guilef (Parc National du Djurdjura) (ethnotizi).

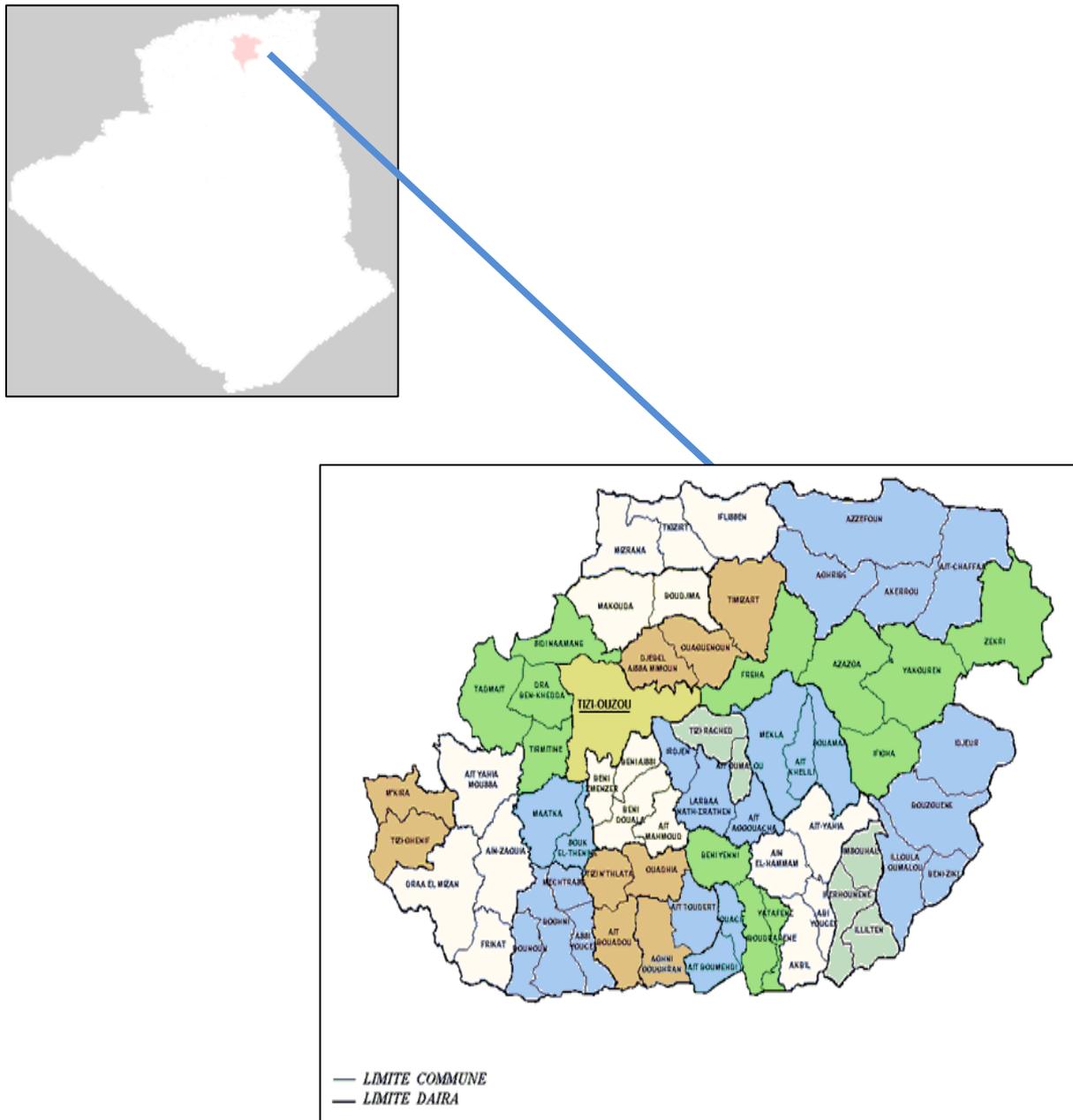


Figure 7 : Situation géographique de la wilaya de Tizi-Ouzou (**Direction de Planification et d'Aménagement de Territoire**).

II.1.1.1 Facteurs climatiques

Le climat de la région de Tizi-Ouzou est tempéré chaud de type méditerranéen qui présente deux grandes caractéristiques : d'Octobre -Novembre à Mars- Avril, les masses d'air arctique l'emportent généralement et déterminent une saison froide et humide. Les autres mois de l'année, les masses d'air tropical remontent et créent la chaleur et la sécheresse.

Le temps variable, fréquent sur la wilaya est créé par des fronts discontinus dus à la circulation zonale (d'Ouest en Est) de l'air. L'humidité dans la wilaya est due à des dépressions du front polaire qui balaient les montagnes et provoquent la pluie et la neige (Andi, 2009).

II.1.1.2 Les températures

Les températures moyennes minimales et maximales sont rapportées dans la **Figure 8**.

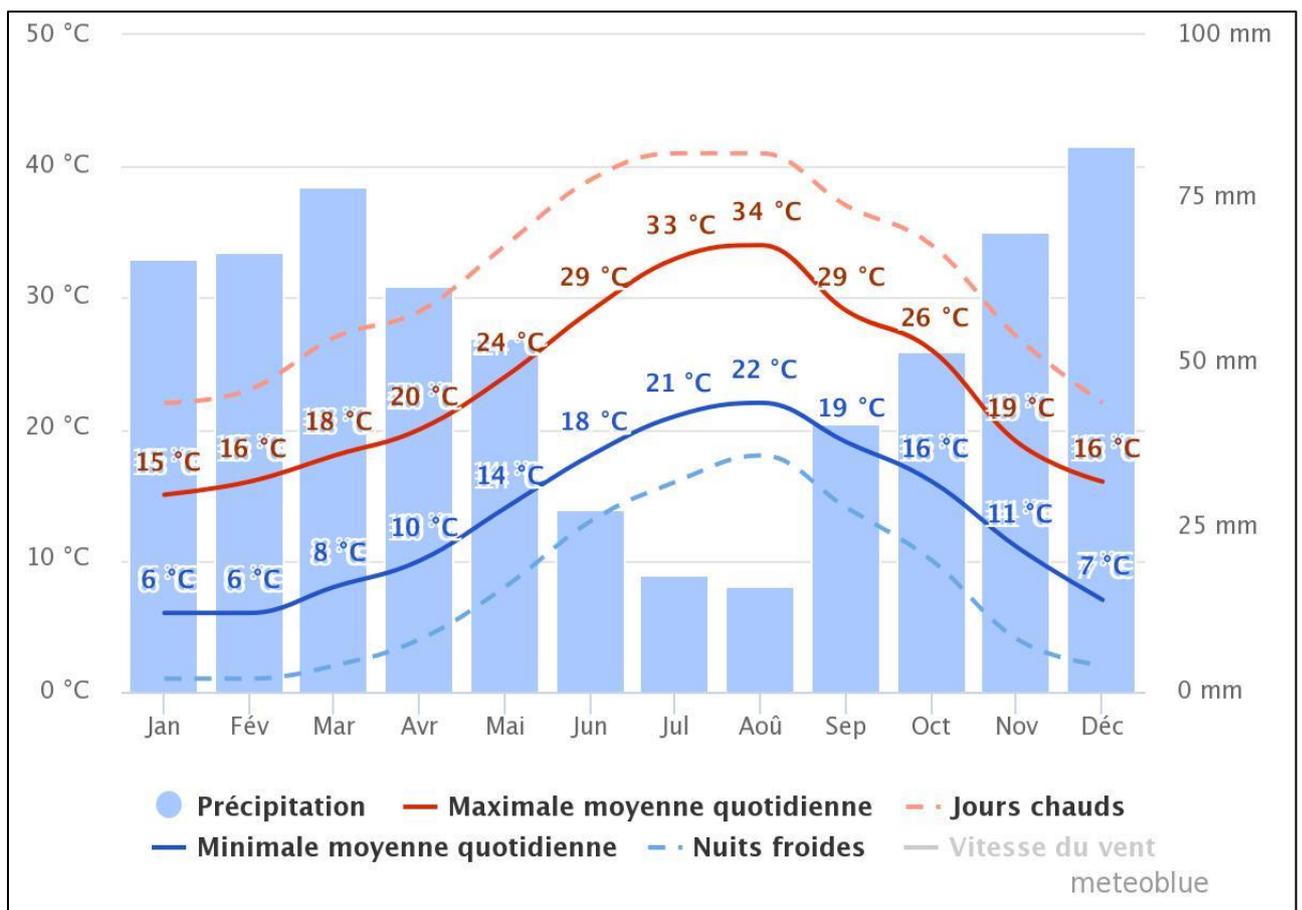


Figure 8 : Répartition des précipitations et températures moyenne quotidienne (Météo bleu).

II.1.2 Méthode d'étude

Une enquête préliminaire a été entreprise en premier lieu visant à établir la localisation des différentes zones d'enquêtes ainsi qu'un répertoire d'éleveurs détenteurs d'un savoir ancestral dans la pratique de la médecine traditionnelle et de la connaissance des plantes médicinales pour le traitement de leurs animaux.

Elle a aussi permis la récolte des échantillons d'espèces végétales médicinales afin de valider et/ou vérifier leurs noms locaux avec d'autres régions concernées par l'enquête.

Ensuite, nous avons mené des entretiens individuels à travers un questionnaire tel que décrit par **Dibond et al. (2011)** et **Klotoé et al. (2013)** et repris par **Chabi et al. (2014)**. Le questionnaire de l'enquête est divisé en deux parties:

- La première partie vise à recenser les remèdes à base de plante et les pratiques associées aux soins prodigués par les éleveurs à leurs animaux ;
- La deuxième partie a permis de collecter toutes les informations pertinentes relatives à *Centaurea africana* (plante plus souvent recommandée par cette population pour ses vertus cicatrisantes ...)

Les informations couvertes par le questionnaire décrit par Benkhniq et al. (2010) (*cf*, annexe) comprenaient :

- ✓ Nom, prénoms, âge, sexe, niveau d'instruction, village d'origine des éleveurs utilisant des méthodes indigènes de traitement des maladies ;
- ✓ Inventaire des plantes utilisées en médecine vétérinaire ;
- ✓ Identification des plantes et des maladies traitées ;
- ✓ Inventaire des maladies ou des syndromes prétendument traités par ces plantes ;
- ✓ Nom vernaculaire (nom commun), parties de plantes utilisées: écorce, racines, feuilles, tiges, sève, mélange de plusieurs parties ;
- ✓ Dose et formes d'utilisation: poudre, pâte, infusé, décocté, macérat...
- ✓ Utilisation à visée préventive, curative ou les deux ;
- ✓ Disponibilité et accessibilité de chaque plante citée dans la localité ;

Cette étude a duré plus de 3 ans (de 2012 à 2015) au cours desquelles 350 personnes ont été questionnées et trente-cinq villages riverains ont été prospectés dans certaines communes de la wilaya de Tizi- Ouzou (M'Kira, Tizi Gheniff, Dràa El-Mizan, Frekat, Ain Zaouia, Ait Yahia Moussa, Dràa Ben Khedda, Tadmait, Bounouh, Boghni, Mechetras, Ait Youcef, Mâatka, Souk El-Thnin, Tizi N'Thlata, Ait Bouadou, Oudhia, Ait Toudert, Ait Mahmoud,

Beni Douala, Ouacif, Iboudraren, Ain El-Hamam, Ifarhounene, Tigzirt, Boudjima, Iflissen, Timizart, Ouaguenoun, Freha, Aghribs, Azazga, Mekla, Ait Oumalou, Bouzeguene, Ait Yahia, Iloula Oumalou,).

L'identification systématique des échantillons de plantes désignées par leurs noms vernaculaires, a été faite sur la base de l'ouvrage « Nouvelle Flore de l'Algérie » de **Quézel & Santa (1962, 1963)** et à l'aide des herbiers disponibles et de catalogues de plantes.

Nous n'avons retenu que les espèces végétales recensées et déterminées sur le plan systématique, selon la « flore d'Algérie » de **Quézel & Santa (1962, 1963)**, lors de notre sondage ethnobotanique sur le terrain.

III. Matériel végétal, criblage phytochimique et extraction

III.1 Identification de la plante

Le matériel végétal était constitué de racines de *Centaurea africana Lamk var. africana* (**Bonnet**), récolté au mois de juin 2014 dans la région de Kabylie commune de Draa El Mizan, située à 42 km au Sud-Ouest de la wilaya de Tizi Ouzou et à 110 km au Sud-Est d'Alger. La plante a été identifiée par Dr Benmokhtar Botaniste au Laboratoire de Botanique du Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine (Université d'Alger). Parallèlement, un spécimen de cette plante a été authentifié par comparaison avec celui enregistré à l'Herbier de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger (ENSA). Ces racines ont été séchées à l'abri du soleil et à température ambiante, puis finement broyées et conservées dans des flacons stériles et hermétiquement fermés.

III.2 Extractions

La méthode d'extraction hydro-alcoolique employée a consisté en la macération de 50 g de poudre dans des mélanges de méthanol/eau (80 /20 V/V), acétone/eau (80 /20 V/V) sous agitation pendant 72 heures à température ambiante et à l'ombre, le mélange est filtré sur papier filtre, ensuite le filtrat est soumis à une évaporation sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur (**Heidolph Laborota 4000**) à 40°C pour éliminer le méthanol. L'extrait obtenu est lyophilisé (**Lyophilisateur benchtop K VirTis**) pendant 12 heures.

Pour l'extrait aqueux, cinquante grammes de poudre de racine de *Centaurea africana* ont été portés à ébullition pendant 30 minutes dans un volume de 500 ml d'eau distillée puis homogénéisés sous agitation magnétique pendant 24 heures à température ambiante. Le macérat a été ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre (**papier Whatman n°1**) puis évaporé

sous vide et séché jusqu'au poids constant du résidu. Les résidus secs obtenus ont été ensuite lyophilisés (**VirTis BenchTop K**). Les rendements de l'extraction de racine ont été calculés. Ces lyophilisats ont servi pour les tests phytochimiques, toxicologiques et pharmacologiques.

III.3 Analyse phytochimique

III.3.1 Analyse qualitative

Les métabolites secondaires existants dans les différents extraits de la poudre de racines de la plante étudiée ont été mis en évidence par divers tests phytochimiques basés sur des réactions de coloration et/ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques selon des techniques analytiques standard (**Trease, 2002; Karumi 2004 ; Bruneton, 2009**). Le réactif au chlorure de fer est employé pour l'identification des tannins. Un précipité bleu noir ou verdâtre indique la présence des tannins hydrolysables ou condensés. Le test de Keller-Killiani est utilisé pour la détection des glycosides cardiotoniques en se basant sur la formation d'un anneau brun à l'interface.

La méthode à la cyanidine permet de détecter les flavonoïdes, le réactif de dragendorff's est utilisé pour la détection des alcaloïdes, la méthode du papier imprégné de picrate de sodium pour déceler les glycosides cyanogènes et le test de Libermann Burchard pour la mise en évidence des stéroïdes et triterpènes.

III.3.2 Analyse quantitative

L'analyse quantitative des extraits de racine de *Centaurea africana*, nous permet d'avoir une estimation de la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les extraits. La concentration des phénols totaux a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al, 1965**), les flavonoïdes ont été quantifiés par la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al, 1996**) et les tanins par la méthode à la vanilline en milieu acide (**Price et al, 1978 ; Kanoun et al, 2014**).

III.3.2.1 Dosage des polyphénols

La teneur totale en polyphénols totaux des trois extraits (acétonique, méthanolique et aqueux) a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al, 1965**). Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans les différents extraits.

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit

lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption est maximale à 732 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Ghazi et Sahraoui, 2005 ; Boizot et Charpentier, 2006**). Une quantité de 100 µl de chaque extrait a été mélangé à 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (1/10 dilué), après 5 mn, 400 µl d'une solution saturée de Na₂CO₃ à 75 g/l ont été ajoutés, le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à une température ambiante pendant 15 minutes ; l'absorbance est mesurée à 732 nm contre un blanc sans extrait (**Wong et al, 2006**). Trois lectures ont été faites pour chaque concentration et les résultats ont été exprimés en mg équivalent acide gallique (mg GAE/100 mg d'extrait). La formule suivante a été utilisée pour le calcul de la teneur en composés phénoliques totaux de chaque extrait.

$$C = \frac{Ce \times D \times 10}{m} \times 100$$

C = mg équivalent acide gallique dans 100 mg d'extrait,

Ce = concentration de l'échantillon lue (mg/l),

D = dilution,

m = masse de l'échantillon (mg).

III.3.2.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes dans les différents extraits a été déterminée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al, 1996**). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 430 nm. 1 ml de chaque échantillon et du standard (dissous dans le méthanol) a été ajouté à 1 ml de chlorure d'aluminium solution (2% dans le méthanol) . Après incubation à l'obscurité et à la température ambiante pendant 10 minutes, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre ultraviolet à 430 nm contre un blanc d'eau distillée-methanol.

La teneur en flavonoïdes totaux de chaque extrait a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$) réalisée pour un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1, 2, 4, 8, 12, 15 et 20 µg/ml), établie dans les mêmes conditions et les mêmes étapes de dosage. Les résultats ont été exprimés en mg équivalents quercétine (mg QE) /100 mg d'extrait sec.

La formule suivante a été utilisée pour le calcul de la concentration en flavonoïdes en Equivalent Quercétine (**Miliauskas et al, 2004**).

$$C = \frac{C_e \times D \times 10}{m} \times 100$$

C = mg équivalent quercétine dans 100 mg,

C_e = concentration de l'échantillon lue (mg/L),

D = dilution,

m = masse de l'échantillon (mg).

III.3.2.3 Dosage des tanins

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (**Price et al, 1978 ; Kanoun et al, 2014**). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc par spectrophotométrie

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en utilisant la méthode de vanilline décrite par (**Julkunen-Titto, 1985**) en mg équivalent de catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g).

IV. Evaluation toxicologiques, activités biologiques et pharmacologiques

IV.1 Etude toxicologique

IV.1.1 Détermination de la toxicité aiguë

La première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier l'évaluation de la toxicité aiguë. Deux modes de traitement seront étudiés, l'un par contact et l'autre par ingestion des extraits de racine de la poudre de *Centaurea africana*.

IV.1.1 Expérimentation animale

L'étude a été réalisée sur des rats albinos Wistar fournis par l'Institut Pasteur d'Algérie, âgés d'environ trois mois, pesant (200 ± 20 g). Après une période d'adaptation de 10 jours, les animaux témoins et traités ont été isolés dans des cages avec eau et aliment donnés ad-libitum et soumis à des conditions expérimentales identiques de température ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), d'hygrométrie (55 à 60%) et de photopériode (12 heures).

IV.1.2 Toxicité aiguë cutanée (test limite)

Le test de la toxicité aiguë cutanée a été réalisé suivant le protocole établi par l'Organisation de la Coopération Economique et Développement (OCDE, 1987) No. 402. Les extraits méthanolique, acétonique et aqueux de racine de *Centaurea africana* ont été appliqués à une concentration unique maximale fixée à 2000 mg/kg de poids corporel sur la peau au niveau du dos des 10 rats (5 mâles et 5 femelles) préalablement rasés sur une surface supérieure ou égale à 10% de la surface corporelle totale de l'animal. Les rats ont été mis en observation pendant une période de 14 jours afin de déceler toute réaction cutanée éventuelle et la mortalité a été reportée quotidiennement.

IV.1.3 Toxicité aiguë orale (test limite)

Le test de toxicité aiguë des extraits a été réalisé selon la méthode décrite par les guidelines No. 423 (OCDE, 2000). Les extraits ont été administrés par voie orale en une seule concentration : 2000 mg/kg de poids corporel à des lots traités de 10 rats (5 mâles et 5 femelles). Le lot témoin (n=10 rats) a reçu seulement de l'eau. Les rats ont été mis en observation en continu pendant 24 heures après le traitement et pendant 14 jours afin de déceler tout signe de toxicité et de mortalité.

IV.2 Evaluation des activités biologiques

IV.2.1 Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* des trois extraits de racines de *Centaurea africana* a été évaluée selon le protocole décrit par Brand- Williams et al. (1995). Le principe général de ce test repose sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (diphényle picryl hydrazyl) stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 3.9 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Un volume de 5 ml de cette solution a été mélangé avec 3000 µl (à différentes concentrations) de l'échantillon. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et incubé à 30 minutes à la température de laboratoire et à l'obscurité. L'absorbance est lue à 517 nm. Le pouvoir antioxydant des extraits testés a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (l'acide ascorbique). Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$\text{Pourcentage d' inhibition (I\%)} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Abs contrôle : absorbance de control (solution de DPPH sans extrait)

Abs échantillon : absorbance en présence d'extrait.

IV.2.1.1 Calcul de la concentration inhibitrice de 50% (IC50)

La concentration inhibitrice de 50% aussi appelée EC50 (Efficient Concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. L'IC50 est calculée graphiquement en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testées.

IV.2.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne (test *in vitro*)

L'activité antibactérienne *in vitro* des différents extraits de *Centaurea africana* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose (méthode de disques) et par la technique de microdilution en milieu liquide (CMI). Pour évaluer l'activité antibactérienne de l'ensemble des extraits, nous avons utilisé :

Les souches bactériennes de référence de l'Américan Type Culture Collection (ATCC) testées dans notre étude, ont été fournies par l'Institut Pasteur Algérie:

Les souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne sont :

Bactéries (Gram Positif) : *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
Bacillus subtilis (ATCC6633)

Bactéries (Gram Négatif) : *Escherichia coli* (ATCC8739)
Pseudomonas aeruginosa (ATCC9027)

IV.2.2.1 Méthode de diffusion sur disque

Des disques imbibés d'extrait ont été déposés sur un tapis de germes indicateurs au tout début de leur croissance (Bauer et al, 1966 ; Sokmen et al, 2004). La diffusion de l'extrait sur le

milieu peut inhiber la croissance des souches à tester. Une zone claire ou zone d'inhibition est observée lorsque l'extrait est actif. La mesure du diamètre du halo d'inhibition permet d'évaluer la sensibilité de ces germes qui peut varier en fonction de la souche et de l'extrait testés (figure 9).

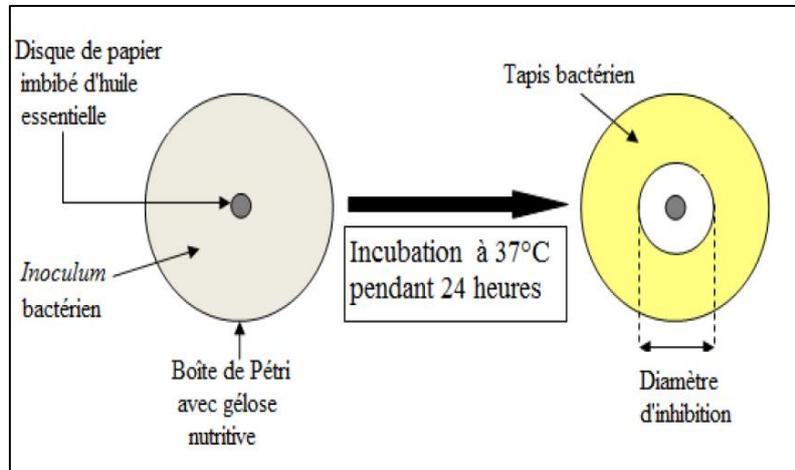


Figure 9 : Principe de la méthode de diffusion par disque (Guinoiseau, 2010).

La technique a été réalisée selon les recommandations de Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI M02-A10 (CLSI, 2009).

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture bactérienne jeune de 18 à 24 h sur milieu gélosé non sélectif. 3 à 5 colonies bien distinctes ont été suspendues dans l'eau physiologique (0,85 %), ensuite, la suspension a été ajustée à 0,5 McFarland.

Des disques en papier filtre Wattman n° 4 de 9 mm de diamètre ont été stérilisés par autoclavage, puis ont été imprégnés par 10 µl de chaque extrait lyophilisé solubilisé dans le DMSO à 10%, à une concentration de 20 mg/ml. Les milieux de culture utilisés ont été la gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes et la gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité aux extraits. L'ensemencement a été fait par écouvillonnage de l'inoculum sur la gélose par stries serrées

Des disques d'acide fusidique (antibiotique de référence commercial à la concentration de (10 µg /disque) ont été utilisés comme contrôle positif et du DMSO (10 µl/disque) comme contrôle négatif. Ces derniers ont été déposés directement sur la géloseensemencée par les quatre souches bactériennes. Après 15 min d'application des disques, les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 18-24 h

La lecture des résultats a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition uniformément circulaire (mm).

Les diamètres des zones d'inhibitions de la croissance microbienne ont été classés en cinq

catégories selon l'échelle d'estimation de la croissance microbienne (Mutal et al, 2009).

- Inhibition très forte : diamètre d'inhibition ≥ 30 mm ;
- Inhibition forte : $21\text{mm} \leq \text{diamètre d'inhibition} \leq 30\text{mm}$;
- Inhibition modérée : $16\text{mm} \leq \text{diamètre d'inhibition} \leq 21\text{mm}$;
- Inhibition légère : $11\text{mm} \leq \text{diamètre d'inhibition} \leq 16\text{mm}$;
- Absence d'inhibition : diamètre de la zone ≤ 11 mm .

IV.2.2.2 Méthode de micro dilution sur milieu liquide

Au cours de cette technique (Eloff, 1998) des microplaques à fond rond (96 puits) ont été utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice, qui est la plus faible concentration de l'agent antimicrobien qui inhibe la croissance des microorganismes.

Dans chaque ligne de la microplaque, ont été déposés 100 μl du bouillon Mueller Hinton ensuite, 100 μl de l'extrait à tester à la concentration de 20 mg/ml ont été déposés dans le premier puits. Après avoir bien mélangé le contenu du premier puits, 100 μl ont été prélevés, puis déposés dans le 2^e puits et ainsi le processus a été répété jusqu'au 10^e qui renferme 200 μl de la dilution la plus faible de l'extrait. Les deux derniers puits représentent des témoins positifs et négatifs. Une solution d'un antibiotique de référence (la gentamycine) a été également diluée en série dans une autre colonne de la microplaque comme témoin positif. Les extraits sont solubilisés dans l'eau distillée stérile et le tween. Les microplaques ont été scellées et incubées pendant une nuit à 37°C. Après incubation, 40 μl MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-2),5-diphényltetrazolium bromide, *Sigma Chemicals*[®]) ont été dissous dans l'eau et ajoutés à chacun des puits et les microplaques ont été examinées après 30-120 minutes supplémentaires d'incubation.

La croissance des germes bactériens a été indiquée par le virage à la couleur rouge du MTT réduit en formazan. La concentration minimale à laquelle une diminution de la couleur rouge a été visible par rapport à la dilution suivante a été prise en tant que valeur CMI.

La concentration bactéricide minimale (CMB) peut être déduite de la plus faible concentration à laquelle aucune croissance n'a été constatée après 24h à 37 °C d'incubation.

IV.2.2.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est la concentration minimale qui tue 99,99 % de l'inoculum de départ. La CMB a été déterminée et confirmée en prélevant 10 μl de suspension dans les puits sans croissance visible et en les ensemençant sur de la gélose nutritive. Les boîtes de pétri ont été incubées

pendant 24h à 37°C au bout desquelles on a procédé au comptage des colonies.

L'activité antibiotique des extraits peut être appréciée en tenant compte du rapport CMB/CMI.

Ainsi l'effet est dit :

- ✓ Bactéricide quand le rapport est compris entre 1 et 2.
- ✓ Bactériostatique quand le rapport est compris entre 4 et 16.

IV.2.3 Activité hémostatique *in vivo* et *in vitro*

IV.2.3.1 Mesure *in vivo* de l'activité hémostatique

IV.2.3.1.1 Mesure du temps de saignement

Les extraits lyophilisés ont été dissous dans une solution saline normale. Des rats de souche Wistar de sexe mâle pesant 200 ± 20 g ont été répartis en 4 lots de 7 rats chacun. Un lot témoin non traité a reçu 20 μ l d'une solution saline normale et les trois autres lots d'essais ont reçu 20 μ l de chaque solution d'extrait (aqueux, méthanolique, acétonique) en application locale.

Le temps de saignement (TS) est un test global explorant l'hémostase primaire *in vivo*. Il consiste à mesurer le temps nécessaire à l'arrêt du saignement après incision superficielle de la peau au niveau de la queue de chaque rat. La longueur et la profondeur de la plaie étaient de 1 x 0,2 cm, le temps de saignement a été déterminé pour chaque animal selon **Leela, (2014)**.

La durée du saignement a été déterminée en premier lieu à l'aide d'un chronomètre, le temps de saignement a été enregistré quand la première goutte touche le papier filtre circulaire à des intervalles de 30 secondes sans toucher la plaie avec le papier jusqu'à l'arrêt du saignement. Et en second lieu par la mesure de la quantité de saignement au moyen d'un papier buvard (**Photo 2**). Le sang a été recueilli puis pesé avant et après la procédure. La différence de poids du papier buvard a été calculée.



Photo 2 : Incision de la queue et dépôt des gouttes de sang toutes les 30s sur le papier filtre.

IV.2.3.2 Mesure *in vitro* de l'activité hémostatique

IV.2.3.2 Mesure du temps de coagulation

Le temps de coagulation (CT) du sang total en présence et en l'absence des divers extraits a été déterminé *in vitro* selon la méthode de **Lee-White (1913)**. Du sang veineux humain en bonne santé a été recueilli dans des tubes à essai en verre sec, propre et sans addition d'un anticoagulant. Le chronomètre a été lancé dès que le sang était passé dans la seringue.

100 ml d'eau distillée a été ajoutés pour cent milligrammes de chaque concentré d'extrait lyophilisé, la solution obtenue a été agitée jusqu'à l'obtention d'une solution homogène, qui a été répartie à raison de 10 µl, 25 µl, 50 µl et 100 µl respectivement dans des tubes d'hémolyses en verre pour chaque dose. Deux tubes contenant de l'eau distillée sans extrait ont servi de témoin. Par la suite, 10 ml de sang humain ont été prélevés et répartis dans dix tubes. Ces tubes ont ensuite été placés dans un bain marie à 37 °C.

Les tubes ont été retirés après 3 minutes et inclinés à un angle de 45°C et le temps requis pour la coagulation a été noté (le temps de coagulation normal est de 5 à 12 min). Les tubes à essai dans lesquels la coagulation n'a pas eu lieu ont été remis au bain-marie et réexaminés à intervalles de 15 secondes. De même, le temps de coagulation a été enregistré pour les échantillons restants.

IV.2.3.3 Analyse statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne ± SD.

Les valeurs IC50 sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe.

[% inhibition = f (concentrations)].

Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification ont été réalisées par le test ANOVA Uni-varié suivi du test de Tukey. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

IV.2.4 Evaluation *in vivo* de l'effet cytoprotecteur sur l'ulcère gastrique

L'effet cytoprotecteur des différents extraits l'lyophilisés des racines de *Centaurea africana* a été étudié sur un modèle d'ulcères gastriques chez les rats induits par un mélange acide chlorhydrique-éthanol (150 mM /60 %) (Kamguia et al., 2011).

IV.2.4.1 Protocole

L'expérimentation a été réalisée sur des rats mâles adultes de souche Wistar, âgés entre 12 et 14 semaines et pesant entre 180 et 220 g. Les animaux ont été logés dans des conditions standard de température ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) d'humidité (50%), et d'éclairage (12 h/cycle de lumière/12h d'obscurité). Les rats ont été alimentés avec un régime normal à base de granulés et de l'eau *ad libitum*. Avant l'expérimentation, les rats ont été acclimatés pendant 48 h aux conditions de laboratoire pour minimiser tout stress non-spécifique. Tous les lots des rats ont été privés de nourriture pendant 48 h avec accès libre à l'eau avant l'expérimentation. Les animaux ont été divisés en douze lots composés de six rats chacun. Toutes les substances d'essai ont été administrées par voie orale.

- **Le lot 1** représente le groupe témoin négatif, et a reçu 1 ml d'eau distillée /100 g de poids corporel.
- **Le lot 2** représente le groupe témoin positif, et a reçu 1 ml pour 100 g de poids corporel de la solution ulcérogène (HCl 150 mM dans 60% d'éthanol).
- **Le lot 3** représente le lot référence qui a reçu respectivement 1 ml/100 g de masse corporelle de Ranitidine à la dose de 150 mg/kg.
- **Les lots 4, 5 et 6** ont reçu respectivement des doses de 100, 200 et 300 mg/kg de poids corporel d'extrait aqueux.
- **Les lots 7, 8 et 9** ont reçus respectivement des doses de 100, 200 et 300 mg/kg de poids corporel d'extrait méthanolique.
- **Les lots 10 ,11 et 12** ont reçu respectivement des doses de 100, 200 et 300 mg/kg de poids corporel d'extrait acétonique.

Une heure après le traitement médicamenteux, 1 ml / 150 g de poids corporel de la solution nécosante (HCl 150 mM dans 60% d'éthanol) a été administré par voie orale à chaque rat, les rats ont été sacrifiés et les estomacs ont été prélevés et ouverts suivant la grande courbure, lavés et rincés sous un jet d'eau avant d'être étalés dans une boîte de pétri et observés

L'aspect des ulcérations a été évalué selon **Lwoff (1971)**. Seuls ont été considérés comme ulcérations, les sillons et les points hémorragiques.

Chaque estomac est scoré de 0 à 3 selon le nombre d'ulcérations :

0 = pas d'ulcérations ; 1 = 1 à 2 ulcérations ; 2 = 3 à 4 ulcérations ; 3 = plus de 4 ulcérations.

L'index d'ulcération est calculé selon la formule suivante :

$$UI = \frac{\text{Somme des cotation } x \% \text{ des estomacs présentant des ulcères}}{\text{nombre d'animaux}}$$

On considère qu'il y a 100 % d'ulcérations lorsque la somme des scores est égale à 12, c'est-à-dire lorsque l'index est égal à 3. Ainsi pour un index d'ulcération I.U, on peut calculer le pourcentage d'ulcération P.U comme suit :

$$PU = \frac{I. U \times 100}{3}$$

IV.2.4.2 Analyse statistique.

Les moyennes inter et intra lots ont été comparées par analyse de variance (test de Fisher).

Le rapport (F) de la variance inter-groupe à la variance intra-groupe permet de savoir si l'effet du facteur étudié est significatif. Les valeurs de *P* inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

V Formulation de pommade à 5 et 10%

La forme de la pommade dermique a été dictée par les propriétés tensio-actives et le caractère à la fois lipo et hydrophile désirés. Plusieurs essais de formulation ont été réalisés. Les excipients utilisés sont largement utilisés comme excipients pharmaceutiques dans la formulation des pommades et conformes aux monographies de pharmacopée pertinentes.

V.1 Caractéristiques des excipients utilisés

Les excipients peuvent, selon leur constituant chimique ou leur forme physique, être sous forme solide, liquide ou pâteuse. Leurs utilisations sont dépendantes des caractéristiques physiques et chimiques du principe actif, des formes pharmaceutiques dans lesquelles ils sont incorporés et de la voie d'administration (Le Hir, 2008 ; Vandamme, 2010).

V.1.1 Graisse de laine (lanoléine ou lanoline)

La graisse de laine est une cire obtenue à partir du suint qui imprègne la laine du mouton (suint triglycérides provenant des glandes sébacées, cire provenant des cellules épidermiques kératinisées). Le produit obtenu est débarrassé des triglycérides et il est raffiné (neutralisation, décoloration, désodorisation). C'est une substance translucide jaune, de consistance molle et à odeur caractéristique, insoluble dans l'eau, soluble dans l'éther, le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Elle a la remarquable propriété d'absorber au moins deux fois son poids d'eau en donnant une émulsion HL consistante et d'aspect homogène. Ceci est très utile pour l'incorporation de solutions aqueuses dans les pommades. La lanoline a été ajoutée à la préparation pour augmenter l'action absorbante d'eau de la pommade.

V.1.2 L'alcool cétylique

L'alcool cétylique officinal est un produit cireux constitué en fait par un mélange de plusieurs alcools dont le principal est l'hexadécanol. Il a été utilisé pour rendre la pommade hydrophile.

V.1.3 La vaseline

Excipient de base des pommades. Elle est de consistance onctueuse et pâteuse, de couleur blanchâtre ou jaunâtre si elle n'est pas décolorée, translucide en couche mince, insipide.

V.1 .4 La paraffine liquide

Les paraffines liquides sont des liquides incolores, inodores, insipides et non miscibles dans l'eau. Leur composition varie selon la nature du pétrole brut utilisé. On y trouve des carbures acycliques à chaînes droites ou ramifiées et des carbures naphthéniques. Elle a été ajoutée à la préparation pour obtenir une consistance mobile de la pommade.

V.2 Technique de préparation

La composition de la pommade de l'extrait méthanolique est détaillée dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Préparation de la pommade d'extrait méthanolique à 80%

Composants	MF (g)	RF (g)
Lanoline (graisse de laine)	45	9
Huile de vaseline (paraffine liquide)	150	30
Vaseline blanche	800	160
Alcool cétylique	5	1
Total	1000	200

MF: Formule Master; RF: Formule Réduite

Trois préparations d'onguent (200g chacun), avec (5% et 10% p/p) et un onguent simple véhicule comme témoin) ont été élaborées. L'extrait a été formulé en utilisant la formule réduite du Master formula (Tableau 7). Les quatre étapes clés de notre mode opératoire sont consignées dans la Figure 10.

Les différentes matières premières ont été pesées selon les quantités mentionnées dans la formule (**Tableau 7**), ensuite elles ont été mises en fusion et mélangées. Le premier mélange consiste à faire fondre sous agitation la paraffine liquide et l'alcool cétylique à 80°C. Par la suite, on procède à la préparation du deuxième mélange et ceci la veille de la formulation, en fluidifiant la lanoline et la vaseline à l'aide d'une plaque chauffante. Les deux mélanges ainsi obtenus ont été homogénéisés. Notre pommade a été obtenue en ajoutant le principe actif (10 g et 20 g) de l'extrait méthanolique à 80 % qsp 200 g de pommade de base. Le mélange a été refroidi préalablement à 50°C et maintenu sous agitation à 80 tours/ min jusqu' à obtention d'un produit homogène (**Figure 10**).

Dans la préparation de la pommade véhicule, 200 g de la pommade de base ont été prélevés et traités de la même manière afin de formuler une pommade sans ingrédient actif (MF).

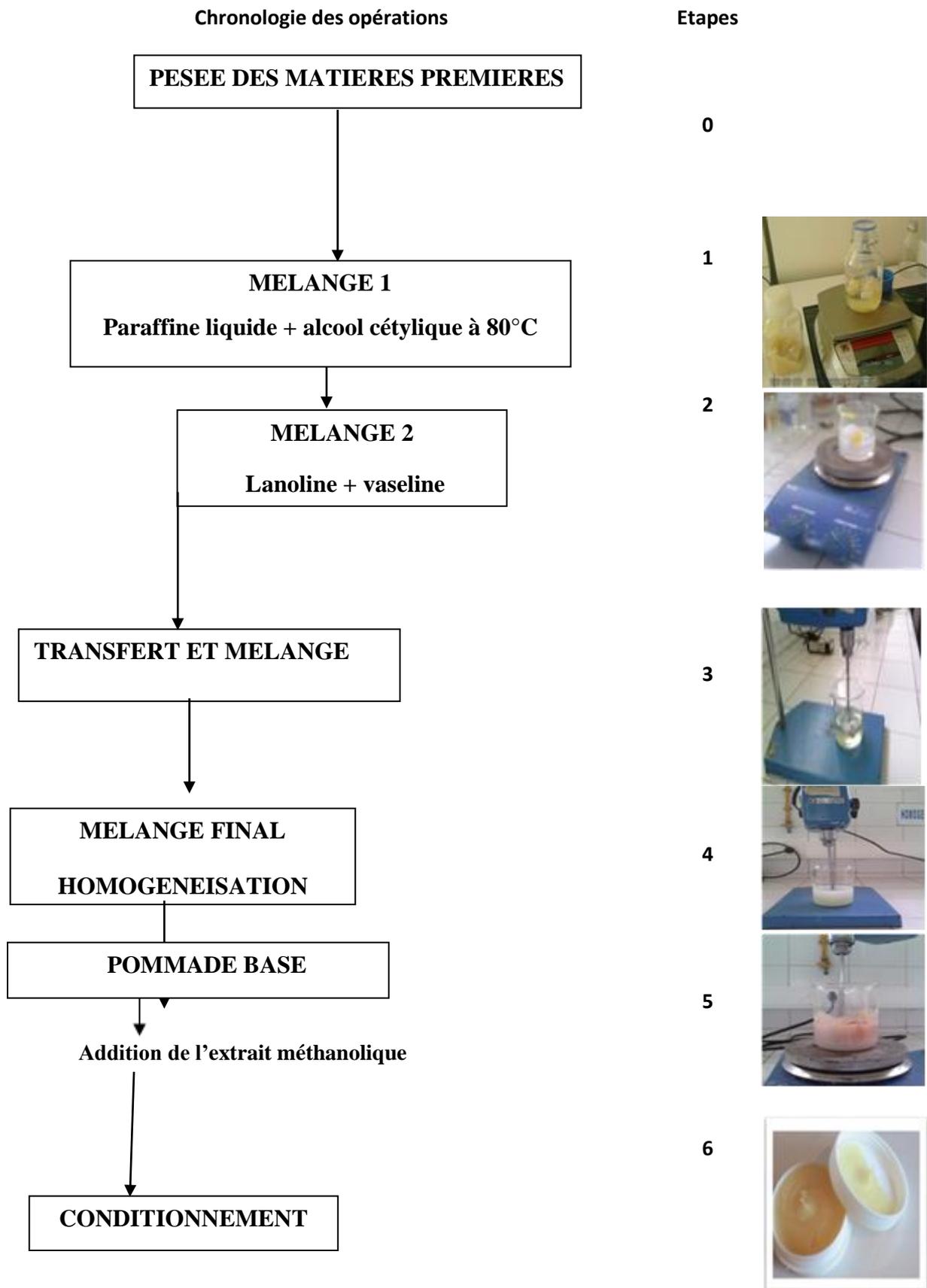


Figure 10 : Différentes étapes de préparation de la pommade de l'extrait méthanolique.

V.3 Contrôle de la qualité du produit fini

IV.3 .1 Détermination potentiométrique du pH

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre. Etalonné avant chaque utilisation avec des solutions tampons classiques (pH 4, 7 et 9). Le pH a été déterminé par méthode d'extraction, brièvement 5 g d'onguent ont été mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée dans un bêcher de 100 ml, chauffé au bain marie à environ 40 °C pendant 10 minutes et refroidi à température ambiante.

La suspension avec trois échantillons pour chaque formulation à examiner a été vigoureusement agitée pendant 10 à 15 minutes les électrodes immergées. La lecture a été effectuée dans les mêmes conditions que pour les solutions tampons. Le pH de la pommade a été mesuré pendant 5 jours de suite et les valeurs moyennes ont été rapportées.

V.3 .2 Contrôles physiques

V.3.2.1 Examen des caractéristiques macroscopiques

Les propriétés organoleptiques et les caractéristiques perçues ont été évaluées par examen visuel de l'aspect, la couleur et l'odeur.

V.3.2.1 .1 Caractéristiques organoleptiques

1- Test d'homogénéité

Le contrôle macroscopique de l'homogénéité a été évalué en étalant à l'aide d'une spatule une couche mince de la pommade sur une surface plane. L'apparition de grumeaux, de séparation cristalline et de bulles d'air a été recherchée.

2- Test de centrifugation

La séparation des phases et/ou la sédimentation ont été détectées en laissant soit les échantillons au repos pendant 30 jours ou par centrifugation. Des échantillons contenant 3 g de pommade ont été soumis à une vitesse de 1500 tours/minute pendant 10 mn. Différentes formes d'instabilités interdépendantes peuvent être observées : le crémage (ou la sédimentation), la floculation, la coalescence et l'inversion de phase (Toé, 2004).

IV.3.2.2 Examen des caractéristiques microscopiques

Le contrôle microscopique de l'homogénéité de la dispersion des gouttelettes de liquide dans une émulsion a été réalisé par l'observation sous microscope oculaire micrométrique aux objectifs de grossissements (x40) et (x100).

V.3.2.2.3 Test de limpidité

La filtration clarifiante avait pour but de retenir les particules inertes et permettre l'obtention d'un liquide limpide. Elle n'arrête pas les germes, mais élimine simplement les particules en suspension. Elle se fait à l'aide de filtres membranes (**Le Hir ,2001 ; Martindale, 2001 ; Vadémécum, 2001 ; Handbook ,2005**). Pour cela, un gramme de pommade a été dissous dans 10 ml d'eau distillé chaude dans un bécher stérile après un temps de refroidissement à température ambiante à l'aide d'une pince stérile, la masse grasse a été enlevée et la suspension obtenue a été coulée sur une membrane filtre (**Photo 3**).

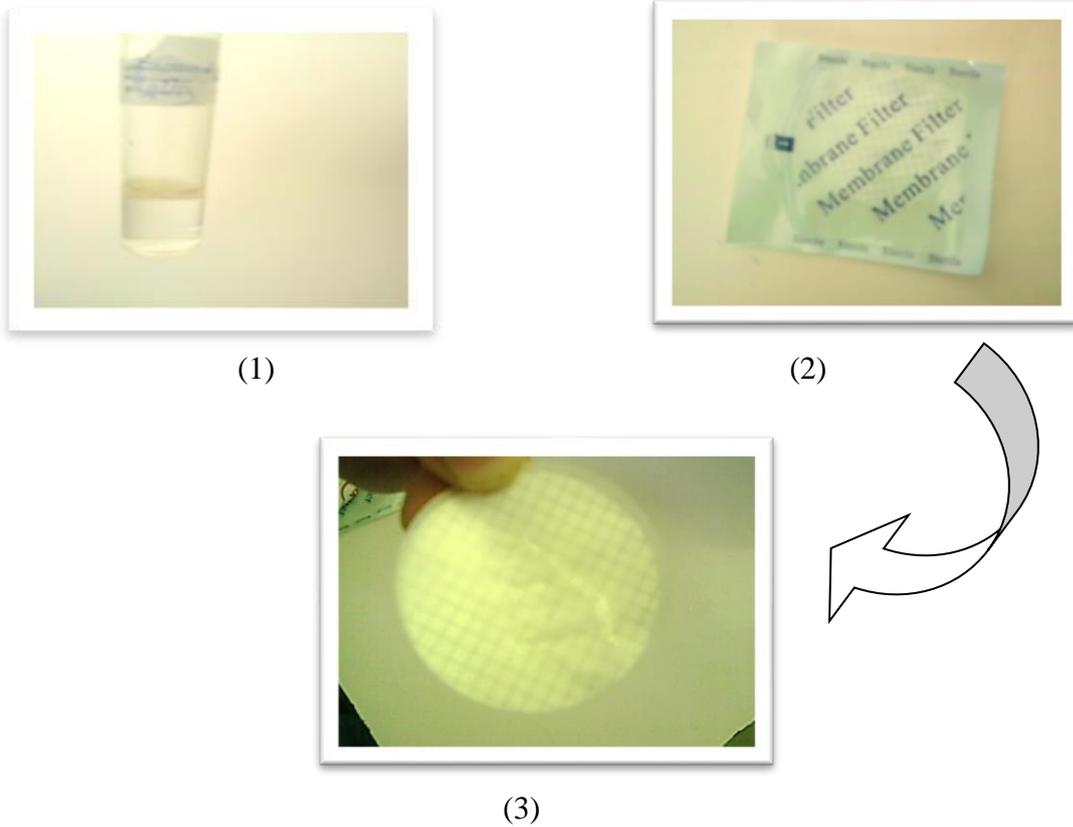


Photo 3 : Différentes étapes du test de limpidité de la pommade formulée.

VI. Evaluation toxicologique

La toxicité a été évaluée par contact et par ingestion de la poudre de l'extrait méthanolique de racine de *Centaurea africana*. L'étude a été réalisée sur des rats albinos Wistar fournis par l'Institut Pasteur d'Algérie, âgés d'environ trois mois, pesant 200 ± 20 g. Après une période d'adaptation d'une durée de 10 jours, les animaux témoins et traités ont été isolés dans des cages, abreuvés et alimentés *ad-libitum* et soumis à des conditions expérimentales identiques de température (21 ± 2 °C), d'hygrométrie (55 à 60%) et de photopériode (12 heures). Ces animaux ont été utilisés pour les études de toxicité subchronique, de l'activité anti-inflammatoire et de l'activité cicatrisante des plaies.

La toxicité cutanée a été évaluée par le test de Draize qui est un test de référence pour la mise en évidence d'un effet irritant et/ou corrosif (mécanique) d'une substance par l'application d'une dose unique sur la peau ou sur l'œil d'un animal. Par la suite, l'évaluation de la toxicité est associée à l'observation des symptômes qui correspondent à une catégorie de toxicité.

L'essai a été mené sur 06 lapins adultes, âgés de trois mois et pesant environ 2,5 à 3kg. Avant tout traitement, les animaux bénéficient d'un temps d'adaptation de 5 jours. Ensuite, ces animaux traités étaient isolés dans des cages avec eau et aliment à volonté et soumis à des conditions expérimentales identiques de température (21 ± 2 °C), d'hygrométrie (55 à 60%) et de photopériode (12 heures).

VI. 1 Tolérance cutanée

Les flancs de 6 lapins ont été soigneusement tondus la veille de l'application. Seuls les animaux possédant une peau saine ont été retenus pour l'étude, un flanc servira de côté témoin, l'autre flanc servira de côté essai. Après scarification du flanc essai par 3 incisions parallèles de 3cm de long espacées d'environ 0,5 cm, la pommade à base d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* à la concentration de 10% a été appliquée sur la peau saine et sacrifiée. L'irritation a été évaluée à 30 minutes et à 24 heures et la lecture a été effectuée 48 h plus tard c'est à dire 72 h après l'application.

L'évaluation a porté sur la formation d'un érythème et d'un œdème notés selon l'échelle numérique ci-dessous (**Tableau 8**) :

Tableau 8 : Echelle d'évaluation de la tolérance cutanée

Erythème et formation d'escarres	Pas d'érythème	0
	Léger érythème (à peine visible)	1
	Erythème bien visible	2
	Erythème modérée à important	3
	Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres (lésions profondes)	4
Evaluation de l'œdème	Pas d'œdème	0
	Œdème très léger (à peine visible)	1
	Léger œdème (contours bien définis, gonflement apparent)	2
	Oedème moyen (épaisseur = 1mm)	3
	Œdème grave (épaisseur supérieure à 1 mm)	4

La moyenne des notes obtenues constitue l'indice d'irritation primaire cutanée (IP), qui permet de classer la substance en 4 types de réponses :

- Action non irritante ($IP < 0.5$) ;
- Action légèrement irritante ($0.5 < IP < 2$) ;
- Action moyennement irritante ($2 < IP < 8$) ;
- Action sévèrement irritante ($5 < IP < 8$).

L'indice d'irritation primaire est calculé à partir de l'équation suivante :

$$IP = (\text{Œdème} + \text{Érythèmes}) \text{ Flanc traité} + (\text{Œdème} + \text{Érythèmes}) \text{ Flanc témoin} / 24$$

où : 24 = nombre de lapin (6) × nombres de zones testées (traité et témoin = 2) × nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2).

VI. 2 Evaluation de la toxicité subchronique

La toxicité subchronique par voie orale et cutanée a été réalisée respectivement selon les lignes directrices de l'OCDE 407 et 452 pendant 28 jours. Les rats ont été répartis en deux lots pour chaque voie d'administration, (orale et cutanée) un lot témoin recevant 1ml/100g de la substance véhicule et un lot essai recevant quotidiennement (7/7 jours) pendant 28 jours une dose de 1g/kg d'une solution d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* selon la voie d'administration (orale ou cutanée).

L'essai a été effectué avec un seul niveau de dose de 1000 mg/kg de poids corporel test limite (OCDE, 2008), les animaux ont été minutieusement observés, de manière à déceler toutes manifestations éventuelles de toxicité consécutives à l'accumulation de l'extrait dans l'organisme. La pesée a été effectuée chaque semaine. Au 28^{ème} jour, les rats ont été mis à jeun pendant une nuit et les prélèvements ont été effectués au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil après une légère anesthésie à l'éther éthylique, le sang a été prélevé sur EDTA (paramètres hématologiques), et sur tube hépariné (paramètres biochimiques et hématologiques).

A partir de ces prélèvements, les paramètres suivants ont été déterminés

- *Paramètres biochimiques:* GOT (Transaminase Glutamo Oxaloacétique), GPT (Transaminase Glutamo Pyruvique), PAL (Phosphatase Alcaline), glycémie, Cholestérol, Triglycéride, Créatinine, Urée et Protéines totales.
- Paramètres hématologiques : Taux de globule rouge (GR), Globule blanc (GB), Hématocrite, VGM (Volume Globulaire Moyen), Eosinophile (%), Monocyte (%), Lymphocyte (%) et Basophile (%).

Tous les animaux utilisés dans l'étude ont été sacrifiés et une autopsie générale, complète et détaillée a été réalisée (examen approfondi de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités : crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus) et un examen histopathologie complet a été pratiqué sur les reins, foie et pancreas de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité

Les analyses biochimiques et hématologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de biochimie médicale et du laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalo Universitaire (CHU) de Mustapha Pacha d'Alger, à l'aide d'un automate de type « **Hitachi 902 Automatic Analyzer** » pour les paramètres biochimiques et à l'aide d'un automate de type « **Beckman Coulter** » pour les paramètres hématologiques.

L'examen anatomo-histo-pathologique a été réalisé au laboratoire d'anatomie et de cytopathologie vétérinaire du département vétérinaire de l'Institut Pasteur d'Alger.

VII Evaluation des propriétés pharmacologiques

VII. 1 Activité antinflammatoire locale

Pour évaluer l'effet anti-œdémateux du traitement local par la pommade de l'extrait méthanolique des racines de *Centaurea africana*, l'œdème de l'oreille a été induit par l'huile de croton, selon la méthode de **Tubaro (1986)**. L'application locale d'huile de croton sur l'oreille des rats provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un anti-inflammatoire locale. Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème des oreilles après application de doses égales du produit à tester et du produit de référence correspondant.

Des rats *Wistar* mâles ont été utilisés pour l'étude et réparties en quatre lots de six rats chacun.

- **Lot I:** Les rats témoins ont reçu la pommade véhicule plus solution d'huile de croton ;
- **Lot II:** Les groupes de référence ont reçu Voltaren[®] Emulgel 1% (gel topique de diclofénac sodique) Novartis + solution d'huile de croton ;
- **Lot III:** ont reçus la pommade formulée à 5% plus la solution d'huile de croton ;
- **Lot IV:** ont reçus la pommade formulée à 10% plus la solution d'huile de croton.
-

La solution d'huile de croton a été préparée selon la formule suivante (v/v) : 4 parties d'huile de croton, 10 parties d'éthanol, 20 parties de pyridine et 66 parties d'éther éthylique.

Le médicament de référence et les pommades formulées à 5 et 10% ont été dissous dans la solution irritante à une concentration de 10 mg/ml. La solution irritante a été appliquée sous anesthésie à l'éther (0,02 ml) sur les deux côtés de l'oreille droite (OD). L'oreille gauche n'a pas été traitée (OG) (considéré comme témoin). 6 heures plus tard, les animaux ont été tués par dislocation cervicale; les oreilles droite et gauche de chaque animal ont été récupérées, des sections circulaires ont été prélevées avec un poinçon de 7 mm de diamètre et pesées. L'effet anti-inflammatoire a été déterminé en exprimant le changement de poids de l'oreille traitée par rapport à l'oreille gauche non traitée et également par rapport au groupe témoin ayant reçu la formule véhicule.

La différence de poids mesurée permet d'évaluer la réponse œdémateuse.

Les données sont exprimées en Moyenne ± SEM de moyenne

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{OD - OG}{OG} \times 100$$

Le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème chez les rats traités par rapport aux témoins:

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ œdème } T - \% \text{ œdème } E}{\% \text{ œdème } T} \times 100$$

VII. 2 Evaluation de la cicatrisation chez le rat

VII. 2. 1 Modèle par incision

Après épilation et anesthésiés par la kétamine[®] (150 mg/kg), une longue incision longitudinale de 5 cm de long dans une direction cranio-caudal dans la région dorso-lombaire a été réalisée (**Photo 4**). Immédiatement après, la plaie est fermée avec des agrafes à 0.5 cm d'intervalle. L'application des pommades formulées à 5 et 10%, de référence (Cycatril[®]) et de véhicule ont été appliquées une fois par jour pendant 11 jours. Les agrafes ont été enlevées la veille du 11^e jour et la résistance à la traction a été testée au 12^e jour postopératoire. L'évaluation de la résistance à la traction a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre (**Lee, 1969**).



Photo 4 : Différentes étapes du modèle de cicatrisation par incision.

VII. 2. 2 Modèle par excision

L'activité cicatrisante sur le modèle de plaie par excision chez le rat a été étudiée par l'application quotidienne de la pommade préparée à base d'extrait méthanolique à la concentration de 5 et 10%, du produit de référence Cycatril[®] et d'une pommade véhicule sans extrait sur des plaies circulaires de 2,5 cm de diamètre (500 mm² de surface) et 2 mm de profondeur au niveau de la région dorso-cervicale sur des rats préalablement épilés sous anesthésie par injection de la kétamine[®] par voie intra péritonéale à la dose de 150 mg/kg.

La méthode décrite par **Karumi (2004)** et **Tubaro (1986)**, avec une légère modification, a été employée (**Photo 5**).

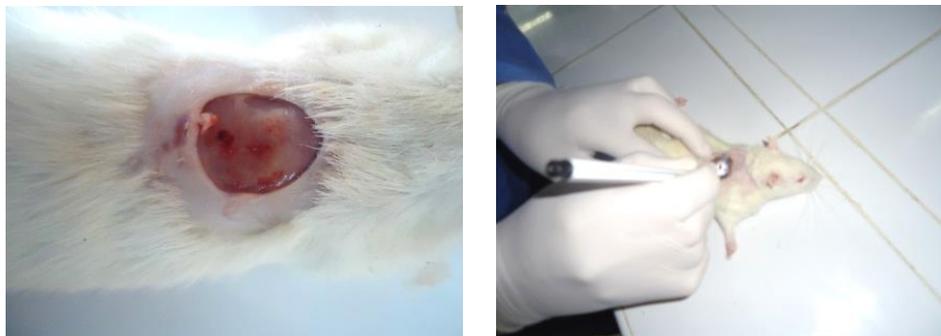


Photo 5 : Modèle de cicatrisation de plaie par excision chez le rat.

Les animaux ont été répartis en quatre groupes dans des cages individuelles, chaque groupe comprenant 12 animaux. Le lot I (témoin) a reçu une pommade véhicule sans extrait, le lot II (produit de référence) a reçu la pommade Cycatril[®], Le lot III a reçu la formulation d'essai à 5% et enfin le lot VI a reçu la formulation d'essai à 10%

Les paramètres étudiés ont portés sur :

- La fermeture de la plaie à j1, J4, j8, j12 j16, j18 et j24) ;
- Le temps d'épithélialisation ;
- Le dosage de l'hydroxyproline et sur l'examen histologique ;
- Le pourcentage de fermeture des plaies a été calculé selon la formule suivante (**Haihong Li, 2008**)

$$\% \text{ fermeture des plaies Jour} = \frac{\text{Surface plaie (J0-Jn)}}{\text{Surface plaie à J0}} \times 100$$

VII. 2. 2. 1 Détermination de la teneur en hydroxyproline

L'hydroxyproline est un constituant de base du collagène (**Shukla et al., 1999**). La teneur en collagène du tissu de granulation a été déterminée en estimant la teneur en hydroxyproline (**Switzer, 1991**). Au 12^e jour, six animaux de chaque lot ont été sacrifiés par surdosage d'anesthésie à la kétamine hydrochloride (150 mg/kg) et xylazine hydrochloride (25 mg/kg). Les échantillons de cicatrice ont été prélevés et la teneur en hydroxyproline des tissus de granulation a été mesurée après hydrolyse des échantillons de la peau dans du HCl 6N à

105°C pendant 18 heures. Le produit d'hydroxyproline a été oxydé par de la Chloramine-T (1,4% m/v) dans un tampon d'acétate-citrate à pH 6 et incubé pendant 20 mn dans le réactif Ehrlich's à 60 °C. Après extraction d'acide par le toluène, l'hydroxyproline dans chaque échantillon de tissu a été déduite d'une courbe d'étalonnage standard. Le taux d'hydroxyproline a été exprimé en microgrammes par milligramme de tissu (Photo 6).

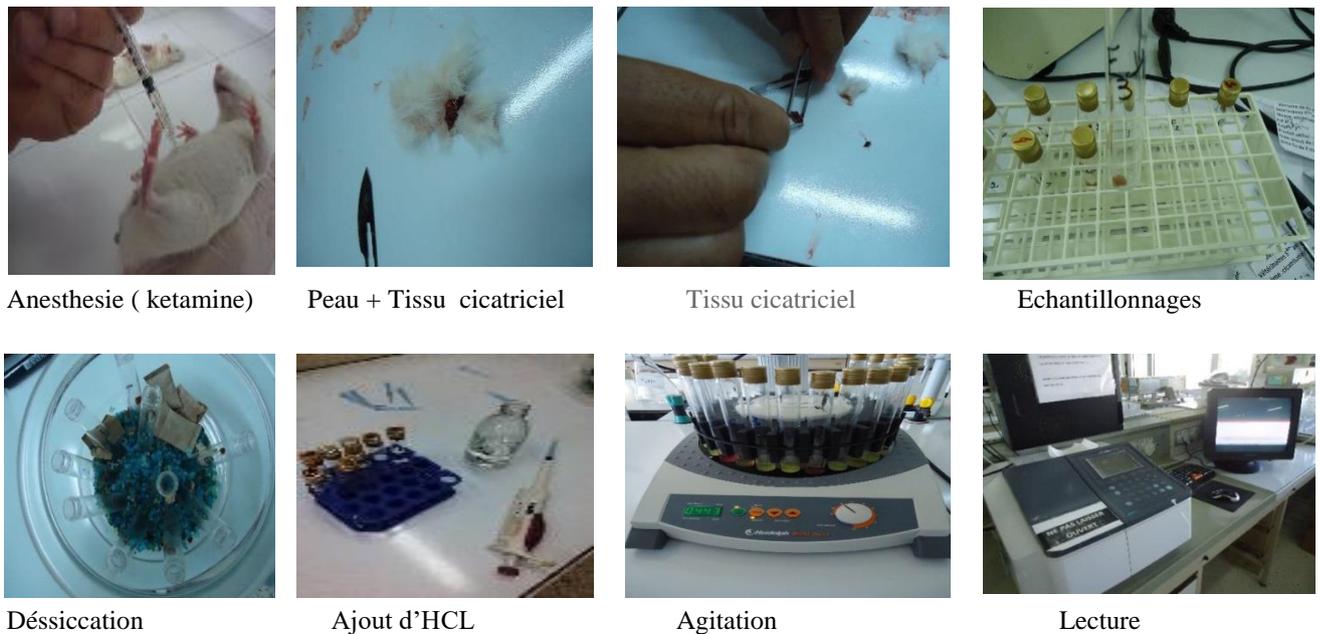


Photo 6 : Différentes étapes de la détermination de la teneur en hydroxyproline.

VII.2. 2. 2 Étude histopathologie

Les tissus de granulation de tous les lots d'animaux du modèle d'excision au 12^e jours ont été rapidement prélevés, lavés dans une solution de NaCl (0,9 %), fixés dans du formol (10%), déshydratés puis enrobés à la paraffine. Des coupes de 5 μ sont colorées à l'hématoxyline/éosine. L'examen histopathologique a porté sur la régénération du collagène, l'infiltration des fibroblastes, la néo-vascularisation et l'épithélialisation dans la zone des plaie par rapport aux lots témoins et lots traités par le produit de référence Cycatril .

VII. 2. 3 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm erreur standard. Les données ont été évaluées statistiquement par ANOVA à sens unique, suivi du test *t* de Dunnett pour la comparaison des groupes de test avec le contrôle avec $P < 0.001$.

TROISIÈME PARTIE
RÉSULTATS ET DISCUSSION

La partie résultats et discussion de cette thèse est scindée en trois parties :

- La première partie présente les résultats de l'enquête ethnobotaniques ;
- La deuxième partie porte sur les résultats des études phytochimique et biologique des trois extraits (méthanolique, acétonique et aqueux) des racines de *Centaurea africana* ;
- Enfin, la troisième partie présente les résultats de l'étude de formulation d'une pommade à base d'extrait méthanolique qui a présenté la meilleure activité. Elle englobe également, l'étude de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait ainsi que l'évaluation de ses propriétés cicatrisantes et anti-inflammatoires.

Les résultats de cette partie expérimentale ont fait l'objet d'un article « *In vivo* evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of methanolic extract of roots of *Centaurea africana* (L.) In Topical Formulation » dans la revue : Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research (AJPCR) présenté en annexe.

I. Enquête ethnobotanique

Les résultats de l'enquête ethnobotanique ont montré que l'utilisation des plantes médicinales à usage vétérinaire dépend de plusieurs facteurs.

1. Le sexe

Les plantes médicinales à usage vétérinaire sont utilisées aussi bien par les femmes que par les hommes. Mais, les femmes sondées semblent être extrêmement bien informées de l'art de guérir (75%). Ceci peut être expliqué par le fait que les femmes ont perpétué la connaissance des plantes de génération en génération et ont été, au cours des temps, les dépositaires des secrets des plantes médicinales. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par (**Merazi, 2016**) dans l'ouest algérien (Sidi Bel Abbas), par (**Bouallala et al, 2014**) dans le sud algérien (Oued Souf), au Maroc (région de Khenifra) par (**Hachi et al, 2015**) et dans le nord-ouest de la Tunisie (Ouled Sedra) (**Jdaidi et al, 2016**).

2. L'âge

L'âge moyen des personnes sondées varie entre 20 et 75 ans. Les personnes âgées de plus de 60 ans ont montrés une fréquence d'utilisation des plantes médicinales de 48 % suivie par ceux âgés entre 40 et 60 ans et 20 et 40 ans avec des fréquences respectives de 32 et 20%. Par contre, les personnes âgées de moins de 20 ans ont présentés une fréquence nulle.

La connaissance des propriétés et usages des plantes médicinales est généralement, acquise suite à une expérience pratique et ancestrale (**Jdaidi et al, 2016**). Ces connaissances tendent actuellement à disparaître car les détenteurs de ce savoir, meurent sans avoir transmis leur connaissance, ni l'avoir relaté verbalement ou par écrit par méfiance souvent et par manque d'intérêt des plus jeunes pour la médecine traditionnelle (**Mehdioui, 2007 ; Tugume, 2016**).

3. Niveau d'instruction

Dans la zone d'étude, la majorité (64%) des usagers des plantes médicinales sont analphabètes, 26 % ont un niveau primaire et 16 % un niveau moyen. Alors que ceux ayant un niveau d'études secondaires (7%) et universitaires (1%), utilisent très peu les plantes médicinales. Nos résultats confirment ceux d'autres travaux sur la pratique traditionnelle et usage des plantes médicinales (**El Hafian et al, 2014 ; Hafsé, 2015**).

4. Les maladies

Il ressort des réponses des personnes sondées (350 personnes) que les plantes médicinales sont utilisées principalement pour traiter les maladies de l'appareil digestif (32,24%), les affections respiratoires (30,36%), les maladies de la peau (14,42%) suivies par les pathologies urogénitales, bucco-dentaires et ophtalmiques (10,83 ; 6,35 et 4,6%) (Tableau 10).

Tableau 9 : Les maladies traitées par les plantes médicinales en pourcentage

Maladies	Effectif	Pourcentage (%)
Appareil digestif	113	32,24
Affections respiratoires	106	30,36
Maladies de la peau	50	14,42
Pathologies urogénitales	38	10,83
Bucco-dentaires	22	6,35
Ophtalmiques	16	4,6
Autres	4	1,2

Nos résultats corroborent ceux rapportés par **Meddour et al (2010)** qui ont montré que les maladies digestives et respiratoires étaient les maladies majoritairement traitées par des plantes médicinales en Kabylie. Des résultats similaires ont été rapportés par des études ethnobotaniques réalisées en **Egypte (AbouZid, 2011)**. L'enquête ethno-vétérinaire a permis de constater que les usages traditionnels de plantes pour le traitement des maladies humaines sont transposés dans les traitements vétérinaires. Les mêmes constatations ont été rapportées respectivement par **Alawa et al (2002)** et **Giday et al (2009)**.

Dans la région d'étude, la plupart des « recettes » sont préparées avec des feuilles (50,29%) suivent ensuite les fleurs et les fruits (23,35%) et la tige (12%). Les autres parties sont représentées respectivement par les graines (6,58%), la plante entière (4,19%) et le rhizome (3,59%). Ces résultats confirment l'importance de l'usage des feuilles en médecine traditionnelle (**Guessan 2009 ; Adnan et al, 2014 ; Boudjethia, Boukhalfa, & Djebli, 2015**). Les feuilles sont en effet le siège de réactions phytochimiques et constituent un réservoir de matières organiques (**Baba Aissa, 1999 ; Hachi, 2015**). D'autres travaux rapportent en revanche que les racines seraient les parties les plus largement utilisées des plantes dans les pratiques ethno-vétérinaires d'autres pays (**Hunde et Asfaw, 2004 ; Assegid, 2014 ; Tariq, 2014**).

La décoction, le cataplasme et l'infusion constituent les modes de préparation les plus fréquents (34,64%, 24,58 % et 18,45 % respectivement), suivi par l'utilisation fraîche (10,20%). Les autres modes de préparation restent minoritaires (fumigation...). La décoction permet en effet souvent de recueillir le plus de principes actifs et atténue ou annule l'effet toxique de certaines recettes (**Salhi et al, 2010**). Les voies d'administrations communément dominantes sont la voie orale (52,41 %) suivie par la voie cutanée (24,6%). Ceci est en accord avec les résultats de diverses études ethnobotaniques (**Benarba, 2015 ; Rashid et al, 2015 ; Kebebew, 2016**). Les administrations orales et topiques ont une action physiologique rapide favorisant le pouvoir curatif des remèdes à base de plantes (**Rehman et al, 2015**).

Cependant, aucune dose strictement normalisée de préparation à base de plantes n'a été signalée par la majorité des utilisateurs de plantes médicinales. Des résultats similaires ont été récemment rapportés par d'autres études menées dans certaines régions du territoire national (**Chermat, 2015 ; Benarba, 2016**).

L'eau est le solvant le plus utilisé pendant la préparation des recettes traditionnelles, parfois, le lait, l'huile ou le miel sont utilisés comme matrice ou ajoutés pour augmenter la viscosité de la préparation. (**Islam, 2014 ; Prabhu, 2016**) ont également signalé l'absence de doses normalisées dans les prescriptions traditionnelles de remèdes pour le bétail.

De plus, l'absence de cohérence quant à la quantité de préparation administrée pourrait conduire à la fois à un sous ou un surdosage. Ce manque de précision et de normalisation constitue l'une des principales lacunes du système de santé traditionnel dans la région d'étude.

Les informations ethnobotaniques recueillies dans la zone d'enquête confirment la diversité des plantes médicinales vétérinaires utilisées dans cette région. Notre enquête a permis de dresser un inventaire des plantes médicinales utilisées pour le traitement de maladies d'un certain nombre d'appareils (digestif, respiratoire, urinaire et les troubles cutanés, etc.) (**Tableau 10**).

Pour chaque plante recensée, le nom scientifique, la famille, le nom vernaculaire, la partie utilisée, le mode de préparation adopté par la population locale sont présentés. Au total, 60 plantes réparties dans 27 familles ont été décrites lors d'entretiens avec des villageois de la région d'étude.

Tableau 10 : Liste des plantes médicinales utilisées spontanément par la population locale

<i>Nom botanique</i>	Vernaculaire	Partie et mode de préparation		Indications thérapeutiques
<i>Famille : Alliaceae</i>				
<i>Allium cepa</i>	Lebsel	Latex des fruits frais		Pathologie dermique (abcès et furoncles...)
<i>Famille : Aloeceae</i>				
<i>Aloe vera</i>	Sebara	Application du suc		Pathologie dermique (verrues, cicatrisant, brûlures...)
<i>Famille Anacardiacees</i>				
<i>Pistacia lantiscus</i>	Amadey, thidekht	Cataplasme feuilles	des	Pathologie gastro-intestinale et dermique.
<i>Famille : Apiaceae</i>				
<i>Foeniculum vulgare L.</i>	Abesbas	La plante hachée, Décoction		Pathologie gastro-intestinale et du système broncho-pulmonaire
<i>Thapsia garganica L.</i>	Adharyis	Fleurs, décoction		Pathologie du système broncho-pulmonaire
<i>Ammi visnaga</i>	Avalaw	préparations à base de fruits, infusion		Pathologie gastro-intestinale (Antispasmodique) et du système broncho-pulmonaire, - Anticoagulante
<i>Famille : Amaryllidacées</i>				
<i>Allium sativum</i>	Ticert	Fruits frais		Pathologie gastro-intestinale, bucco-dentaire et de la sphère gynécologique
<i>Famille Astéracées</i>				
<i>Inula viscosa</i>	Amagraman	Cataplasme feuilles	des	Pathologie dermique . (cicatrisants)
<i>Taraxacum</i>	Saghdar	Cataplasme feuilles	des	Pathologie gastro-intestinale (constipation)
<i>Centaurea africana</i>	Amarsgous	Cataplasme racines	des	Pathologie dermique (brûlures, cicatrisant ...)
<i>Carduus marianus</i>	Tawra, Tasekra	Décoction des feuilles		Pathologie de la sphère gynécologique (rétention placentaire)
<i>Artemisia vulgaris</i>	Chih, Ifsi	Décoction tiges	feuilles,	Pathologie gastro-intestinale (indigestion, anti-diarrhéique, vomissement ...)
<i>Artemisia absinthium</i>	Tajoumith, sajret meriem	Décoction tiges	feuilles,	Pathologie gastro-intestinale, bucco-dentaire et dermique

<i>Chrysanthemum</i>	Wazduz, wakli	b Plante entière, cataplasme	Pathologie dermique
<i>Galactites tomentosa</i>	Assenan wegyyul	Tige décoction	Vermifuge
<i>Pulicaria odora</i>	Si elmksa	Feuilles, cataplasme	Pathologie dermique (brûlures, cicatrisant ...) et désinfectant.
<i>Scolymus hispanicus</i>	taghydiout	Feuilles cataplasme	Hémostatique
<i>Calendula arvensis L.</i>	Amzough ghilef, thouzalth	Feuilles, décoction	Pathologie gastro-intestinale
Famille : Boraginaceae			
<i>Borago officinalis</i>	fudlyum	Cataplasmes de la plante entière (sans racines), décoction	Pathologie du système broncho-pulmonaire et dermique, antiinflammatoire.
<i>Echicum vulgare</i>	Simum	Cataplasme ou pansement de la plante	Pathologie dermique (brulures cicatrisant et furoncles)
Famille : Berberidaceae			
<i>Berberis vulgaris L.</i>	Akermus	Partie aérienne	Pathologie du système broncho-pulmonaire, dermique et système urinaire.
Famille : Brassicaceae			
<i>Nasturtium officinale</i>	Guarninouche	partie aérienne, décoction	Pathologie du système broncho-pulmonaire et système urinaire.
Famille: Césalpiniacées			
<i>Ceratonia siliqua</i>	Takharubt	Poudre, les fruits	Pathologie gastro-intestinale (constipation)
Famille : Cistacee			
<i>Cistus salviifolius. L.</i>	Thouzalt	Partie aérienne	Pathologie dermique
Famille: Cruciféracée			
<i>Lepidium sativum</i>	Qarnunec	Plante frais	Pathologie du système broncho-pulmonaire
Famille : Cupressaceae			

<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Azel	Feuilles décoction	fruit	Pathologie du système broncho-pulmonaire
Famille : Fabaceae				
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Halba	Quelques graines dans l'eau (infusion)		Renforce l'appétit ou lors de ballonnement
<i>Cytisus scoparius</i> L. <i>Genêt à balais</i>	Azzu	Décoction Cataplasmes des feuilles et fleurs		Pathologie dermique, anti diarrhéique
<i>Vicia faba major</i>	Ibawan	Inhalation de la plante entière séchée		Pathologie du système broncho-pulmonaire et diurétique
<i>Cytisus oromediterraneus</i>	Ouzzou			Pathologie dermique et gastro-intestinale
<i>Glycyrrhiza labra</i>	Asghar zidhen	Macération des feuilles		Affections de l'appareil digestif, dermatologique, des glandes
Famille : Fagaceae				
<i>Quers robur</i>	Tableuț	decoction Liège en poudre		Oedème et les aphtes
Famille : Lamiaceae				
<i>Lavandula stoechas</i>	Amezzir	Décoction des tiges+ feuilles		Affections de l'appareil digestif et pathologie dermique.
<i>Thymus serpyllum</i> L	Tizàatrin, Tucna	Décoction des feuilles+tige		Affections de l'appareil digestif
<i>Lavandula officinalis</i>	amzir	Feuilles décoction		Anti-inflammatoire
<i>Ajuva iva</i>	Meuski lakhla	Plante entière, décoction, cataplasme.		Affections de l'appareil digestif, morsure d'animaux.
<i>Melissa officinalis</i>	Ifer zizwa	Décoction,		Anti-inflammatoire
<i>Mentha pulegium</i>	Félgu, Temarsa	Décoction des feuilles		Pathologie du système broncho-pulmonaire et digestive
<i>Phlomis herba-ventibovii</i>	Amezzuy guilef	Cataplasme des feuilles		Pathologie dermique. (cicatrisante)
<i>Thymus vulgaris</i>	Tizeetrin, Tucna	Infusion des feuilles+tiges		Désinfectant, pathologie du système broncho-pulmonaire

<i>Thymus serpyllum</i>	Tizàatrin, Tucna	Décoction feuilles+tige	des	Pathologie du système broncho-pulmonaire
<i>Ocimum basillicum</i>	Lahbaq	Infusion des feuilles		Pathologie du système broncho-pulmonaire
<i>Mentha pulegium</i>	Félgu	Infusion des feuilles		Pathologie du système broncho-pulmonaire
<i>Marrubium vulgare</i>	Ifzi, Marnuyet	decoction Cataplasme feuilles	ou des	Pathologie du système broncho-pulmonaire
Famille : Moraceae				
<i>Ficus carica</i>	Taneqlet	Latex des feuilles ou des fruits		Pathologie dermique, antiinflammatoire
Famille : Myrtaceae				
<i>Eucalyptus globulus</i>	Takalytust	Decoction feuilles, cendre des feuilles+ eau Inhalation		Affections de l'appareil digestif (Acidose des bovins) Pathologie du système broncho-pulmonaire
<i>Punica granatum</i>	taremant	Décoction de la peau des fruits		Affections de l'appareil digestif, vermifuge
Famille : Oleaceae				
<i>Myrtus communis</i>	Chilmun	Décoction des feuilles		Affections de l'appareil et Pathologie du système broncho-pulmonaire
<i>Olea europea L.</i>	tazemurt	Huile, des fruits décocté feuillent		Affections de l'appareil digestif, Cicatrisant
<i>Olea sylvestris</i>	Tahechat, tazbujt	Décoction des feuilles		Affections de l'appareil digestif
<i>Fraxinus ornus</i>	Taslent	décoction des feuilles		Affections de l'appareil respiratoire, génito-urinaire
Famille : Papaveraceae				
<i>Papaver rhoeas</i>	Wahrir, Flilu	Décoction des pétales		Pathologie du système broncho-pulmonaire
Famille : Plantaginaceae				
<i>Plantago lanceolata</i> <i>plantain</i>	Ljuz umeksa	Feuilles frais hachée		pathologie dermique. (ulcération de la peau, cicatrisant et furoncles)
Famille : Punicaceae				
<i>Punica granatum</i> <i>Grenadier</i>	taremant	Décoction de la peau des fruits		Vermifuge et anti diarrhéique

<i>Famille : Poaceae</i>					
<i>Hordeum vulgare</i> <i>Orge</i>	Irden	Poudre d'olive	+	huile	Expulsion du reste de placenta après vêlage
<i>Famille : Rhamnaceae</i>					
<i>Rhamnus alaternus L.</i>	Imlillesse	Feuilles	Décoction		Ictère
<i>Famille : Rosaceae</i>					
<i>Prunus cerasus</i>	Hab lemlouk	Hab lemlouk fruit	Tiges, decoction		Pathologie du système urinaire
<i>Famille : Rutaceae</i>					
<i>Citrus limon (L.) Burm. f.</i>	Karés	Decoction	feuille		Affections de l'appareil digestif vomissement
<i>Ruta graveolens L.</i>	lfidjla	feuilles	Décoction, inhalation		Affections de l'appareil digestif et pathologie dermique (cicatrisant)
<i>Famille : Urticaceae</i>					
<i>Urtica dioica L.</i>	Azegtuf	Feuilles,	racine		Anti-inflammatoire.

La famille des **Lamiaceae** prédomine avec 12 espèces utilisées (44,44%), suivie par la famille des **Asteraceae** avec 11 espèces (40.74%) et par la famille des **Fabaceae** avec 5 espèces (18.51 %), Alors que, les autres familles botaniques ne comptent qu'une, deux à trois espèces. L'enquête a révélé l'importance phytothérapeutique de onze plantes médicinales comme plantes cicatrisantes. Dix de ces plantes ont déjà fait l'objet d'investigation ; *Aloès des Barbades* (Farzadinia, 2016; Moriyama, 2016), *Borago officinalis* (Samani, 2014 ; Heersaiy,2015), *Echicum vulgare* (Eruygur, 2016), *Pistacia lantiscus* (Djerrou, 2010 ; Boukeloua, 2016), *Inula viscosa* (Khalil,2009), *Plantago lanceolata* (Singh, 2016), *Phlomis herba-ventibovii* (Khitri , 2014; Kuranel , 2016), *Lavandula stoechas* (Rezai, 2011), *Olea europea L.* (Koca,2011), *Ruta graveolens L.*(Hayder, 2014).

En revanche aucune étude n'a été menée pour valider l'usage traditionnel de *Centaurea africana*. Selon l'enquête, l'indication majeure de *Centaurea africana* est le traitement des brûlures (34%), suivie par le traitement des plaies (28%) et des escarres (26%) (Seule la racine de la plante est utilisée). Plusieurs modes de préparation existe mais la forme poudre est le mode le plus utilisé (42%) suivi de l'association poudre plus l'huile (22%), et la préparation en pommade (18%). L'administration des remèdes se fait à 100 % en application locale (voie cutanée).

Nous avons donc retenu cette plante dans le cadre de la seconde partie de notre travail expérimental. Les racines de la plante *Centaurea africana* ont été soumises à trois types d'extraction basées sur la macération de la poudre végétale avec des mélanges de solvants de polarité croissante : acétone/eau ; méthanol/eau. Et afin de se rapprocher au plus près des préparations traditionnelles, nous avons également utilisé seulement de l'eau chaude pour l'obtention de l'extrait aqueux.

II. Résultats de l'étude phytochimique

II. 1 Rendements d'extraction

D'une manière générale, les rendements des extraits varient en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant.

Le rendement des extraits (méthanolique, acétonique et aqueux) (**Tableau 11**) est déterminé par le rapport :

$$\% \text{ Rendement} = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu}}{\text{Masse de la matière végétale avant extraction}} \times 100$$

Tableau 11 : Rendement des extraits : méthanolique, acétonique et aqueux

Solvant	Rendement (%)
Méthanol	12,5
Eau	10,7
Acétone	7,4

Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'extrait méthanolique (12,5%), suivi par celui réalisé avec l'eau (10,7%), Par contre, le rendement le plus faible a été obtenu avec l'extrait acétonique (7,4%). Il ressort que les solvants polaires (l'eau et le méthanol) donnent de meilleurs rendements d'extractions. Ainsi, un rendement d'extraction plus élevé dans le méthanol pourrait s'expliquer par sa facilité de pénétration dans la membrane cellulaire et son pouvoir d'extraction des ingrédients intracellulaires de la matière végétale (**Singha, 2016**). D'autres études ont également suggéré que le méthanol possède un rendement d'extraction plus élevé que les autres solvants tels que l'acétone, l'éther di-éthylique, l'acétate d'éthyle et l'eau (**Singh et al, 2013 ; Sreeramulu et al, 2013**).

II. 2 Analyse qualitative

Les tests phyto-chimiques ont été réalisés sur des extraits préparés à partir des racines de *Centaurea africana* L, en utilisant des solvants de polarité différente (méthanolique, acétonique et aqueux) selon les méthodes classiques de caractérisation et d'identification dont les résultats sont repris dans le **Tableau 12**.

Les alcaloïdes étaient absents dans tous les extraits. Leur absence dans les différents extraits pourrait être la conséquence des facteurs environnementaux, de la localisation géographique et pédoclimatiques de la plante étudiée (minéraux du sol). Ces derniers ont une grande influence sur les contenus phyto-chimiques de la plante (**Borokini et Ayodele, 2012 ; Khanam, 2015**).

Les tests phyto-chimiques réalisés ont également montré la présence des saponosides uniquement dans l'extrait méthanolique. Les saponosides sont connus par leur effet anti-inflammatoire et anti-œdémateux (**Ikegami et al, 2006**). Ils exercent aussi des activités antifongiques, antibactériennes et antiparasitaires (**N'Guessan et al, 2009 ; Mezouar et al., 2014**).

Tableau 12 : Résultats du criblage phytochimique des différents extraits de racine de la plante étudiée.

Constituants	Résultats			
	Extrait méthanolique	Extrait aqueux	Extrait acétonique	
Alcaloïde	-	-	-	
Coumarine	+	+	+	
Flavonoïdes	+	+	+	
Polyphénols totaux	+	+	+	
Saponosides	+	-	-	
Terpénoides	+	+	+	
Anthocyanes	+	+	+	
Tanins	Catéchiques	+	+	+
	Galliques	+	+	+

+ : Présent ; - : Absent

Le criblage phytochimique des différents extraits de racine de *Centaurea africana* a permis de caractériser la présence de polyphénols, de flavonoïdes, de tanins, de coumarines, de triterpènes ainsi que les anthocyanes. La présence de ces métabolites secondaires pourrait être responsable des activités pharmacologiques potentielles et conférer à la plante son caractère de plante médicinale.

Ces métabolites secondaires sont en effet doués des propriétés biologiques diverses :

- Les tanins confèrent aux plantes des propriétés astringente, antiseptique, anti-inflammatoire et anti-oxydante (**Bruneton, 2009 ; Ghedadba2014 ; NGA, 2017**). Ils leur confèrent en plus une activité hémostatique et vasoconstrictrice sur les petits vaisseaux ;
- Les flavonoïdes possèdent des propriétés antiseptique (**Igor, 2002**), antifongique et antibactériennes (**Amiour 2014**), des propriétés anti-inflammatoire et antioxydante (**Kpètèhoto, 2017**) ;
- Les terpénoïdes possèdent des activités antibactériennes et manifestent également des activités analgésiques et antioxydantes (**Kouchadé, 2017**) ;
- Les coumarines sont principalement connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires (**Yeo, 2011**) ;
- Les composés phénoliques sont des substances reconnues pour leurs propriétés antioxydante (**Tabart, 2012 ; Katanić, 2015**) ; et anti-inflammatoire (**Arnold, 2015**).

II. 3 Analyse quantitative

II. 3.1 Dosages spectrophotométriques des polyphénols

II. 3.1.1 Dosages des phénoliques totaux

La teneur en polyphénol des différents extraits bruts a été déterminée par spectrophotométrie UV-visible. Les valeurs ont été rapportées en μg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait de matériel végétal. La courbe a été établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats exprimés en terme d'équivalents acide gallique à l'aide d'un courbe étalon selon une équation de type $y = 0,0403x - 0,014$ et avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.9969$ (Figure 11).

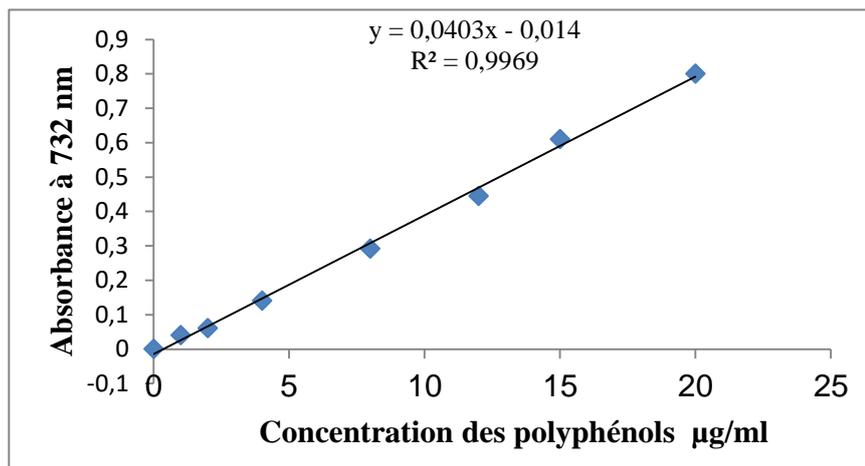


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux dans les extraits sont représentés dans la **Figure 12**. L'analyse quantitative des phénols varie considérablement entre les différents extraits. Les résultats révèlent que l'extrait élaboré avec le solvant méthanol est celui qui contient la plus grande proportion de polyphénols totaux ($330 \pm 0,65 \mu\text{g}/\text{mg}$) suivis par les extraits aqueux ($220 \pm 3,38 \mu\text{g}/\text{mg}$). Alors que, la fraction acetonique possède les teneurs les moins élevées ($70 \pm 1,35 \mu\text{g GAE}/\text{mg}$).

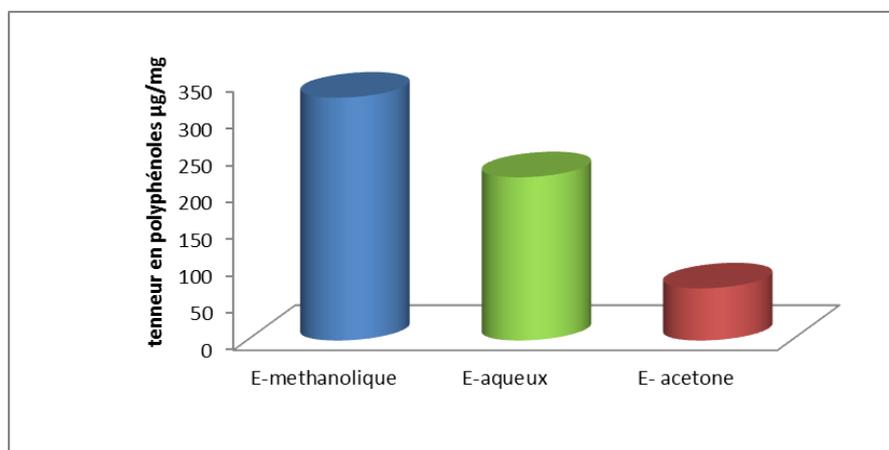


Figure 12 : Teneur en polyphénols totaux des différents extraits.

L'extrait méthanolique de la racine de *Centaurea africana* peut être considéré comme une très bonne source de composés phénoliques (Oueslati et al, 2012 ; Faraji, 2016).

La différence de concentration de composés phénoliques constatée est due à la différence de polarité des solvants d'extraction (Medini, 2014 ; Alnashi, 2016).

II. 3.1.2 Dosages des flavonoïdes

La quantité en flavonoïdes est exprimée en μg équivalent de quercétine /mg d'extrait à l'aide d'une courbe de régression (obtenue avec une gamme de concentrations précises de quercétine) selon l'équation de régression : $y = 0,0304 x (-0,0008)$; $R^2=0,9987$ (Figure 13).

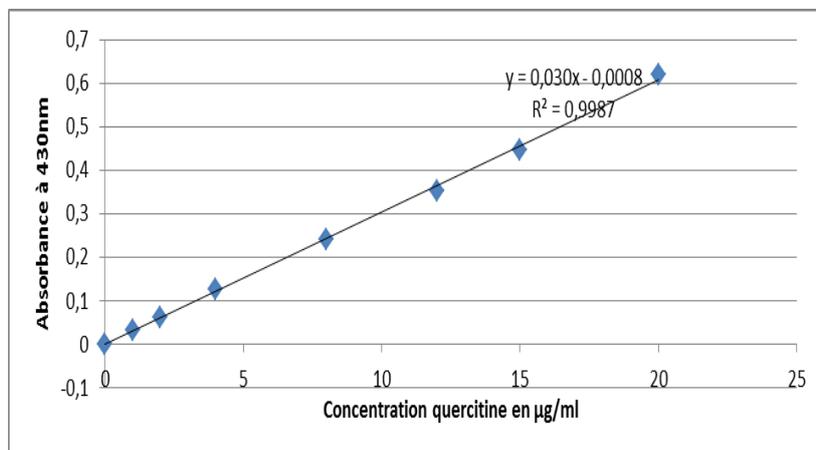


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

La teneur en flavonoïde des différents extraits (Figure 14) varie de $4,06 \pm 0,96 \mu\text{g}/\text{mg}$, μg équivalent de quercétine par milligramme de matière végétale sèche à $13 \pm 0,43 \mu\text{g}/\text{mg}$. L'extrait méthanolique de racine de *Centaurea africana* a présenté la plus forte concentration de flavonoïde ($13 \pm 0,43\mu\text{g}/\text{mg}$), suivi par l'extrait aqueux lyophilisé ($6.3 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{mg}$) et l'acétone ($4.06 \pm 0,96 \mu\text{g}/\text{mg}$ de MS d'extrait).

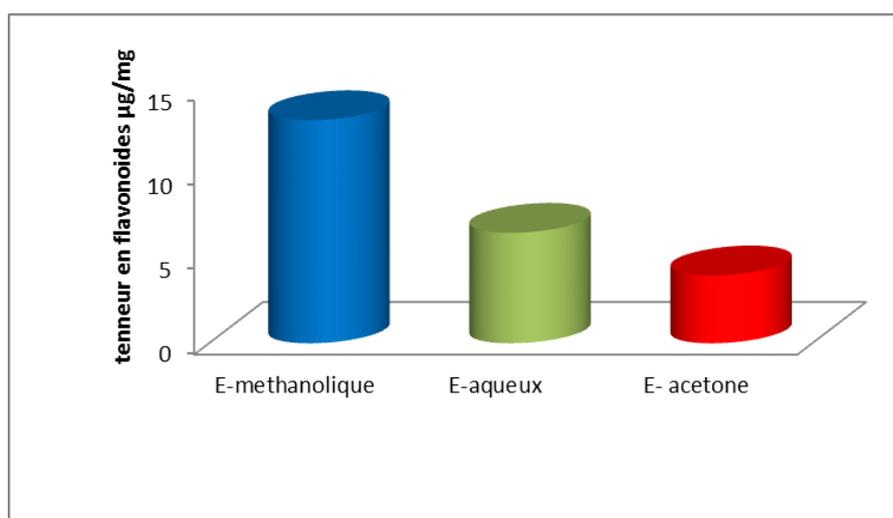


Figure 14 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits végétaux dépend de la polarité des solvants d'extraction (Stanković, 2011 ; Ghedadba, 2014) et du type de standard utilisé (quercétine, rutine) (Djeridane, 2010). Les travaux de Bruneton (2009) et de Stanković (2011) rapportent une meilleure solubilité des flavonoïdes dans les solvants polaires ou dans des mélanges de solvant-eau en particulier celui méthanol-eau. Par ailleurs, la plupart des flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* sont des flavonoïdes glycosylés (Akkal, 2007). La présence de ces sucres ainsi que celle des groupes hydroxyles augmentent ainsi leur solubilité dans les extraits polaires.

Les flavonoïdes sont connus par leur propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Cheng Li, 2015 ; Catarino, 2016 ; Huang, 2017). Il a été également démontré que certains composés flavonoïdiques possèdent des propriétés hépato-protectrices (Nedialkova, 2017).

II. 3.1.3 Dosages des tanins

La quantité des composés tanniques des extraits des racines de la plante *Centaurea africana* a été déterminé à partir de la courbe étalon catéchine. Les résultats sont exprimés en μg équivalent de catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EQC/g) (Figure 15) selon une équation de type :

$$Y = 0,1162 x (-0,0034) \text{ avec } R^2=0,9953$$

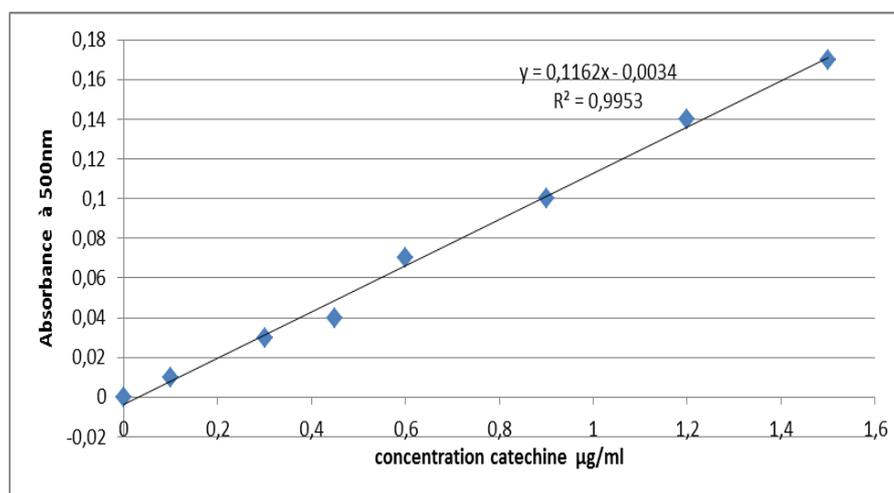


Figure 15 : Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Les résultats des teneurs en tanins condensés varient considérablement selon les différents extraits et les valeurs obtenues ne suivent pas les mêmes tendances enregistrées tant pour les polyphénols totaux que pour les flavonoïdes. Les extraits acétonique et aqueux présentent les

teneurs les plus élevées avec des valeurs respectives de $109 \pm 5,29 \mu\text{g}$ et $94,33 \pm 11,59 \mu\text{g}$ équivalent de catéchine par milligramme de matière sèche. En revanche les teneurs les moins importantes en ces composés ont été enregistrées pour l'extrait méthanolique avec une concentration de $72,33 \pm 11,01 \mu\text{g}$ équivalent de catéchine par milligramme de matière sèche. (Figure 16).

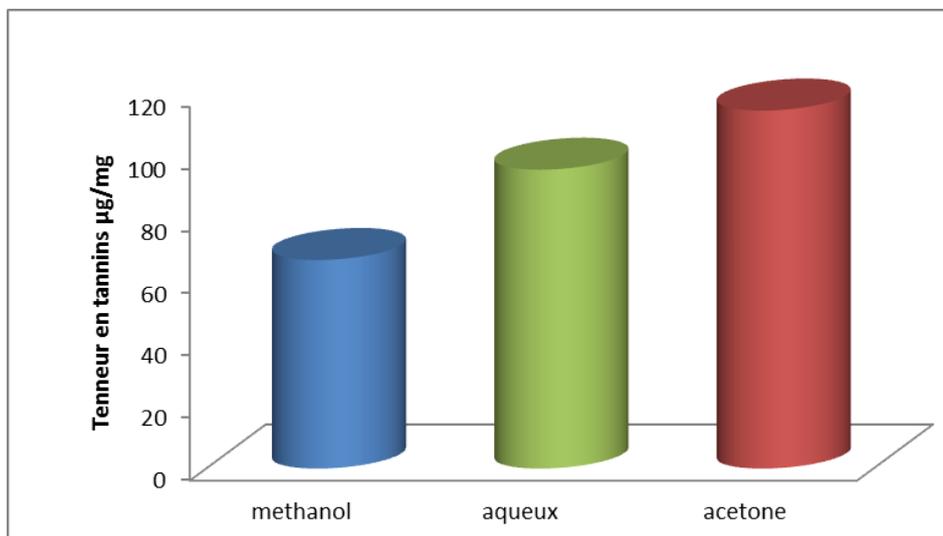


Figure 16 : Teneur en tanin des différents extraits.

Les tanins possèdent un large éventail d'activités biologiques. De nombreuses études ont ainsi rapporté leur forte activité antioxydante (Saxena, 2013 ; Prasad, 2016) et leurs activités antibactérienne et antifongique (Mrabti, 2017). De plus, des études semblent indiquer aussi que les tanins possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Alinejhad, 2016). Les tanins condensés sont présents en faibles quantités dans les différents extraits de racine de *Centaurea africana*, comparées aux polyphénols totaux et flavonoïdes. L'extraction des tanins condensés dépend de la nature du solvant utilisé et des conditions opératoires (Chanvan et al, 2001). La plus grande quantité de tanins condensés a été retrouvée dans l'extrait acétonique, suivie par l'extrait aqueux. Par ailleurs, la plus faible quantité de tanin a été trouvée dans l'extrait méthanolique. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui rapportent une meilleure extraction des tanins condensés par le mélange acétone/eau (Chavan, 2013 ; Allai, 2016 ; Elgailani, 2016).

III. Activité biologique

III.1 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques, acétoniques et aqueux de la poudre lyophilisées des racines de *Centaurea africana* a été mesurée par spectrophotométrie par la technique de réduction du DPPH qui se traduit par le changement de la couleur entre l'état oxydée (violette) et l'état réduit (jaunâtre). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par les substances anti-radicalaires (Majhenic, 2007).

Le pouvoir antioxydant des différents extraits a été déterminé à partir des IC50 ou concentration nécessaire à la réduction de 50% du radical DPPH.

La valeur de l'IC50 est négativement corrélée à l'activité antioxydante ainsi une valeur basse de l'IC50 indique une activité antioxydante élevée de l'échantillon testé (Akrouf et al, 2011 ; Hebi et al, 2016).

Dans notre cas, l'IC 50 est exprimée en µg de l'extrait /ml de milieu réactionnel.

Les équations : $y = ax + b$ obtenues par régression linéaire sont les suivantes

Extrait méthanolique : $Y = 0,2997x + 33,283$ avec $R^2 = 0,9902$

Extrait aqueux : $Y = 0,2722x + 31,757$ avec $R^2 = 0,978$

Extrait acétonique : $Y = 0,1662x + 32,732$ avec $R^2 = 0,9101$

Acide ascorbique $Y = 0,5593x$ avec $R^2 = 0,3862$

Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits de racine de *Centaurea africana* sont présentés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Valeurs de l'IC50 de l'acide ascorbique et des extraits méthanolique, acétonique et aqueux de *Centaurea africana*

Étalon / Extrait de <i>Centaurea africana</i>	Valeur d'IC50 (µg/ml)
Acide ascorbique	0,89 ± 1,23
Méthanolique	15 ± 0,038
Aqueux	64 ± 0,011
Acétonique	84 ± 0,013

Les résultats du test d'activité anti-radicalaire montrent des variations statistiquement significatives en fonction de l'extrait étudié. L'antioxydant de référence (acide ascorbique) a montré une activité antioxydante puissante avec une IC50 de l'ordre de 0,89 µg/ml. Suivi par l'extrait méthanolique avec une IC50 de l'ordre 15µg/ml puis l'extrait aqueux avec une IC50 de 64±0,011µg/mg et enfin, l'extrait acétonique qui a montré l'activité la plus faible avec IC50= 84 µg/ml, soit une activité antioxydante 5 à 6 inférieure à celle de l'extrait méthanolique (**Figure 17**).

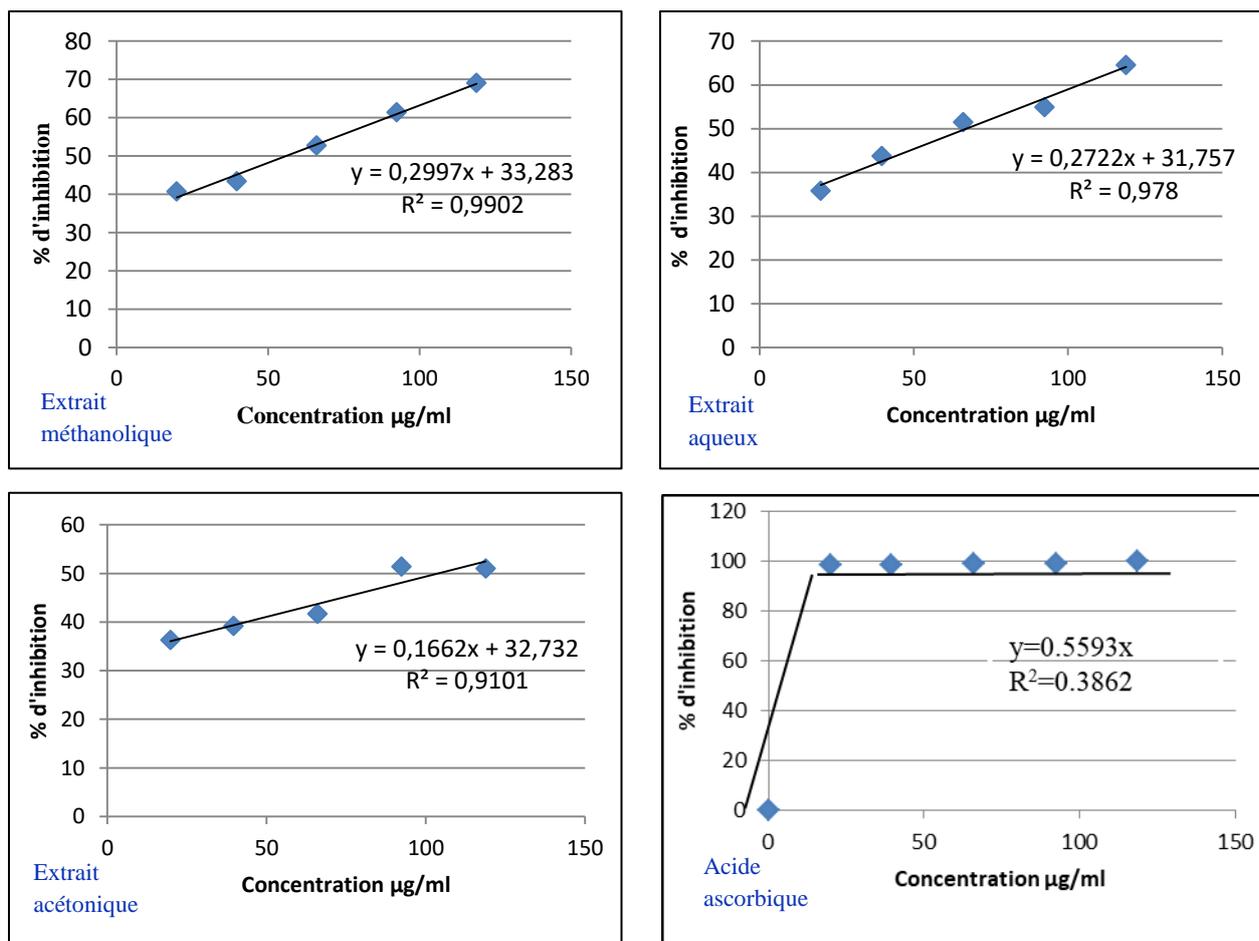


Figure 17 : Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique et des extraits de *Centaurea africana*.

Une corrélation étroite et une relation linéaire entre la teneur en flavonoïdes et en polyphénols totaux des extraits et l'activité antioxydante a été décrite. **Suhartono et al. (2012)** et **Riahi, (2013)** ont ainsi rapporté qu'une teneur élevée en phénols totaux et en flavonoïdes des espèces végétales contribue à leurs activités antioxydante.

L'activité antioxydante la plus élevée a été retrouvée dans l'extrait méthanolique. Le méthanol est considéré comme le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés antioxydants et notamment des polyphénols, sans doute en raison des interactions (liaisons hydrogènes) entre les sites polaires des antioxydants et du méthanol. **Dayi et al (2011)** ont par ailleurs montré que l'activité antioxydante semblait être plus élevée dans les extraits méthanoliques et aqueux d'un certain nombre d'espèces du genre *Centaurea calcitrapa* subsp. *Calcitrapa, ptosimopappa*).

Le mécanisme réactionnel entre les antioxydants et le DPPH dépend de la conformation structurale des antioxydants (**Sharififar et al, 2009 ; Rebey, 2017**). Selon (**Hayes et al, 2011 ; Enneb, 2015**). L'activité antioxydante dépend généralement du nombre et de la position des groupements hydroxyles par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels.

Différentes études ont montré que l'espèce *Centaurea* constitue une source potentielle d'antioxydants naturels (**Aktumsek, 2011 ; Torres-González, 2011, Hajimehdipoor, 2014**). En effet, certains constituants des extraits des espèces *Centaurea* agissent comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène.

III.2 Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits

III.2.1 Méthode des disques

L'activité antibactérienne des extraits à une concentration de 20 mg/ml a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des souches de bactéries de références : (02) souches de bactéries Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) et (02) souches de bactéries Gram (-) (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Les diamètres des zones d'inhibition par les extraits (méthanolique, aqueux et acétonique) de racines de *Centaurea africana* sont compris entre 11±0.81 à 18 mm (**Tableau 14 et Photo 7**) et sont supérieurs au diamètre limite de la zone d'inhibition (10 mm), en dessous duquel un extrait est considéré inactif (**Tekwu et al, 2012 ; Ouattara et al, 2016**). Par conséquent, tous les extraits testés ont montré une efficacité vis-à-vis des souches utilisées.

Le DMSO a été utilisé pour améliorer la solubilisation des extraits étudiés, l'absence d'effet du DMSO sur les bactéries étudiées à la concentration utilisée est donc vérifiée.

Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne

Souches bactériennes	Diamètre moyen des zones d'inhibition (mm)			
	Bactéries Gram positif		Bactéries Gram négatif	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
Extrait méthanolique	14,33 ±0,94	11,33±0,47	15,66±0,47	12,047
Extrait aqueux	12,33± 0,47	17,33±0,47	20,33±0,47	12,66±0,94
Extrait acétonique	13±0,81	11±0,81	18±0,47	13,33±0,94

Pseudomonas aeruginosa semble être l'espèce la plus sensible à l'extrait aqueux et acétonique avec des valeurs des zones d'inhibition de 20,33 ± 0,47mm et 18±0.47 mm de diamètre respectivement. L'extrait méthanolique a manifesté une activité modérée sur *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 15,66 ± 0,47mm. En revanche l'extrait méthanolique a présenté une meilleure activité vis-à-vis de *staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition égal à 14,33 mm ; Toutefois, Les résultats ont montré que *Bacillus subtilis* à Gram positif était la souche la plus sensible à l'extrait aqueux. Cependant, les souches d'*E.coli*, montrent une légère sensibilité à l'encontre de tous les extraits testés, les diamètres relevés à cet effet varient entre 12,04 et 13,33 mm.

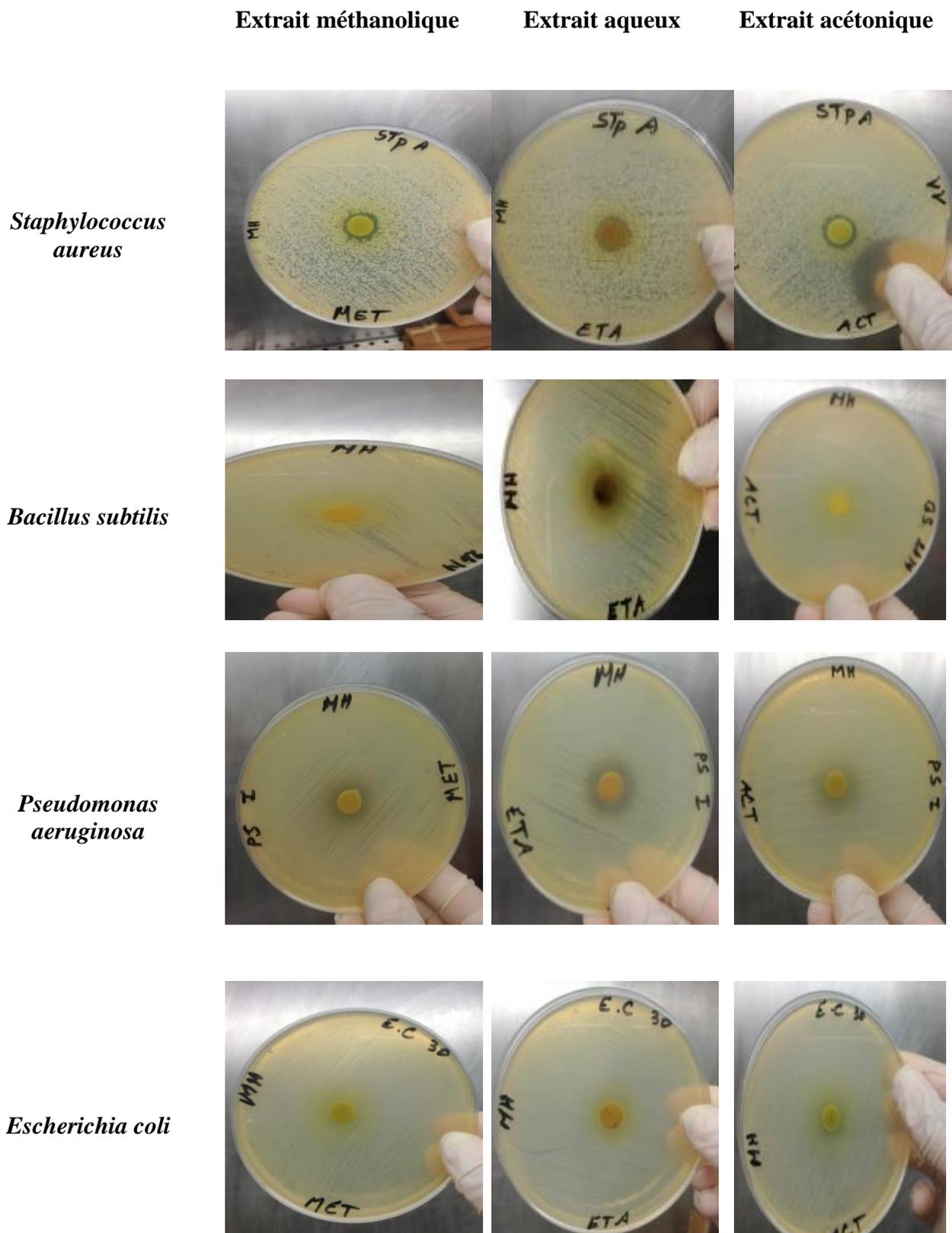


Photo 7 : Zones d'inhibition obtenues par les extraits méthanoliques, aqueux, et acétonique de *Centaurea africana* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Les résultats de la présente étude ont montré que tous les extraits des racines de *Centaurea africana* ont montré une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes aussi bien sur les bactéries à Gram (+) que Gram (-). Nos résultats corroborent ceux obtenus par **(Gokbulut, 2013 ; Paliwal, 2016)** qui ont mis en évidence une activité antibactériennes significatives contre les souches bactériennes Gram positives et Gram négatif.

Contrairement, au rapport de **(Basli et al, 2012)**, qui suggèrent que les extraits végétaux sont plus actifs contre les bactéries Gram (+) par rapport aux bactéries Gram (-), nous avons noté une meilleure activité des extraits étudiés sur *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité antimicrobienne pourrait être attribuée à la présence des métabolites secondaires (flavonoïdes, acides phénoliques et diterpènes), qui peuvent agir seuls ou en synergie pour l'inhibition de la croissance bactérienne **(Amber, 2017)**.

Les résultats obtenus sont dans l'ensemble comparables à ceux déjà publiés par **(Tekeli, 2011)** sur les mêmes espèces végétales de *Centaurea* (*C. balsamita*, *C. calolepis*, *C. Cariensis subsp. Maculiceps*, *C. cariensis subsp. Microlepis*, *C. kotschyi var. Kotschyi*, *C. solstitialis subsp. Solstitialis*, *C. urvillei subsp. Urvillei* et *C. virgata*), qui possèdent une activité antibactérienne à l'encontre de plusieurs micro-organismes.

III.2.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), de la concentration minimale bactéricide (CMB) et rapport CMB/CMI :

Les résultats des CMI et des CMB des extraits des racines de *Centaurea africana* sur les différentes souches bactériennes de références sont consignés dans le **Tableau 16**. Par ailleurs, le rapport CMB/CMI a permis de déterminer les pouvoirs bactéricide et bactériostatique des extraits végétaux. Selon, **Marmonier, 1990** lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'extrait est dit bactériostatique et quand il est inférieur à 4, il est dit bactéricide.

Tableau 15 : Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide (mg/ml) et rapport CMB/CMI des extraits des racines de *Centaurea africana*

Extrait méthanolique				
Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Action
<i>S aureus</i>	10	10	1	Bactéricide
<i>B subtilis</i>	10	7,5	0,75	Bactéricide
<i>P. aeruginosa</i>	0,625	2,5	4	Bactériostatique
<i>E coli</i>	10	0	/	/
Extrait aqueux				
Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Action
<i>S aureus</i>	10	7,5	0,75	Bactéricide
<i>B subtilis</i>	10	3.75	0,375	Bactéricide
<i>P. aeruginosa</i>	0,31	2,5	12,09	Bactériostatique
<i>E coli</i>	10	0	/	/
Extrait acétonique				
Souches	CMI	Souches	CMB/CMI	Pouvoir
<i>S aureus</i>	5	7,5	1,5	Bactéricide
<i>B subtilis</i>	10	3,75	0,375	Bactéricide
<i>P. aeruginosa</i>	0,31	0,93	3	Bactéricide
<i>E coli</i>	5	0	/	/

Les résultats des CMI (mg/ml) des extraits par l'essai en microplaques de 96 puits sont présentés dans le **Tableau 15**. Les valeurs des CMI variaient selon les souches microbiennes de 0,31 à 20 mg/ml (**Tableau 15**).

Selon la classification d'**Aligiannis et al (2001)**, qui ont quantifié l'activité biologique des produits naturels sur la base des résultats obtenus dans le test CMI : (l'activité antimicrobienne est considérée forte entre 0,05 – 0,50 mg/ml, modérée entre 0,6 – 1,50 mg/ml et faible pour des valeurs supérieures à 1,6 mg/ml). En tenant compte de cette classification, tous les extraits ont présenté une faible activité envers les souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* avec des CMI \geq à 5.

En revanche, l'extrait aqueux et acétonique ont manifesté une importante activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa* avec des CMI identiques de l'ordre de 0,325,

suivie par l'extrait méthanolique avec une activité antimicrobienne modérée de l'ordre de 0,625.

Il ressort de ces résultats que l'efficacité antimicrobienne des extraits de plantes étudiées est fortement influencée par le solvant d'extraction. Ceci semble être en accord avec des études menées antérieurement (**Moubayed et al, 2017**).

En général, toutes les souches testées ont été inhibées par les différents solvants utilisés mais l'extrait acetonique exerce l'activité antimicrobienne plus constante et la plus importante comparativement à l'extrait aqueux et à l'extrait méthanoliques. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Aneja (2012)** et **Mohan (2016)**. Néanmoins, le type de solvant n'est pas le seul facteur à prendre en considération dans l'efficacité antimicrobienne des extraits végétaux, mais aussi les espèces végétales et le microorganisme d'essai (**Mathew et al, 2016**).

Les résultats ont montré que les microorganismes qui ont présenté les plus grandes zones d'inhibition ne sont pas toujours celles qui ont montré des valeurs de CMI les plus basses. Résultats similaires à ceux **Al Namer (2014)**.

Le diamètre de la zone d'inhibition ne reflète pas l'efficacité antibactérienne d'un produit, il peut être affecté par la solubilité et la diffusion de l'extrait. Par ailleurs, le rapport CMB/CMI a permis de déterminer les pouvoirs bactéricides et bactériostatiques des extraits végétaux, selon les travaux de (**Marmonier, 1990**), qui stipule que lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'extrait est dit bactériostatique quand il est inférieur ou égal à 4, il est dit bactéricide.

Ces résultats nous permettent donc d'affirmer que chaque extrait a manifesté un pouvoir bactéricide contre *Staphylococcus aureus* et *B subtilis*. Cependant, ces extraits ont révélé un pouvoir bactériostatique vis à vis de *Pseudomonas aeruginosa* à l'exception de l'extrait acetonique qui a présenté un effet bactéricide sur cette souche.

III.3 Résultats de l'activité hémostatique

Dans une première étape, l'évaluation *in vitro* de la capacité hémostatique locale des extraits par l'estimation du temps de coagulation des extraits bruts, a montré une importante variabilité en fonction de la nature du solvant utilisé pour l'extraction (**Tableau 16**).

L'étude de l'effet hémostatique de l'extrait acétonique sur différents volumes (10, 20, 50 et 100 μ l), a révélé des temps de coagulation très proches les uns des autres ($4,07 \pm 0,20$; $4,55 \pm 0,05$; $4,56 \pm 0,25$, $12 \pm 0,23$ mn) mais également de celui du témoin ($4,07 \pm 0,20$). Ceci permet de conclure à l'absence d'activité coagulante de l'extrait acétonique. En revanche, des volumes de 100 μ l des deux extraits méthanolique et aqueux induisent une diminution significative du temps de coagulation de sang humain *in vitro* en tube ($p < 0,05$) avec respectivement des valeurs de l'ordre de $1,09 \pm 0,04$ mn et $3,65 \pm 0,042$.

Tableau 16 : Temps de coagulation du sang humain en tube en présence des extraits de racines sèches de *Centaurea africana* en minutes

Extraits	Volume de l'extrait (en μ l)				
	Témoin	10 μ l	25 μ l	50 μ l	100 μ l
	Temps de coagulation (moyenne \pm SD en minutes)				
Acétonique	4.07 \pm 0.20	4.55 \pm 0.05	4.56 \pm 0.21	5.12 \pm 0.23	7.20 \pm 0.08
Aqueux		4.00 \pm 0.014	3.81 \pm 0.049	3.7 \pm 0.084	3.65 \pm 0.042*
Méthanolique		2.52 \pm 0.025	2.42 \pm 0.025	2.27 \pm 0.025	1.09 \pm 0.04*

$p < 0.05$ (n=5)*.

Dans une seconde étape, les résultats de l'étude du pouvoir hémostatique *in vivo* sur des rats traités par les extraits méthanolique et aqueux ont révélé un effet hémostatique significativement élevé ($P < 0,05$) par rapport aux rats témoins avec un temps d'arrêt de saignement de l'ordre de $1,41 \pm 0,12$; $2,31 \pm 0,09$ et $4,31 \pm 0,09$ respectivement (**Tableau 17**). Par contre, aucune activité *in vivo* n'a été détectée pour l'extrait acétonique. Les rats traités par cet extrait ont montré un temps d'arrêt de saignement significativement plus long ($P < 0,05$) par rapport aux autres lots et presque identique à celui des témoins de l'ordre $4,30 \pm 0,13$ minutes, démontrant l'absence d'activité hémostatique.

Tableau 17 : Résultats du temps de coagulation du sang *in vivo* sur le groupe contrôle et les groupes traités par les extraits méthanolique, acétonique et aqueux (Moyenne \pm SD).

	Témoin	Extrait méthanolique	Extrait acétonique	Extrait aqueux
Essai 1	4.30	1.46	4.30	2.30
Essai 2	4.24	1.37	4.29	2.23
Essai 3	4.27	1.4	4.43	2.19
Essai 4	4.35	1.55	4.38	2.35
Essai 5	4.16	1.44	4.10	2.41
Essai 6	4.41	1.29	4.47	2.44
Essai 7	4.28	1.38	4.19	2.28
Moy \pm SD	4.31 \pm 0,09	1.41 \pm 0,12*	4.30 \pm 0,13	2.31 \pm 0,09*

$p < 0.05$ (n=8)*

Les résultats obtenus dans les deux modèles expérimentaux ont rapporté un temps de coagulation considérablement réduit avec les extraits méthanolique et aqueux par rapport aux lots témoins ($p < 0,05$). Ces mêmes extraits se sont montrés plus actifs *in vivo* par application locale des trois extraits sur les incisions provoquées avec une diminution significative du temps d'arrêt de saignement des rats traités par rapport aux rats témoins ($p < 0,05$).

In vivo, le pouvoir coagulant est lié à l'activation en chaîne des facteurs de la coagulation (XII et X). L'activation aboutit à la formation de thrombine, enzyme protéolytique qui va transformer le fibrinogène circulant en fibrine, constituant principal du caillot. (Versteeg, 2013 ; Palta, 2014). De plus, en cas de lésion vasculaire, le déclenchement de l'hémostase se manifeste par une vasoconstriction, réflex initiée par adhésion des plaquettes sanguines au site de la lésion. Les plaquettes sont ensuite activées et agrégées afin de former un clou plaquettaire relativement lâche qui nécessite, en fonction du diamètre du vaisseau endommagé, une consolidation ultérieure par un réseau de fibrine. (Fazavana, 2014).

Ghedadba et al (2014) ont parvenu à des observations et des conclusions similaires lors de l'évaluation de l'activité hémostatique *in vitro* des extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* appartenant à la famille des astéracées. Ils ont ainsi mis en évidence une corrélation entre les teneurs en composés polyphénoliques et la capacité coagulante de l'extrait *in vitro*. D'autres travaux réalisés par Klotoe (2013) ont étudié le pouvoir hémostatiques des extraits de différents composants végétaux et ont attribué l'initiation d'un mécanisme de coagulation aux saponines influençant l'agrégation plaquettaire. De plus, les flavonoïdes et les tanins sont

aussi connus pour leur nature astringente favorisant la vasoconstriction en arrêtant le saignement (**Dougnon.2012**) (**Photos 8**).

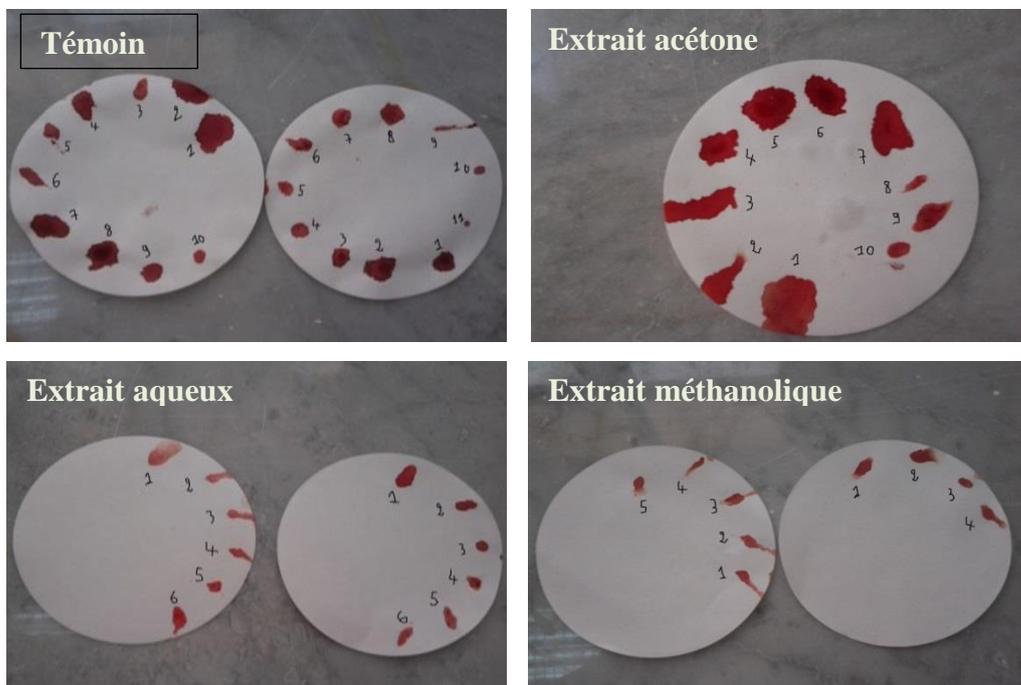
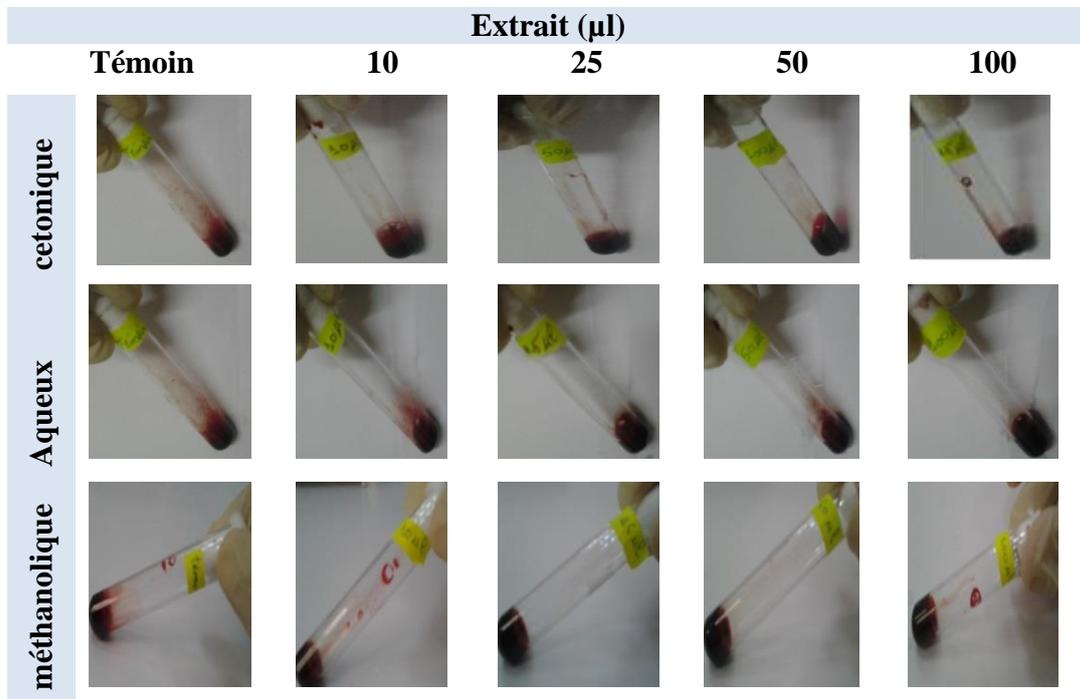


Photo 8 : Résultats des temps de coagulation du sang *in vivo* des trois extraits de *Centaurea africana*.

III.4 Activité antiulcéreuse

III.4.1 Activité protectrice de la muqueuse gastrique

Le modèle expérimental de la lésion gastrique induit par l'éthanol reproduit plusieurs caractéristiques de la pathologie humaine et permet l'évaluation de l'activité antiulcéreuse de diverses substances ainsi que leurs mécanismes de protection gastrique.

L'administration par gavage de la solution (HCL /Éthanol-Eau) (**Photos 9**) a induit des lésions caractéristiques dans la partie glandulaire de l'estomac avec altérations vasculaires marquée par des points et des sillons hémorragiques. L'induction expérimentale *in vivo* de l'ulcère (acide / alcool) a été largement utilisée comme modèle pour la mise en évidence des effets gastro-protecteurs de produits naturels (**Miranda et al, 2015 ; Songklanakarinn, 2016**). Les dommages gastriques induit par le mélange de HCl / EtOH, implique l'irritation directe de la muqueuse gastrique associée habituellement à la réduction de la résistance et à l'érosion de la barrière muqueuse qui à son tour réduit les facteurs défensifs comme la sécrétion de bicarbonate et la production de mucus (**Al Rashdi ,2012**). Ces effets sont probablement attribuables à des actions biologiques telles que la peroxydation lipidique, la formation de radicaux libres, le stress oxydatif intracellulaire, les changements de perméabilité et la dépoliarisation de la membrane mitochondriale avant la mort cellulaire (**Moraes de Carvalho et al, 2010**).

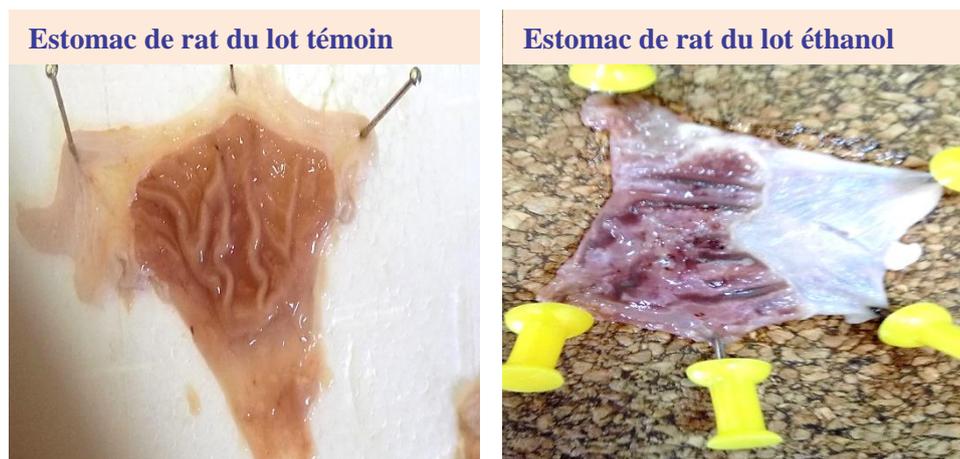


Photo 9 : Aspect macroscopique de la muqueuse gastrique des lôts témoin et traité à l'éthanol.

L'administration des extraits de racine de *Centaurea africana* et de l'antiulcéreux de référence (Ranitidine) une heure avant le mélange éthanol-HCl-eau distillée, a permis une diminution significative des ulcérations gastriques par rapport au traitement témoin. Les trois extraits ont également induit une inhibition dose-dépendante des ulcérations gastriques (Tableau 18).

Tableau 18 : Activité protectrice de la muqueuse gastrique des extraits méthanolique, aqueux et acétonique des racines de *Centaurea africana* sur les ulcères gastriques induits par le mélange éthanol-HCl-eau chez les rats mâles.

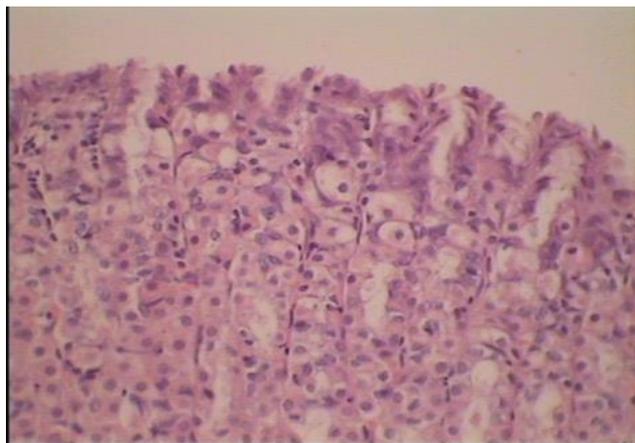
Traitements	Doses (mg/kg)	(IU ± E)	Pourcentage de Protection (%)
Témoin	0	3.33±0.57	-
Extrait méthanolique	100	2.3±0.57*	25.4% *
	200	1.2±0.27**	60.4% *
	300	1±0	68.4*
Extrait acétonique	100	2.6±0.37*	15.4% *
	200	2.0±0.27*	36.4% *
	300	1.4±0.27	56.7% *
Extrait aqueux	100	2.4±0.35*	24% *
	200	2.1±0.94*	35.4% *
	300	1.2±0.32	60.4% *
Ranitidine	150	1,6±0.54**	46.7% *

(IU) ; Indice d'ulcération ; N= 6 rats par groupe ; Les résultats sont exprimés en moyenne de l'indice d'ulcère plus ou moins SEM (IU) ± (E), La significativité est exprimée avec *P<0,05 ; Très significatif avec **P<0.01 ; t-test de Student (comparé au groupe témoin traité avec le véhicule).

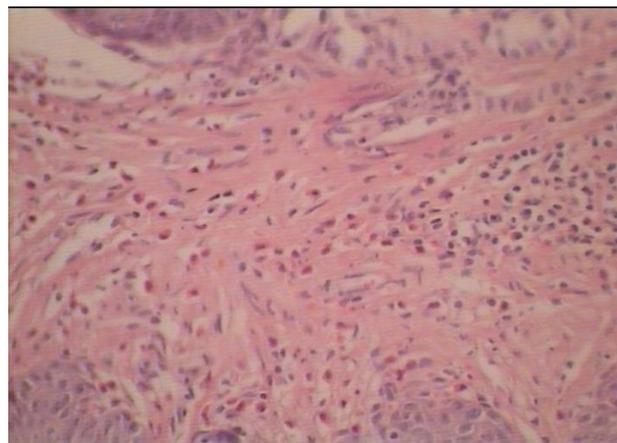
Les rats traités par l'extrait méthanolique ont présenté l'indice d'ulcère le plus faible avec une diminution très significative du score d'ulcère par rapport au rat témoin et un pourcentage de protection de la muqueuse gastrique plus important contre les agents irritants de l'ordre de 60.4% à la dose de 200 mg/kg et 68.4 % à la dose de 300 mg/kg suivi par le lot des rats traités par le produit de référence Ranitidine avec un pourcentage de protection de 46.7%.. Il a également été constaté une diminution significative (p<0,05) des ulcérations chez les rats qui ont reçu un traitement par les extraits aqueux et acétonique une heure avant l'administration du mélange ulcérogène avec des taux de protection allant de 15.4% à la dose de 100 mg/kg, 36.4% à la dose de 200 mg/kg et 56,7 % à la dose de 300 mg/kg pour l'extrait acétonique. Et

un pourcentage de protection de 24 % à la dose de 100 mg/kg, 35,4% à la dose de 200 mg/kg et 60,4 % à la dose de 300 mg/kg pour l'extrait aqueux. En revanche aucun rat témoin n'a totalement guéri des ulcérations.

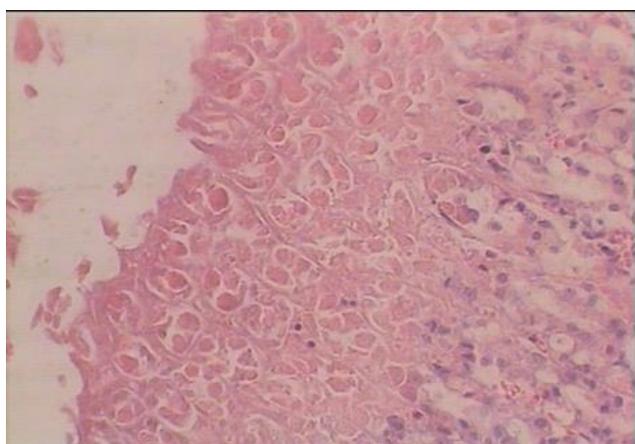
L'activité cytoprotectrice des différents extraits a été par ailleurs confirmée par l'analyse histologique. Aucune lésion n'a été observée dans les sections des tissus gastriques des rats du lot témoin ayant reçu une solution d'eau physiologique (**Figure 18.f**). Alors que les rats traités avec la solution ulcérogène (HCL/éthanol/eau d'ulcère) a montré des dommages importants au niveau de la muqueuse gastrique (**Figure 18. e**) avec notamment des phénomènes ulcératifs caractérisés par une congestion de la muqueuse gastrique, un œdème et une perte totale de substance siégeant au niveau de l'épithélium, ainsi que par la présence de cellules inflammatoires. Les rats traités avec les différents extraits (**Figure 18. a.b.d**) à la dose de 300 mg/kg, ont montré un léger œdème avec la présence de quelques cellules inflammatoires. La présence de fibres de collagène confirme que la muqueuse gastrique est en phase de cicatrisation. Cet aspect était assez similaire à celui des rats traités par le produit antiulcéreux de référence (Ranitidine) (**Figure 18.c**).



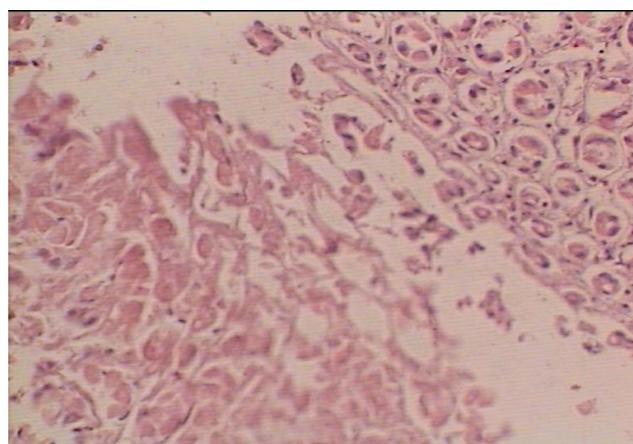
(a) Extrait méthanolique (G× 40)



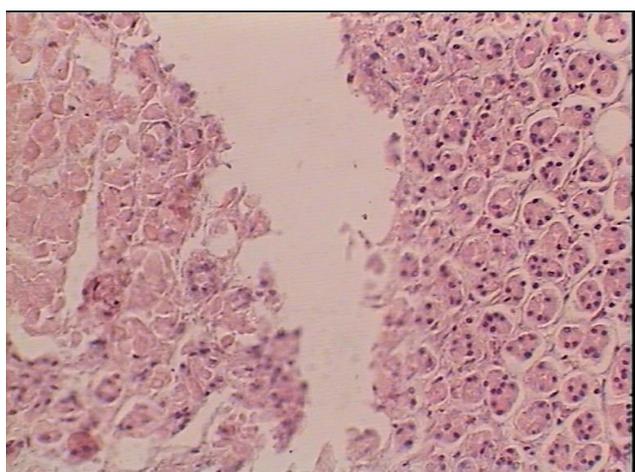
(b) Extrait aqueux (G× 40)



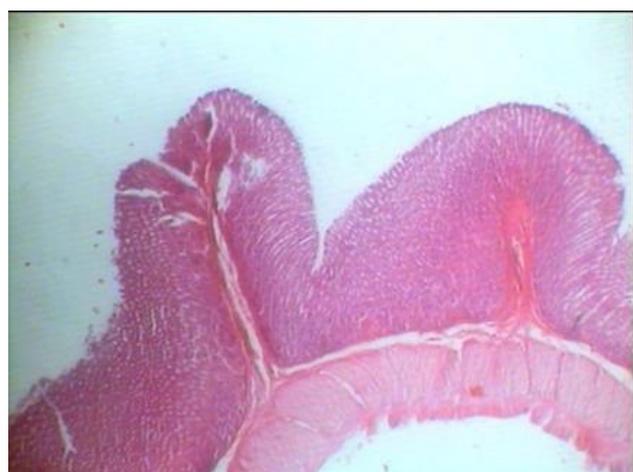
(c) Ranitidine (G × 40)



(d) Extrait acétonique (G × 40)



(e) HCL/éthanol/eau (G × 40)



(f) Solution véhicule (G × 10)

Figure 18 : Évaluation histopathologique des sections de tissu gastrique des rats traités par les différents extraits (300 mg/kg), le produit de référence Ranitidine (150 mg/kg), du lot témoin positif traité avec la solution HCL/éthanol/eau et du lot des rats témoins

Ces actions bénéfiques seraient médiées, au moins en partie, par les actions antioxydantes de *Centaurea africana* et probablement par l'amélioration des défenses antioxydantes cellulaires gastriques (Arab, 2015). En effet, le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogenèse de diverses maladies, y compris dans celle de l'ulcère gastrique et les antioxydants jouent un rôle important dans la protection de la muqueuse gastrique contre divers agents nécosants (Bardi, 2011). Les antioxydants pourraient aider à protéger les cellules des dommages causés par le stress oxydatif et à améliorer les systèmes de défense du corps contre les maladies dégénératives. Il a été démontré que l'administration d'antioxydants inhibe les lésions gastriques induites par l'éthanol chez le rat (Sathish, 2011).

De nombreux travaux ont révélé que les phytoconstituants comme les flavonoïdes, les tanins, les terpénoïdes ou encore la saponine étaient responsables des effets gastro-protecteurs (Kabera, 2014; Majeed, 2015) par la capacité de ces composés actifs de stimuler la sécrétion de mucus, de bicarbonate et de prostaglandine et de neutraliser les effets dégradants des oxydants réactifs dans la lumière gastro-intestinale. D'autres travaux, ont confirmé les activités gastro-protectrices de plusieurs espèces du genre *Centaurea solstitialis* (Gurbuz, 2007); *Centaurea chamaerhaponticum* Ball (Bakhtaoui, 2014); *Centaurea cyanus* L. (Pirvu, 2015); *Centaurea solstitialis* L. ssp (Gurbuz, 2007). Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré que les sesquiterpene lactones, omniprésents dans le genre *Centaurea*, avaient un pouvoir anti-ulcérogène (Chaturvedi, 2015; Shoaib, 2017; Kolli, 2012; Tešević, 2014).

I. Contrôle de la pommade formulée

IV.1 Détermination potentiométrique du pH

Les résultats de la variation du pH durant cinq jours de suite en triplicat sont consignés dans le Tableau 20.

Tableau 19 : Mesure de la variation du pH pendant 5 jours de suite.

Jours	Valeur moyenne \pm écart type du pH de la formulation 5%	Valeur moyenne \pm écart type du pH de la formulation 10%
J1	5.28 \pm 0.21	5.48 \pm 0.15
J2	5,13 \pm 0.16	5.19 \pm 0.35
J3	5,63 \pm 0.62	5.61 \pm 0.42
J4	5,48 \pm 0.42	5.30 \pm 0.26
J5	5,83 \pm 0.12	5.88 \pm 0.14

Les valeurs du pH de la formulation varient de 5.13 à 5.83 pour la pommade à la concentration de 5% et de 5.19 à 5.88 pour la pommade à la concentration de 10%. Ces valeurs suggèrent que le pH des deux préparations (5 et 10%) de l'extrait méthanolique de racines de *Centaurea africana* sont compatibles avec l'usage dermique puisqu'elles sont proches de celui de la peau (**Ivan A. Ross ; 2001**).

Le pH d'une peau en bonne santé est d'environ 5,5. L'acidité cutanée est une caractéristique importante de la peau, et l'on observe que quasiment toutes les phyto-dermatoses sont accompagnées d'une alcalinisation. Le pH cutané est variable selon les individus et les zones corporelles. Il est influencé par divers facteurs : il augmente avec l'âge, il est plus alcalin chez les femmes, il augmente enfin avec divers facteurs extérieurs comme le lavage par des détergents. Le pH cutané est également régulé par l'excrétion sudorale (**Martin, 2006**).

IV.2 Caractères

IV.2.1 Aspect / Couleur

Les résultats obtenus lors de contrôle organoleptique du produit fini, ont rapporté pour les deux concentrations, une pommade de consistance molle, d'aspect homogène et onctueux au toucher, de couleur jaunâtre induite par la couleur de l'extrait -méthanolique dissous.

IV.3 Test de l'homogénéité

IV.3.1 Test macroscopique

L'étalement de la pommade formulée à 5 et 10% en couches minces sur une surface plane à l'aide d'une spatule n'a montré aucune formation de grumeaux ou de présence de bulles ni de séparation cristalline du principe actif. Les préparations se sont montrés parfaitement propres, uniformes et homogènes (**photo 10**)



Photo 10 : Etalement de la pommade® formulé sur surface plane.

IV.3.2 Test de centrifugation

La centrifugation des pommades à 5 et 10% pendant 10 mn à une vitesse de 1500 trs/mn, n'a montré aucun phénomène de floculation (**Photo 11**). Aucun changement de la forme et d'aspect n'a été constaté avant et après la centrifugation de l'échantillon.



Photo 11 : L'échantillon de pommade après le test de centrifugation.

IV.3.3 Test microscopique

L'extrait méthanolique de racines de *Centaurea africana* dans les échantillons présentent des vésicules de diamètres variant entre 0,5 et 1 μm . Elles sont bien dispersées, proches les unes des autres et d'aspect homogène (**Photo 12 et 13**).

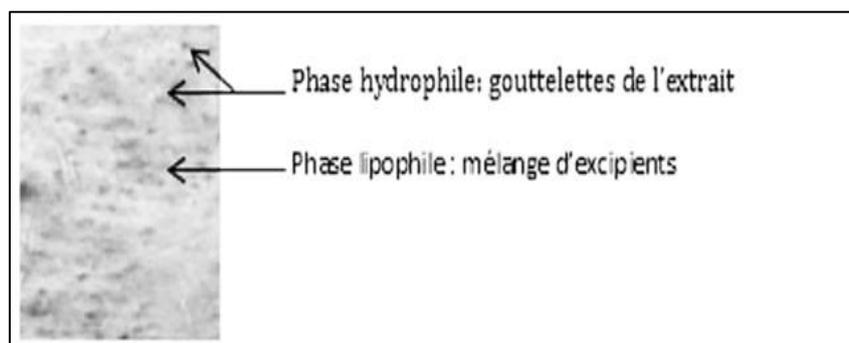


Photo 12 : Observation microscopique de la pommade formulée (Gx40)

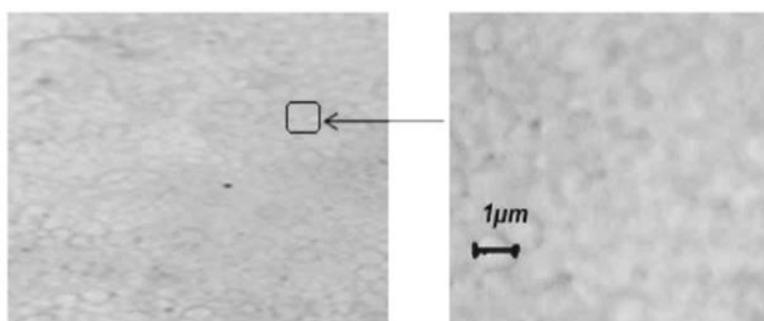


Photo 13 : Observation microscopique de pommade formulée (Gx100)

Les résultats ont montré que le type d'émulsion de la pommade[®] formulée à 5 et 10% est hydrophile dans lipophile (H/L). La partie lipophile (mélange d'excipients) constitue la phase externe et la partie hydrophile (extrait méthanolique de racine de *Centaurea africana*) en forme la phase interne. Cette émulsion se présente sous forme de préparation opaque de base. Cela permet d'avoir une pommade non conductrice du courant électrique, non lavable à l'eau et qui laisse un film résiduel gras sur la peau après application (**Toé, 2004**). L'utilisation de viscosifiant alcool cétylique (C_{16}) comme un facteur de consistance a participé au maintien de l'homogénéité, la stabilisation et à ralentir la mise à l'interface de l'extrait avec la phase grasse (**Puisieux, 1989 ; Leblanc et al. 1997 ; Le Hir, 2005**).

IV.3.4 Test de limpidité

La membrane filtre n'a retenu aucune particules inerte (**Photo 14**), par conséquence la pommade formulée est limpide, témoignant de la bonne qualité des matières premières utilisées (extrait et excipients).



Photo 14 : Filtration de pommade.

IV.3.5 Tests d'influence de l'air et de la température

Après une semaine d'exposition d'une quantité de pommade formulée à 5 et 10% à l'air libre, température ambiante dans les conditions de laboratoire, les échantillons ont gardé la même forme et les mêmes caractères organoleptiques. Selon, **Denine (2008)**, la température et les conditions atmosphériques sont considérées parmi les facteurs externes influençant la stabilité d'une pommade, car la température accélère et favorise toutes les réactions chimiques ou biologiques, en provoquant des changements d'état physique, et favorise également le développement des micro-organismes. L'air atmosphérique est considéré comme le grand facteur d'altération et bien entendu l'humidité est dans la majorité des cas le support de toutes les altérations.

V Evaluation toxicologique

La toxicité aiguë et la détermination de la DL50 a t été décrite comme l'étape initiale des évaluations toxicologiques des extraits végétaux (**Oladipipo et al, 2016**) et les données de ces évaluations fournissent des informations complètes sur la classification toxicologique et l'étiquetage de ces composés (**Ozbek et al, 2004**).

V.1 Toxicité aiguë administrée par voie orale

Aucun signe clinique de toxicité ni de mortalité n'a été observé pendant les 14 jours d'observation, ce qui permet d'estimer que la toxicité aiguë de l'extrait alcoolique (méthanol 80/Eau : 80/20) lyophilisé obtenu par la macération de poudre de racine de *Centaurea africana* est supérieur à 2 g/kg.

V.2. Toxicité aiguë administrée par voie cutanée

L'épreuve limite avec une dose de 2g /kg de poids corporel de l'extrait alcoolique (méthanol 80/20 Eau) lyophilisé obtenu par la macération de poudre de racine de *Centaurea africana* appliquée sur la peau des rats n'a montré aucun signe de toxicité ou de lésion cutanée au cours des 14 jours d'observations. En conséquence, notre extrait est peu ou pas toxique en application topique.

Ces valeurs les places dans la catégorie V selon la classification de la toxicité aiguë de **(OCDE, 2001)**, qui comporte cinq catégories (allant de hautement toxique : catégorie I à non toxique : catégorie V) et permet par conséquent de le qualifier de produit peu ou pas toxique par voie orale en prise unique.

Selon le Système général harmonisé **(SGH, 2011)** de classification et d'étiquetage des produits chimiques, les substances ayant une valeur DL50 supérieure à 2000 mg / kg sont considérées comme relativement sûres. Dans certaines études, les valeurs LD50 des extraits d'herbes thérapeutiques ont été trouvées supérieures à 2000 mg / kg, et selon le critère du SGH, ces extraits ont été considérés comme raisonnablement sûrs en cas d'exposition aiguë **(Konan et al, 2007)**

V.3 Évaluation de la tolérance locale

L'évaluation de la tolérance cutanée par recherche d'une réaction cutanée, de la présence d'érythème et œdème, a été évaluée et quantifiée sur une zone préalablement scarifiée et sur zone intacte, selon l'échelle numérique proposée par le « **Journal Officiel de la République Française** » (Tableau 20 et 21).

Tableau 20 : Indice d'irritation primaire de la pommade formulé à 10 % et pommade véhicule.

Lot	N° du lapin	Flanc traité				Flanc témoin			
		Oedème		Érythème		Oedème		Érythème	
		J1 (24h)	J3 (72h)	J1 (24h)	J3 (72h)	J1 (24h)	J3 (72h)	J1 (24h)	J3 (72h)
Pommade à 10%	L1	0	0	0	0	0	0	0	0
	L2	0	0	1	0	0	0	1	0
	L3	0	0	0	0	0	0	1	0
	L4	0	0	1	0	0	0	1	0
	L5	0	0	0	0	0	0	0	0
	L6	0	0	1	0	0	0	0	0
Véhiculée	L1	0	0	0	0	0	0	0	0
	L2	0	0	0	0	0	0	0	0
	L3	0	0	1	0	0	0	1	0
	L4	0	0	1	0	0	0	0	0
	L5	0	0	0	0	0	0	1	0
	L6	0	0	1	0	0	0	1	0

Pour les différents lots extraits, on note la présence d'érythème avec une diminution nette après 72 heures d'observation. Cependant, aucun œdème pour l'ensemble des lots n'a été observé durant toute la période d'expérimentation.

Tableau 21 : L'indice d'irritation primaire de la pommade formulé à 10 % et pommade véhicule.

Lot	N° de lapin	Œdème + Érythèmes (24h + 72h) Flanc traité	Œdème + Érythèmes (24h + 72h) Flanc témoin
POMMADE 10%	1	0	0
	2	1	1
	3	0	1
	4	1	1
	5	0	0
	6	1	0
	Valeurs cumulées	3	3
VEHICULE	1	1	0
	2	0	0
	3	1	1
	4	1	0
	5	0	1
	6	1	1
	Valeurs cumulées	4	3

L'indice d'irritation primaire a été calculé à partir de l'équation suivante (**Tableau 22**)

$$IP = (\text{Œdème} + \text{Érythèmes}) \text{ Flanc traité} + (\text{Œdème} + \text{Érythèmes}) \text{ Flanc témoin} / 24$$

24 = nombre de lapin (6) × nombres de zones testées (traité et témoin = 2) × nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2)

Tableau 22 : L'indice d'irritation primaire de la pommade formulé à 10 % et pommade véhicule

Lots	IP	Observation
Pommade 10 %	4+3 /24 = 0,29	< 0.5 produit non irritant
VEHICULE	3+3 /24 = 0,25	< 0.5 produit non irritant

L'indice d'irritation primaire IP est < 0.5 pour la pommade à 10 % et le véhicule. Donc selon l'échelle numérique de **Draize**, les deux préparations sont non irritantes pour la peau.

V.2.4 Toxicité subchronique

Les essais de toxicité à long terme pourraient fournir des données sur les effets toxiques persistants ou cumulatifs sur les systèmes d'organes cibles, la relation dose-réponse et aussi sur la dose sans effet nocif observé (**OCDE, 2008**).

L'évaluation de la toxicité subchronique a été menée afin de déterminer les éventuels effets toxicité pouvant survenir après une administration réitérée de l'extrait méthanolique de racine de *Centaurea africana* par exposition orale et cutané.

Aucun trouble du comportement n'a été observé chez les lots d'animaux recevant une concentration de 1 g/kg. En revanche, des hyperexcitations ont été notées chez certains animaux des lots traités par voie orale, qui disparaissent 2 à 3 heures après l'administration du produit à tester, le taux de mortalité est nul pour l'ensemble des lots étudiés.

Les résultats des pesées hebdomadaires tout au long de la durée de l'expérimentation (28 jours) sont consignés dans le **Tableau 23** et ont permis de suivre l'évolution pondérale des animaux traités et témoins.

Les valeurs pondérales moyennes des animaux des lots traités par les deux voies d'administration sont comparables à celle des animaux du lot témoin pendant les 4 semaines de l'étude. Ainsi, il semble que l'administration de l'extrait méthanolique à la concentration de 1g/kg *per os* et cutanée n'affecte pas l'évolution du poids corporel des rats.

Le changement du poids est un indicateur des effets indésirables des composés chimiques (**El Hilaly et al, 2004**). Ainsi, la perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal et peut être expliquée, non seulement par l'anorexie (**Betti et al, 2012**), mais aussi par l'altération du métabolisme des animaux (**Mukinda et al, 2007**).

Tableau 23 : Valeurs moyennes des pesées hebdomadaires (g) des rats témoins et des rats traités par l'extrait méthanolique de racine de *Centaurea africana* par voie orale et cutané

Temps /semaine	Voie orale		Voie cutanée	
	Lot témoin	Lot essais	Lot témoins	Lot essais
Semaine 1	201,00±10,04	197,17±6,71	196,33±4,08	199,83±7,81
Semaine 2	219,33±5,47	221,17±4,40	222,50±6,32	208,00±9,53
Semaine 3	231,33±5,61	233,50±3,08	233,33±4,37	227,33±7,45
Semaine 4	242,00±8,44	245,00±3,74	241,33±3,61	235,67±5,39

V.2.4.1. Paramètres biochimiques et hématologique mesurées

Le bilan rénal sert à dépister un éventuel dysfonctionnement du rein. Il comprend en première approche les examens des paramètres biochimiques (urée, créatinine). Ces valeurs sont restées dans les intervalles de normalités et ne montre aucune différence significative ($P > 0.05$) entre les groupes témoins. En effet, ces paramètres sont des biomarqueurs de néphrotoxicité et ont des valeurs élevées en cas d'altération du mécanisme de la filtration rénale (**Mohsen et al, 2017 ; Manda et al, 2017**).

Les transaminases et PAL sont des biomarqueurs de la fonction hépatique et toute augmentation peut être prise comme un premier signe de lésions cellulaires incluant les nécroses cellulaires hépatiques, l'hépatite, les cirrhoses ainsi que l'hépatotoxicité de certaines drogues (**James et al, 2010**). Dans notre étude, la concentration de ces deux enzymes (ALT et AST) diminue significativement ($P < 0.05$) chez les animaux traités par rapport aux rats témoins, ce qui pourrait suggérer un éventuel effet hépato protecteur de l'extrait méthanolique de la racine de *Centaurea africana*.

Plusieurs études récentes sont en accord avec notre hypothèse et rapportent que les plantes du genre *Centaurea* sont douées de propriété hépatoprotectrice : *Centaurea pallescens* (**Hossam, 2013**) et *Centaurea behen linn* (**Pushplata, 2014**).

De nombreuses substances toxiques sont susceptibles d'altérer le métabolisme lipidique et glucidique. Nos résultats n'ont pas montré de différence significative ($P > 0.05$) entre le lot témoin et les lots traités (**Tableau 24**). De même la fourchette de variation de la protidémie n'a pas permis d'observer une variation significative de la protidémie de J0 à J28 aux doses et voies d'administrations étudiées.

Tableau 24 : Effet de l'extrait méthanolique de racine *Centaurea africana* sur les paramètres biochimiques des rats après 28 jours de traitement par voies orale et cutanée

Paramètres biochimiques	Voie orale		Voie cutanée	
	Lot témoin	Lot essai	Lot témoin	Lot essai
GOT	141.50±19.48	129.66±14.50	172.33±24.97	149.50±20.46
GPT	73.33±13.95	64.50±8.83	85.33±11.98	78.95± 4.57
PAL	159.03±5.11	155.83±7.73	154.48±16.79	151.03±8.46
Glycémie	0.88±0.10	0.83±0.06	0.83±0.06	0.84±0.08
Cholestérol	0.74±0.02	0.75±0.01	0.73±0.03	0.7±20.07
Triglycéride	0.88±0.36	0.67±0.24	0.56±0.04	0.75±0.11
Créatinine	5.50±0.54	5.50±1.04	5.33±0.52	5.17±0.75
Urée	0.40±0.07	0.38±0.05	0.52±0.07	0.47±0.02
Protéine	74.23±2.57	67.30±3.36	71.87±3.95	74.60±3.38

Le système hématopoïétique est l'un des cibles les plus sensibles aux substances toxiques. Il représente un marqueur important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et l'animal, en particulier dans la moelle osseuse dont le rôle est de fabriquer les cellules qui donneront naissance aux éléments figurés du sang qui seront répartis en cellules de la lignée rouge (hématies, réticulocytes), de la lignée blanche (lymphocytes, granulocytes, monocytes) et plaquettes. La proportion de chaque type cellulaire est comprise dans un intervalle déterminé pour chaque espèce. La quantité absolue ou relative des différents types cellulaires peut varier suite à l'exposition à un toxique ou dans les conditions pathologiques. (Kifayatullah, 2015 ; Geraud, 2007).

Le profil hématologique du lot des rats traités et témoins sont présentés dans le **Tableau 25**. Les différents paramètres hématologiques étudiés ne montrent aucun changement significatif ($P > 0,05$) entre les groupes traités et témoin avec l'extrait méthanolique à la dose de 1000 mg/kg. De même l'autopsie a révélé que l'architecture naturelle des différents organes demeure inchangée.

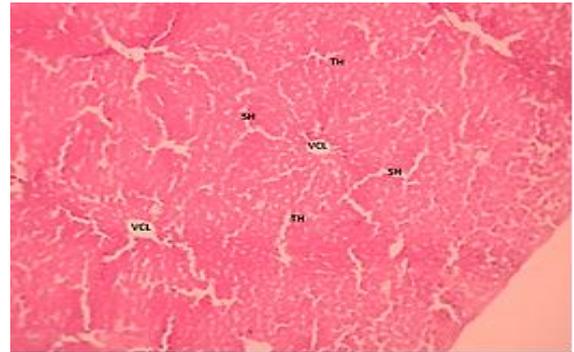
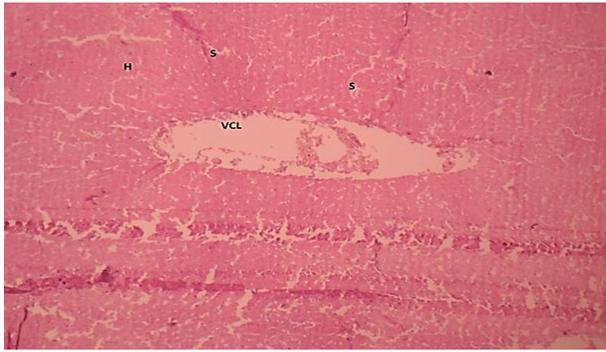
Tableau 25 : Effet de l'extrait méthanolique de racine *Centaurea africana* sur les paramètres hématologiques des rats après 28 jours de traitement par voies orale et cutanée.

Paramètres hématologiques	Voie orale		Voie cutané	
	Lot témoin	Lot essai	Lot témoin	Lot essai
Globule rouge ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	8,12	7	6,3	6,53
Globule blanc ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	13,20	13,07	12,97	13,07
Hématocrite (%)	45,84	43,91	44,72	46,16
VGM (μm^3)		51,7	54,5	56
Eosinophile (%)	2,63	3,01	2,65	2,5
Monocyte (%)	8,16	8,26	9,47	12,19
Lymphocyte (%)	77,80	82,60	68,4	81,7
Basophile (%)	18,90	18,38	21,46	22,18

L'examen histopathologique a porté sur quelques organes cibles (rein, foie et pancréas) des animaux traités par voie orale et les animaux témoins. Les résultats n'ont montré aucune lésion des organes cibles liée à la dose de 1g/kg pour la voie per os et cutanée (**Figure 19**).

Le test de toxicité orale de l'extrait de 28 jours n'a donc eu aucun effet sur l'intégrité de ces organes.

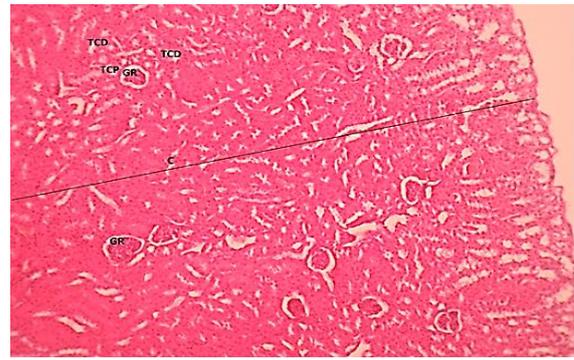
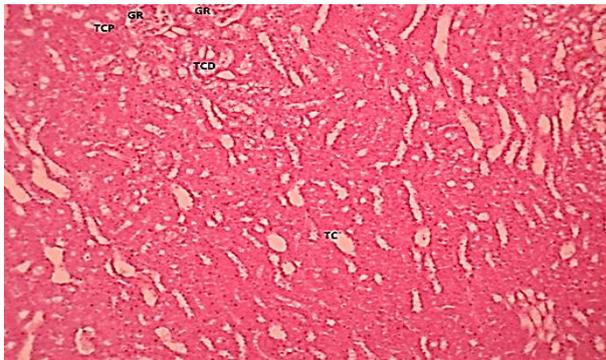
A l'issue des résultats obtenus. L'évaluation des toxicités aiguë et subchronique de l'extrait méthanolique lyophilisé de *centaurea africana* offre une marge de sécurité appréciable d'une part avec une DL50 supérieure à 2g/kg et d'autre part, aucune toxicité remarquable n'a été observée au cours des études de toxicité subchronique par voie orale et cutanée de l'extrait.



H : hépatocyte ; S : sinusoïde ; VCL : veine centrolobulaire ; TH : travée hépatocyttaire ; SH : sinusoïde hépatique

Aspect histologique du tissu hépatique chez le rat témoin

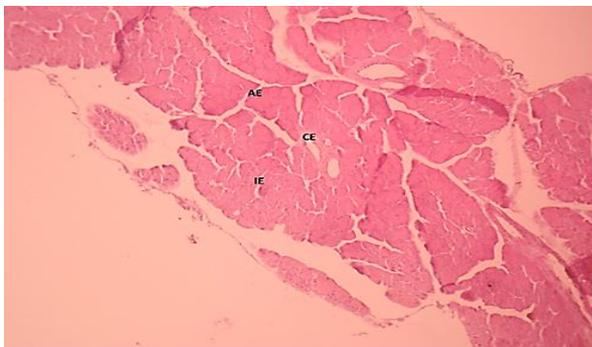
Foie de rat traité par l'extrait méthanolique (1g/kg *per os*)



GR : glomérule rénal ; TCP : tube contourné proximal ; TCD : tube contourné distal ; C : cortex rénal

Aspect histologique du rein chez le rat témoin

Rein de rat traité par l'extrait méthanolique (1g/kg *per os*)



AE : acini exocrine ; CE : canal excréteur ; IE : ilots endocrines

Aspect histologique du pancréas chez le rat témoin

Pancréas traité par l'extrait méthanolique (1g/kg *per os*)

Figure 19 : Aspect histologique des prélèvements hépatique, néphrotique et pancréatique chez les rats témoins et traités par l'extrait méthanolique de *Centaurea africana* à la dose de 1g/kg par voie orale.

VI Evaluation pharmacologique

VI.1 Activite anti-inflammatoire *in vivo*

VI.1.1 Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez le rat

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire de la pommade à base d'extraits méthanolique de racine de *Centaurea africana* à la concentration de 5 et 10 % sont reportés dans le Tableau 27.

Tableau 26 : Effet de la pommade préparée à base d'extrait méthanolique de racines de *Centaurea africana* sur l'œdème induit chez le rat par l'huile de croton.

Lots	Oreille Gauche	Oreille Droite	% d'Œdème	% réduction de l'Œdème
Témoin	24.47±0.55	35.8±0.61	46.52±3.39	-
Véhicule	24.27±0.43	35.59±0.94	46.81±4.48	-
Pommade 5%	23.99±0.17	28.31±0.18	18.02±1.00	61.26*
Pommade 10%	24.72±0.28	27.86±0.26	12.71±0.85	72.68*
Référence	23.99±0.36	27.79±0.23	12.13±1.31	73.93*

* $P < 0.001$ comparé au contrôle. Valeur (Moy± SEM) (n=6). *Centaurea africana*, SEM : Erreur standard de la moyenne

L'application topique de la pommade à la concentration de 5 et 10%, a permis une inhibition significative de l'inflammation induite localement par l'agent irritant (l'huile de croton) avec une réduction de l'œdème de l'ordre de 61,26 % et 72,68 % respectivement. Ce dernier se rapproche de celui obtenu par le produit de référence (73,93 %) (**Figure 20**).

L'étude de l'activité anti-inflammatoire de pommade à base d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* a montré une activité dose-dépendante.

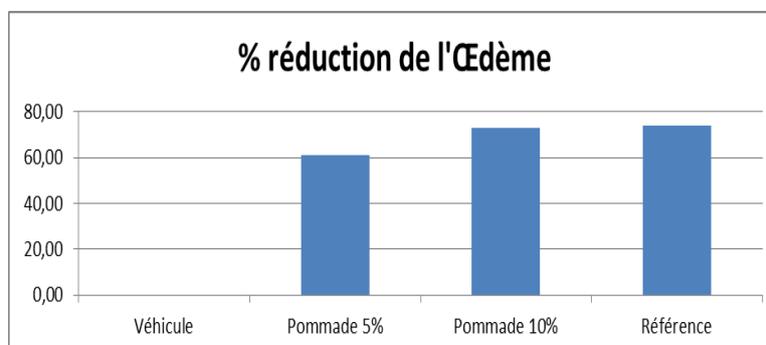


Figure 20 : Pourcentage de réduction de l'œdème induit chez le rat par l'huile de croton par l'application de la pommade préparée à base d'extrait méthanolique des racines de *Centaurea africana*.

L'application de l'huile de croton induit une réponse inflammatoire significative, caractérisée par l'apparition d'un œdème, une infiltration de neutrophiles, une production de prostaglandines et une augmentation de la perméabilité vasculaire (Rao, 1993). Le traitement local des rats par des préparations à base d'extraits de *Centaurea africana* a conduit à une réduction significative du volume de l'œdème induit par l'huile de croton par rapport à celle des rats traités par la préparation simple véhicule. L'effet anti-inflammatoire topique dans ce modèle d'inflammation cutanée chez le rat observé peut être attribué aux phytoconstituants présents tels que les flavonoïdes et les polyphénols. Ces composés bioactifs sont connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Auta et al, 2011 ; Sowemimo et al, 2013 ; da Costa, 2015) par inhibition de la synthèse des prostaglandines (Linn, 2010). Ces résultats sont en accord avec plusieurs recherches qui rapportent que le genre Centauréa est connu par son pouvoir anti-inflammatoire. Il s'agit, notamment de *Centaurea iberica Trev* (Koca et al., 2009), *Centaurea genus* (Sokovic, 2017), *Centaurea aphrodisea*, *Centaurea athoa*, *Centaurea hyalolepis*, *Centaurea iberica*, *Centaurea polyclada*, *Centaurea aphrodisea*, *Centaurea athoa*, *Centaurea hyalolepis*, *Centaurea iberica*, *Centaurea polyclada* (Erel , 2014). Par ailleurs, cette activité anti-inflammatoire contribuerait aux propriétés cicatrisantes de la plante (Fei, 2002 ; Chandran, 2008).

VI.2 Activité cicatrisante

L'activité cicatrisante a été évaluée par deux modèles de cicatrisation : par excision et par incision.

VI.2.1 Modèle par incision

La mesure de l'effet cicatrisant sur modèle par incision a permis la mise en évidence d'une résistance aux forces de traction statistiquement significative de l'ensemble des lots traités par rapport au témoin. Le traitement avec la pommade à base d'extrait méthanolique à 10 % ($620 \pm 44,27$) a conféré une plus grande résistance à la rupture comparé à l'ensemble des lots suivie par le produit de référence Cicatryl[®] ($595 \pm 41,83$) (Tableau 27).

Tableau 27 : Effet de l'application topique de l'extrait méthanolique de *Centaurea africana* sur la résistance à la traction du modèle de la rupture par incision :

Lots (Gr)	Résistance à la traction (g)
Véhicule Gr-I	451.67±7.70
Référence Cycatril® Gr-II	595.00±18.71*
Pommade à 5% Gr-III	532.00±16.87*
Pommade 10% Gr-IV	620.00±19.80*

Les valeurs sont exprimées en M ± SEM; N = 6 animaux dans chaque groupe; * P <0,001 par rapport au contrôle

L'augmentation de la résistance à la traction des plaies traitées peut être attribuée à la croissance des tissus de granulation et à la réépithélisation (Maurya, 2016) conduisant à une augmentation de la concentration et de la production de collagène qui est considérée comme le principal constituant de la matrice extracellulaire (Abood et al., 2015), conduisant à la croissance cellulaire et à la stabilisation des fibres (Pattanayak, 2008). En effet, le collagène est une protéine extracellulaire clé dans le tissu de granulation et joue un rôle essentiel dans la force et la solidité de la cicatrice (Hassan, 2011 ; Sunita, 2016). Par ailleurs, récemment, dans des études antérieures, il a été démontré que des constituants comme les flavonoïdes possèdent un effet antioxydant puissant, améliorant ainsi le niveau d'enzymes antioxydantes dans le granulome de tissu (Mughrabi et al, 2014 ; Caluya, 2017)

VI.2.2. Modèle par excision

Les résultats du modèle de cicatrisation par excision chez le rat après application journalière de la pommade à base d'extrait méthanolique de racine de *Centaurea africana* à la concentration de 5% et 10% sont présentés dans la figure et le **Tableau 29**.

Tableau 28 : Evolution de la réduction des surfaces des plaies (Moy \pm SEM) durant toute la période d'expérimentation (4j, 8j, 12j et 16j) et la période d'épithélialisation.

Lots (Gr)	Pourcentage de contraction des plaies				Période d'épithélialisation (j)
	J4	J8	J12	J16	
Véhicule Gr-I	20.74 \pm 8.05	30.56 \pm 7.02	43.69 \pm 6.12	60.53 \pm 8.71	24.00 \pm 0.37
Référence Cycatril[®] Gr-II	34.04 \pm 3.20*	62.53 \pm 3.13*	81.66 \pm 14.98*	92.35 \pm 2.43*	18.00 \pm 0.49*
Extrait pommade 5% Gr-III	26.32 \pm 3.98*	56.51 \pm 3.50*	73.37 \pm 3.02*	80.11 \pm 4.74*	20.67 \pm 0.46*
Extrait pommade 10% Gr-IV	33.89 \pm 4.63*	62.22 \pm 3.57*	82.20 \pm 3.17*	97.99 \pm 5.43*	17.00 \pm 0.49*

L'application topique des pommades à 5% et 10% a conduit à une augmentation significative du pourcentage de réduction des superficies des plaies chez les rats traités par la pommade à la concentration de 5 et 10% (80.11 et 97.99 %) par rapport à ceux des témoins traités par le véhicule (60,53 %). Par contre, le produit de référence Cycatril[®] a montré un effet cicatrisant supérieur à celui de la pommade 5% avec un pourcentage de réduction des superficies des plaies (92.71 %). Néanmoins, celui de la pommade à 10% demeure supérieur au produit de référence.

La période de l'épithélialisation (**Figure 21**) a été marquée par une réduction totale de la surface des plaies chez les rats traités par la pommade à 10 % à partir du 16^e jour du traitement suivie par la pommade de référence Cicatryl au 18^e jour de traitement et par la pommade à 5% au 20^e jour. Cependant, les plaies traitées par la pommade véhicule simple ont montré une durée de guérison allongée à 24 jours. La contraction de la plaie est l'un des paramètres essentiels de la réépithélialisation de la peau blessée, probablement en améliorant la fermeture de la plaie et la restauration de la barrière fonctionnelle (**Chattopadhyay et al, 2002 ; kundu, 2016**). Une meilleure activité cicatrisante d'une plaie est attribuée principalement à une période d'épithélialisation plus courte et une contraction accrue de la plaie (**Suntar, 2010**).

Les résultats de cette présente étude montrent clairement que les substances naturelles sont des agents potentiels de cicatrisation des plaies (**Abdulla, 2009 ; Akkol, 2011**). Dans ce modèle par excision, l'augmentation progressive de la contraction de la plaie et la diminution de la période d'épithélisation des rats traités par rapport aux rats témoins (véhicule) pourraient être attribués à la présence des substances bioactives contenues dans l'extrait méthanolique comme les stérols insaturés, les triterpénoïdes, les flavonoïdes, les saponines, les tanins et les composés phénoliques (**Manal et al, 2016**). Elles peuvent agir de manière indépendante ou synergique (**Ahmed et al, 2016**) et par leur propriétés antimicrobienne et astringente (**Shi et al, 2008 ; Chitra ,2009 ; Omale, 2010 ; Chintamani, 2014**). Le phénomène de contraction contribue à la réduction de la taille initiale de la plaie en tirant les bords de la plaie environnante sur toute son épaisseur vers le centre, ce mouvement centripète est due à l'activité des myofibroblastes (**Esimone, 2008 ; Chitra ,2009**).

Le temps d'épithélialisation était également considérablement plus court chez les animaux traités avec des onguents contenant l'extrait méthanolique. Il faut noter que l'épithélisation implique la prolifération et la migration des cellules épithéliales à travers le lit de la plaie (**Sanwal, 2011**). Par conséquent, ce raccourcissement du temps d'épithélisation pourrait être dû à une prolifération des cellules épithéliales ou/et à une augmentation de la viabilité des cellules épithéliales (**Shailajan, 2016**).

Des résultats similaires ont été rapportés lors d'études précliniques conduites sur plusieurs plantes de la famille des Astéracées (**Suntar, 2014**).

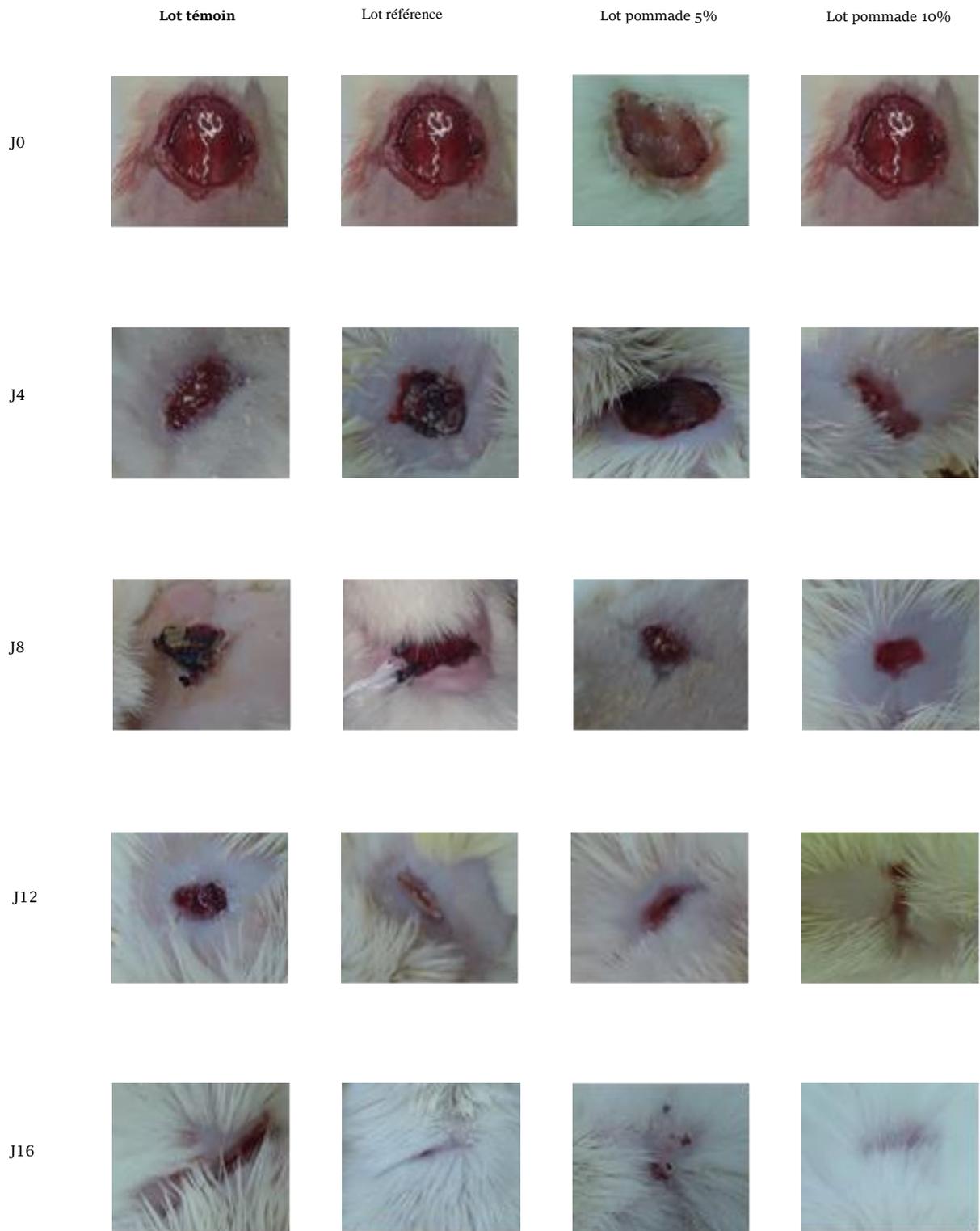


Figure 21 : Evolution macroscopique des surfaces des plaies des lots traités et contrôle.

VI.2.2.1 Teneur en hydroxyproline

Les teneurs tissulaires en hydroxyproline des plaies des quatre lots au 12^e jour du traitement sont présentés dans le **Tableau 29**. Les taux d'hydroxyproline des lots traités par les pommades à base d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* (5 et 10%) et du lot de référence ont été significativement plus élevés ($P < 0.001$) par rapport au lot véhicule seul.

Tableau 29 : Teneurs tissulaires en hydroxyproline des plaies des quatre lots au 12e jour de traitement

Lots	Teneur moyenne d'hydroxyproline (mg/g)
Véhicule	108.91±1.77
Référence Cycatril [®]	169.68±3.34*
Pommade à base d'extrait méthanolique de <i>Centaurea africana</i> 5%	155.59±3.08*
Pommade à base d'extrait méthanolique de <i>Centaurea africana</i> 10%	221.75±2.47*

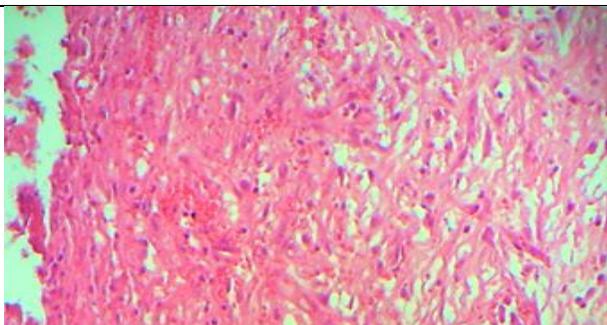
* $P < 0.001$ comparé au contrôle. Valeur : moyenne \pm SEM (n=6).

L'hydroxyproline est un marqueur biochimique de la synthèse du collagène qui est la protéine majeure de la matrice extracellulaire. Ainsi, toute augmentation de la teneur en hydroxyproline reflète une teneur plus élevée en collagène des tissus (**Hassan, 2011 ; Metowogo, 2014 ; Sunita, 2016**). Cette synthèse contrôlée et le dépôt de nouvelles fibres de collagène et leur maturation contribuerait à l'accélération et la qualité de cicatrisation observées lors du traitement par les pommades à base de *Centaurea africana* (**Nagar, 2016**).

VI.2.2. 2 Evaluation histologique

L'étude histologique des biopsies tissulaires rapporte une régénération du collagène, une augmentation de la vascularisation et une prolifération des fibroblastes dans la zone de la plaie des lots traités par rapport au lot témoin (**Figure 21**) (**Kumar, 2016**). Chez les rats témoins (**Figure 22 a**) nous avons noté la présence d'un tissu conjonctif inflammatoire, fibroblastique et très pauvre en vaisseaux sanguins. Les fibres de collagène n'ont pas pu être distinguées, ce qui indique une cicatrisation incomplète de la plaie. L'étude des tissus de granulation des animaux traités avec la pommade à base d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* à 5% (**Figure 22 b**) a rapporté des cellules épithéliales incomplètes, une fibrose et un

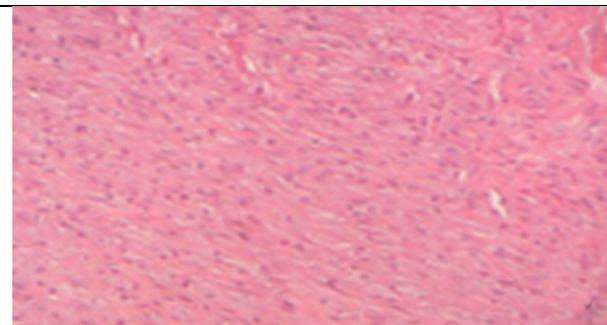
œdème léger avec des cellules lymphoïdes. Par ailleurs, celle des tissus de granulation des animaux traités par traités avec la pommade à base d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* 10% (**Figure 22 c**) a indiqué la présence d'une quantité modérée de collagène, de fibroblaste et un nombre accru de vaisseaux sanguins. La pommade de référence (Cycatril®) (**d**) a montré une grande quantité de tissu de granulation, une ré-épithélisation et un petit nombre de cellules inflammatoires.



(a) Lot Témoin GX10 HE

Le tissu de granulation est formé par un tissu collagénique abondant, œdémateux renfermant des néovaisseaux, des fibroblastes hyperplasiques et hypertrophiques, ainsi qu'une composante inflammatoire mixte.

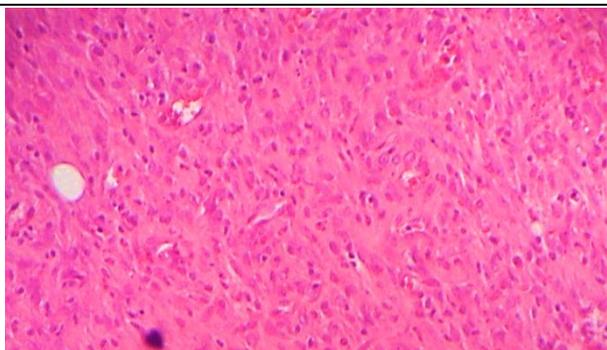
Lésion d'aspect aigu



(d) Lot produit de référence Cycatril GX10 HE

Le tissu de granulation est plus dense comparativement au témoin, la néo-vascularisation est moins prononcée. Le tissu collagénique est richement cellulaire, dense et compacte caractérisé par une hyperplasie des fibroblastes ainsi qu'une réaction inflammatoire mononucléée.

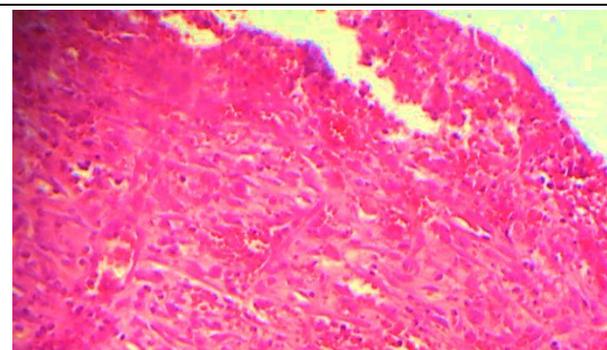
Lésion d'aspect subaigu.



(b) Lot traité par la pommade à base d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* à 5% GX 10 HE

Le tissu cicatriciel (de granulation) est formé d'un tissu collagénique compacte, dense renfermant des fibroblastes hyperplasiques et hypertrophiques, ainsi que des néovaisseaux et des cellules inflammatoires mixtes.

Lésion d'aspect subaigu.



(c) Lot traité par la pommade à base d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* 10% GX 10 HE

Tissu de granulation peu lâche, et peu œdémateux, renfermant de nombreux néovaisseaux fortement congestionnés, des fibroblastes hyperplasiques et hypertrophiques ainsi qu'une infiltration inflammatoire mixte.

Lésion d'aspect aigu.

Figure 22 : Coupes histologiques des biopsies cutanées colorées par l'hématoxyline/éosine des lots traités les pommades à base d'extrait méthanolique de *Centaurea africana* (5 et 10 %) et les lots contrôle

CONCLUSION GENERALE

&

PERSPECTIVES

Conclusion générale & perspectives

Le présent travail s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe «**Evaluation de l'efficacité des molécules pharmacologiques et développement de stratégies thérapeutiques alternatives** » du **Laboratoire de Recherche « Santé et Productions animales »** qui a pour objectif de dresser un inventaire des plantes médicinales de notre pays, susceptibles d'être utilisées en médecine vétérinaire notamment et d'en évaluer les diverses activités biologiques.

L'étude a été menée sur une plante médicinale endémique de l'Afrique du Nord (Algérie, Tunisie) de la famille des Astéracée (*Centaurea africana*), qui a fait l'objet de peu d'investigations tant sur le plan phytochimique, pharmacognosique que pharmacotoxicologique.

Ainsi un screening phytochimique des extraits (méthanolique, acétonique et aqueux) des racines de *Centaurea.africana* a permis la mise en évidence d'un certain nombre de groupes chimiques susceptibles d'activités: les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les triterpènes ainsi que les anthocyanes. En outre, nous avons également procédé à la quantification des polyphenols, des flavonoides et des tannins totaux par une méthode colorimétrique. Nos résultats montrent que les composés phénoliques sont présents au niveau de tous les extraits de racine plus particulièrement dans l'extrait méthanolique.

Concernant l'activité antioxydante, l'étude du pouvoir antioxydant de tous les extraits des racines de *centaurea africana* par la capacité de piégeage de radical DPPH a révélé une bonne activité antioxydante et une capacité de piégeage de radicaux libres intéressante en particulier pour l'extrait méthanolique suivie par l'extrait aqueux et acétonique, dues à la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes, dans ces extraits.

L'activité antibactériennes a été étudiée par la méthode qualitative de diffusion sur disque et quantitative par la méthode de micro dilution des différents extraits sur des souches de référence. Les *Staphylococcus aureus* ont présenté la plus grande sensibilité à l'extrait méthanolique, les *Pseudomonas aeruginosa*, ont montré une plus grande sensibilité à l'extrait aqueux et acétonique et *Bacillus subtilis* s'est montré très sensible à l'extrait aqueux.

Les résultats de l'étude de protection de la muqueuse gastrique sur modèle murin ont indiqué une activité ulcèreuse des extraits. Les extraits de la poudre de racine de *Centaurea .africana* à la dose de 300 mg/kg ont présenté des activités cytoprotectrices nettement supérieures à celle du produit de référence (Ranitidine^(R)) à la dose de 150 mg/kg (46.7 %).

Conclusion générale & perspectives

En effet, les extraits de racines de *Centaurea africana* à 300 mg/kg ont induit une cytoprotection de 68.4% (extrait méthanolique); alors qu'à la même dose les extraits acétonique et aqueux ont présenté respectivement une cytoprotection de 56.7% et 60.4%. Ces propriétés biologiques démontrées *in vivo*, seraient essentiellement dues aux métabolites secondaires de la plante.

L'étude des propriétés hémostatiques des trois extraits sur deux modèles : *in vitro* (sang humain) et *in vivo* (rats Wistar) a révélé que l'extrait méthanolique a exercé une forte activité hémostatique dans les deux modèles suivi par l'extrait aqueux, ce qui suggère que les extraits les plus riches en composés phénoliques présenteraient les activités hémostatiques les plus élevées.

A l'issue de cette première investigation, les résultats de l'ensemble des tests biologiques montrent que l'extrait méthanolique semble être le meilleur solvant d'extraction de la majorité des constituants chimiques responsables des différentes activités pharmacologiques aussi bien *in vitro* que *in vivo*, ce qui a motivé la formulation d'une pommade à base d'extrait méthanolique qui a été soumise à des tests physico-chimiques, toxicologiques et pharmacologiques.

L'étude de l'activité cicatrisante sur le modèle par excision, a révélé que la pommade à 5 et 10% de *Centaurea africana* induit une nette amélioration de la cicatrisation au 16^{ème} jour du traitement et une guérison effective à la 2^{ème} semaine avec des pourcentages de contraction des plaies de 80.11±4.74% à 97.99±5%. La pommade à base d'extrait à 10% a été plus efficace que la pommade du produit de référence cycatril[®].

La mesure de l'effet cicatrisant sur modèle par incision a permis la mise en évidence d'une résistance aux forces de traction de l'ensemble des lots traités par rapport au témoin. La pommade à 10 % a montré une plus grande résistance à la rupture que l'ensemble des autres lots.

L'activité anti-inflammatoire locale sur des rats par l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton a permis de conclure que les deux préparations appliquées localement possédaient un effet anti-inflammatoire proche de celui du produit de référence diclofenac[®].

La multitude des effets pharmacologiques, l'évaluation de la toxicité et l'identification phytochimique établie au cours de ce travail, sont prometteurs et peuvent dans une certaine mesure justifier l'usage traditionnel de *Centaurea africana*. Il serait par conséquent judicieux :

Conclusion générale & perspectives

- De mener d'autres études toxicologiques telles que celle de la toxicité chronique;
- D'analyser de lots récoltés à différents moments de l'année ou dans différentes régions ;
- De rechercher l'activité antivirale et/ou antifongique ;
- De mener d'autres études devraient être menées pour isoler, purifier et identifier les principes actifs pharmacologiquement responsables des activités cicatrisante, anti-inflammatoires et antibactériennes constatées dans la présente étude ;
- D'étudier l'activité de la plante sur des plaies chroniques comme les plaies diabétiques ;
- De proposer la forme galénique la plus appropriée pour un usage thérapeutique en médecine vétérinaire.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abood Walaa Najm., Al-Henhena Nawal Ahmed., Abood Ammar Najim, Jamil Al-Obaidi Mazen M., Ismail Salmah., Abdulla Mahmood Ameen., Al Batran Rami., 2015.** Wound-healing potential of the fruit extract of *Phaleria macrocarpa*. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015 May; 15(2): 25–30.
2. **AbouZid S., Mohamed A., 2011.** Survey on medicinal plants and spices used in Beni-Sueif, Upper Egypt. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 7-18
3. **Agab M.V., Greuter. 2003.** *Rhaponticoides africana* (Lam.), Willdenowia, 33: 60 pg, 152
4. **Agostini-Costa T.D.S., Silveira D., Bizzo H.R., Gimenes M.A., Vieira R.F., 2012.** Secondary metabolites. INTECH Open Access Publisher.
5. **Ahmed .ZF, Rimpler H., Rizk A.M., Hammouda F.M., Ismail S.I., 1970.** The flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt. *Phytochemistry* 1970;9(7):1595-601.
6. **Aithal, B.K., Kumar M.R., Rao B.N., Udupa N., Rao B.S. 2009.** Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. *Cell Biol Int*, 33, (10), 1039-1049.
7. **Aké Assi., 1983.** Santé et valorisation des plantes médicinales en Côte d’Ivoire L. *Bothalia*, 603-605
8. **Akkal S., Benayache F., Medjroub K., Tillequin F., 2007.** Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities..*Chemistry of Natural Compounds* 43(3), 319-320.
9. **Akkol E.K., Koca U., Pesin I., Yilmazer D., 2011.** Evaluation of the wound healing potential of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae) by *in vivo* excision and incision models. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011:474026.
10. **Akrouf A., Gonzalez L., Eljani H.,Madrid P.,2011.**Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from Southern Tunisia. *Food and chemical.Toxicology*,n°49,p-p 342-347.
11. **Aktumsek A, Yener T, Gokhan Z, Torlak E., 2011.** Antibacterial Activities of Extracts from Twelve *Centaurea* Species From Turkey. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 63 (3), 685-690, 2011.
12. **Al Namer Rashad Mohammed Musleh., 2014.** Valorisation pharmacologique de *Rosmarinus Officinalis* et de *Lavandula Officinalis*: toxicite aiguë, potentiel psychotrope et antibacterien. Thèse de Doctorat, Université Mohammed v – Agdal, faculté des sciences, Rabat, Maroc. Discipline: Science de la vie Spécialité: Pharmacologie et Toxicologie.
13. **Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., 2001.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 40: 4168-70.
14. **Alinejhad Donya. , Asayesh M Ali., Asayesh Maryam ., 2016.** Determiration of the Anti-inflammatory Property of Tannins from the Rind of Calamansi (*Citrus microcarpa*, *Rutaceae*). Anti-inflammatory property of *calamansi tannins*. *Journal of International Oral Health*; 8(5), 546-553,3.
15. **Allai L., Karym E.M., El Amiri., Nasser Boubker., 2016.** Evaluation of Antioxidant Activity and Phenolic Composition of *Opuntia ficus-indica* *Cladodes* Collected from Moroccan Settlat Region. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry.* 12(1):105-117.
16. **Alnashi1, B.A., Hassouna, H.Z., El Dairouty, R.K. 2016.** Evaluation of antimicrobial activity, total phenolic compounds, antioxidant activity and nutritional value of fresh

spinach (*Spinacia oleracea*) extracts. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, May – June (2016), RJPBCS 7(3) Page No.1835.

17. **AlRashdi A.S., Salama S.M., Alkiyumi S.S., Abdulla M.A., Hadi A.H.A., 2012.** Mechanisms of gastroprotective effects of ethanolic leaf extract of *Jasminum sambac* against HCl/Ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012: 15 pages.
18. **Amber R., Adnan., Akash M., Shahid T., Mussara N. K. S., 2017.** Antibacterial activity of selected medicinal plants of northwest Pakistan traditionally used against mastitis in livestock. Saudi Journal of Biological Sciences. 2017.02.008.
19. **Amberger E. 1960.** Darstellung und Eigenschaften von Monochlorstannan Angewandte Chemie 72 (2) : 78–79.
20. **Amiot M.J., 2009.** Polyphénols et syndrome métabolique, Polyphenols and metabolic syndrome. Médecine des Maladies Métaboliques Volume 3, Issue 5, November 2009, Pages 476-482.
21. **André J ., 1956.** Lexique des Termes de Botanique en Latin. Paris: C. Klincksieck.
22. **Aneja K.R., Sharma C., Joshi R., 2012.** Antimicrobial activity of *Terminalia arjuna* Wight and Arn : an ethnomedicinal plant against pathogens causing ear infection. Braz J Otorhinolaryngol., 2012 Feb; 78 (1):68-74.
23. **Aouni M. , Pelen F. , Soulimani R., 2013.** Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application .Phytothérapie, August 2013, Volume 11, Issue 4, pp 225–236.
24. **Arab H.H., Salama S.A., Hany A. O., El-Shaimaa Arafa A.,Maghrabi I A., 2015.** Diosmin Protects against Ethanol-Induced Gastric Injury in Rats: Novel Anti-Ulcer Actions. PLoS One. 2015; 10(3): 0122417.
25. **Auta R., Ali I., 2011.** Nutritional and chemical value of *Solanum incanum* (bitter garden egg), Intern. J. Trop. Med. Pub. Health, 1(1): 96-107.
26. **Avril JL., Dabernat H, Denis F., Monteil H., 2000.** Bactériologie clinique. Editeur ELLIPSES.
27. **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., 1996.,** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation, Arznein Forsch/Drug Res, 46, 1–6.
28. **Bakhtaoui F. Z., Lakmichi H., Chait A., Gadhi A., 2014.** *In vivo* Gastro-Protective Effects of Five Moroccan Medicinal Plants against Gastric Ulcer. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, pp 1262-1276.
29. **Barchan A., Bakkali M., Arakrak A., Laglaoui A., 2016.** Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de Mentha : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. Phytothérapie 14:88-96.
30. **Bardi D., Khan M.S., Sabri S., Kadir F., Mahmood A., Zahra A., 2011.** Anti-ulcerogenic activity of *Typhonium flagelliforme* aqueous leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. Scientific Research and Essays, 6(15):3232–9.
31. **Barouki Robert., 2006.** Stress oxydant et vieillissement médecine/sciences, 22, 266-72.
32. **Basli Chibane K.A., Madani N., Oukil., 2012.** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. Phytothérapie, volume 10, Issue 1, pp 2–9.
33. **Bastard Jean-Philippe., Bruno Fève., 2013.** Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux. Springer Science & Business Media, page 69, 452 pages.
34. **Battandie R., Trabut L. Flore de l'Algérie.** Dicotylédones, 1888-1890.
35. **Baudin Bruno., 2006.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires, revue mt cardio, 2 (1), 43-52.

36. **Bauer A.W, Kirby W.M.M., Sheriss J.C., Turck M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by standardised single method. *Am J Clin Pathol.*; 45: 493–96.
37. **Beaudeau J.L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A., Peynet J., 2006.** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose Oxidative stress in the atherosclerotic process *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21, 144 – 150.
38. **Béchade D., Desramé J., De Fuentès G, Raynaud J –J., 2004.** Indications, conditions d'emploi et surveillance de la corticothérapie en hépato-gastroentérologie. Volume 11, numéro 2, Mars-Avril
39. **Békro YA., Békro J.A.M., Boua B.B., Tra F.H., 2010.** Expérience du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (1980-2008). *Toxicologie Maroc*.
40. **Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Médecine arabe ancienne et savoirs populaires - Saint –Etienne*, Edit. Ibis Press, 764 pp.
41. **Beloued A., 1998.** Plantes médicinales d'Algérie. In Office de publications (Ed), Alger, p. 184.
42. **Benayache S., 2007.** Étude phytochimique des plantes médicinales algériennes, cas de l'espèce *Inula crithmoides* L. *Mém Mag Univ Mentouri Constantine*, Algérie, p. 210
43. **Benkhniq, O.; Zidane, Z.; Fadli, M.; Elyacoubi, H.; Rochdi, A.; Douira A., 2010-2011.** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* 53, 191-216.
44. **Berger Tristan., 2016.** Doit-on s'inquiéter de l'usage d'additifs antibiotiques en élevage? *La revue électronique en sciences de l'environnement*, Volume 16 N° 3.
45. **Berthélémy Stéphane., 2015.** Le bilan d'hémostase et de coagulation *Actualités pharmaceutiques*. Elsevier Masson, janvier 2015, n° 542.
46. **Betti, H H., Betti A., Stein A., Dallegrove.A., Bart.,H T., 2012.** Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum Klotzsch* ex Reichardt (Guttiferare) in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 50 2349 – 2355
47. **Botineau M., 2010.** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 2010.
48. **Bouallala M., Bradai L., Abid M., 2014.** Diversité et utilisation des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien dans la pharmacopée saharienne. Cas de la région du Souf. *Revue El-Wahat pour les Recherches et Etudes* 7 (2), 18 – 26.
49. **Bouarioua N., 2007.** Physiopathologie de la maladie ulcéreuse gastroduodénale à l'ère d' *Helicobacter pylori*. *EMC Gastro-entérologie*, octobre 2007 [9-020-A-10].
50. **Bouhassira D., Calvino Arnette B., 2009.** Douleurs: physiologie, physiopathologie et pharmacologie, 1 janv. 2009, 384 pages.
51. **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol.*; 28:25–30.
52. **Brink M., Achigan-Dako E.G., 2012.** **PROTA.** Plantes à fibres, 659 pages.
53. **Bruel Linda., 2015.** Histoire de La Règlements Encadrant, L'utilisation des Plantes Médicinales En France. Thèse de doctorat, France, option pharmacologie.
54. **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2e édition, Tec et Doc., Lavoisier, Paris, 915 p.
55. **Bruneton Jean., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier, 4e ed., 2 oct. 2009, 1292 pages.
56. **Bruneton Jean., 2016.** Lignanes, néolignanes, et composés apparentés *Pharmacognosie, Phytochimie - Plantes médicinales*, 5° Éd.
57. **Budge E.A.W., 1978.** *Herb-Doctors and Physicians in the Ancient World. The Divine Origin of the Craft of the Herbalists* (Nouvelle édition), Ares Publishers, Chicago.

58. **Buxeraud Jacques., 2014.** Les effets indésirables des antibiotiques Professeur Actualités pharmaceutiques .Supplément n°1.
59. **Caluya Emiliana Dela Cruz., 2017.** Wound healing potential of the crude leaf extract of *tachytarpheta Jamaicensis* Linn. Vahl (Kandikandilaan) on inducedwounds in rats. Journal of Medicinal Plants Studies 2017; 5(1): 375-38.
60. **Cano Noel, Didier Barnoud., Stéphane Schneider M., Marie-Paule Vasso., Michel Hasselman, Xavier Leverve., 2006.** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer Science & Business Media, 5 déc. 2006 - 1191 pages page 475.
61. **Cargile J.L., Burrow J.A., Kim I., Cohen N.D., Merritt A.M., 2004.** Effect of Dietary Corn Oil Supplementation on Equine Gastric Fluid Acid, Sodium, and Prostaglandin E2 Content before and during Pentagastrin Infusion. J. Vet. Intern. Med. 18, 545-549.
62. **Carillon Alain., 2009.**Place de la phytothérapie dans les systemes de sante au XXI°S. Conférence SIPAM –Djerba Mars 2009.
63. **Carvalho., Dewulf A. K. M. Y., Moraes A., Bremm C., Trindade J. K. ,Lang C. R., 2010.** Kikuyo grass potential to maintain milk yield and quality from cows receiving decreasing levels of supplements. Rev. Bras. Zootec., 39 (9): 1866-1874
64. **Catarino, M.D., Talhi, O., Rabahi, A., Silva, A.M.S., Cardoso, S.M. (2016).** The Anti-inflammatory Potential of Flavonoids: Mechanistic Aspects. Studies in Natural Products Chemistry, Volume 48, 2016, Pages 65-99.
65. **CDU-HGE., 2012.** Abrège d'Hépto-Gastro-Entérologie. Partie «Connaissances». Editions Elsevier-Masson, 2ème édition, Octobre 2012.
66. **Chabi C., Chabi F., Abiodoun P, Olounlade S., 2014.** Ethnobotanical study of endogenous methods used for the treatment of diseases of somba cattle breed in northern Benin Journal of Drug Delivery & Therapeutics., 4(3), 91-99 91.
67. **Chandran P.K., Kuttan R., 2008.** Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. J Clin Biochem Nutr, 43(2):58-64.
68. **Chaput B., Courtade-Saïdi M., deBonnecaze G., burdery H.E., Crouzet C., 2012.** Anomalies de la cicatrisation .EMC-Techniques chirurgicales-Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique 1Volume7, page 1.
69. **Chassot Pierre-Guy., 2017.** Précis d'anesthésie cardiaque. Coagulation et hémostase, version 5 -08.
70. **Chast F., 2012.** La médecine par les plantes ne peut être qu'une médecine scientifique Annales Pharmaceutiques Françaises, Volume 70, Issue 2, Pages 59-61.
71. **Chattopadhyay D., Arunachalam G., Mandal A.B., Sur T.K., Mandal S.C, Bhattacharya S.K., 2002.** Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. J Ethnopharmacol. 82:229–237.
72. **Chaturvedi A., Kumar M.M., Bhawani G., Chaturvedi H., Kumar M., Goel RK., 2007.** Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seeds on gastric ulceration and secretion in rats. Indian J Physiol Pharmacol. 2007; 51: 131-40.
73. **Chaumont J –P., Millet-Clerc J., 2011.** Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie. 1 mars 2011 Ed Lavoisier. Page 88, pages 263.
74. **Chavan U.D, Amarowicz R., 2013.** Effect of various solvent systems on extraction of phenolics, tannins and sugars from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*). Inter-national Food Research Journal, 20 (3):1139-44. 14.
75. **Chavan U.D, Shahidia F., Naczkb M., 2001.** Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*) as affected by different solvents. Food Chemistry, 75:509–512
76. **Chavoïn Jean-Pierre., Sofcpre., 2011.** Chirurgie plastique et esthétique, Techniques de base .Elsevier Masson, page 2-3, 280 pages.

77. **Cheng, K., Ling, L., Jhong, H.G., Chang, H.Y.S. 2015.** Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects of *Lobelia Chinensis* *In Vitro* and *In Vivo* .The American Journal of Chinese Medicine, January 2015, Vol. 43, No. 02: pp. 269-287
78. **Chintamani U., Deepali B., Mhapsekar R., 2014.** Phytochemical investigations and antimicrobial and anticancer activities of *Homonoia riparia Lour.* IJPCR 2014; 6 (11):237-43.
79. **Chitra V., Prasad P.D., Pavan K.K., Alla N.R., 2009.** Wound healing activity of alcoholic extract of *Buchanania lanzan* in albino rats. Int J Chem Tech Res;1(4):1026-31.
80. **Chominot Albert., 2000.** Valorisation des plantes médicinales par l'industrie pharmaceutique complémentarités et contradictions. Courrier de l'environnement de l'INRA n°39, février 2000.
81. **Chowdhury MA, Abdellatif KR, Don Y, Das D, Suresh MR, Knaus EE., 2009** Synthesis of celecoxib analogs possessing a N-difluoromethyl-1,2- dihydropyrid-2-one s-lipoxygenase pharmacophore: Biological evaluations dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. J Med Chem 2009; 52(6):1525-9.
82. **CIB/SHS/EST -17/10/CONF.501.,2010.** Avant-projet de rapport sur la médecine traditionnelle et ses implications éthiques /3 Paris, 29 septembre 2010 Original: français.
83. **Clark R.A., Lanigan J.M., Della Pelle P., 1982.** Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. J Invest Dermatol, 9:269- 76.
84. **Codine P., Nelly K., Péliissier J., 2005.** Coagulation, thrombose et médecine physique, Elsevier Masson, 114 pages.
85. **Collin S., Crouzet J., 2011.** Agence universitaire de la francophonie Lavoisier, 1 mai 2011 - 337 pages.
86. **Cristina P., Ilonka S., Bartek T., 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réaction avec le radical libre DPPH. Rev. S Génie. Ind, 4, 25–39.
87. **Cronquist A., 2001.** Vascular Flora of the Southeastern United States: Asteraceae. UNC Press Books.
88. **Croteau R., Kutchan T., Lewis N., 2000.** Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Grisseem, W., Jones, R. (eds), Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 1250 -1268.
89. **Dalar A., Konczak I., 2014.** *Cichorium intybus* from Eastern Anatolia: Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities. Ind. Crop. Prod., 60, 79–85.
90. **Daly A.K., 2013.** Optimal dosing of warfarin and other coumarin anticoagulants: the role of genetic polymorphisms. Archives of Toxicology, 87(3), 407-20.
91. **Dargaud Y., 2010.** Pathologies hématologiques. In: Réanimation et urgences. Le point sur Springer, Paris, pp 227-240.
92. **Dayi Erol-Öa., Pekmez M.b., Bona M.c., Aras-Perk A., Arda N.b., 2011.** Total Phenolic Contents, Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Three Centaurea Species: *C. calcitrapa subsp. calcitrapa*, *C. ptosimopappa* and *C. spicata*. Free Radicals and Antioxidants Vol 1, Issue 2.
93. **Defraigne J.O., Pincemail J., 2008.** Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités Rev Med Liège; 63: Synthèse 2008: 10-19.
94. **Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer JP., et al., 2013.** Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxid Redox Signal; 18:1818-92.
95. **Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Cachan: Lavoisier.

96. **Deniau Valérie, Anne Courouc -Malblanc., 2013.** Rappels sur la fonction hémostatique, les causes et les mécanismes de ses perturbations. Pratique Vétérinaire Equine, Vol 4 5, n 7 7.
97. **Denine R., 2008.** Cours de pharmacie galénique. Office des publications universitaires.
98. **Derriche R., Messaoudi S., Lahouazi N., Amrouche S., 2015.** Teneur en Polyphénols et activité antioxydante des Huiles essentielles des feuilles d'inule visqueuse. International Journal of Scientific Research & Engineering Technology. 3 me conférence Internationale des énergies renouvelables CIER-2015.
99. **Desnottes J.F., 1998.** Quels antibactériens pour après-demain? Outils et concepts nouveaux relancent la recherche industrielle. La Recherche, 314, 70-73.
100. **Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F., 1999.** Flavonoids, old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci 65 (4), 337-53.
101. **Dibong S.D., Mpondo Mpondo E., Ngoye A., Kwin M.F., Betti J.L., 2011.** Ethnobotanique et phytom decine des plantes médicinales de Douala, J. Appl. Biosci ; 37, 2496-2507.
102. **Diqu lou, Trumel C., Bourg s-Abella N., Guelfi J.F., 2006.** H mostasie secondaire ou coagulation plasmatique chez le chien et le chat. EMC – Vétérinaire, 1-10 [Article 0600].
103. **Direction de l'Urbanisme et de La Construction de la Wilaya de Tizi Ouzou, etude d'aménagement. 2011.** Du nouveau pôle urbain d'Oued Falli, du pôle urbain d'excellence de Boukhalfa et des zones d'urbanisations futures, commune De Tizi Ouzou: Version Corrigée.
104. **Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M., Stocker P., 2010.** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food Chem Toxicol 48: 2599–606.
105. **Djerrou Z., Maamari Z., Hamdi-Pacha Y., Serakta M., Riachi F., Djaalab H., Boukeloua A., 2010.** Effect of virgin fatty oil of *Pistacia lentiscus* on experimental burn wound's healing in rabbits. Afr. J. Trad. CAM. 7(3) : 258-263.
106. **Doughty., 2005.** Dressings and more guidelines for topical wound management, nurs north am 40, 217-231.
107. **Dougnon T.V, Klotoé J.R, Eдорh P.A., 2012.** In vitro Hemostatic Activity Screening of Sap of *Jatropha Multifida L.*(Euphorbiaceae) used in Traditional Medicine at Cotonou (Benin). J Phys Pharm Adv 2(6): 227–34.
108. **DougnonTam gnon Victorien, Klotoé, Jean Robert, S gbo Julien, At gbo Jean-Marc, Eдорh Al odjrodo Patrick., 2012.** Evaluation of the phytochemical and hemostatic potential of *Jatropha multifida sap.* African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 6(26), pp. 1943-1948.
109. **Draize J., Woodard G., Calevery H., 1944.** Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. Journal of pharmacology and Experimental therapeutics, 82: 377-390.
110. **Dr no. B., 2009.** Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes Anatomy and physiology of skin and cutaneous annexes. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie Volume 136, n  S6 pages 247-251.
111. **Dubrana F., Pasquier P., 2011.** Cicatrice, Cicatrisation, Ligatures et sutures chirurgicales. Springer-Verlag France.
112. **Dupont F. Guignard J.L., 2012.** Abrégé de Botanique 15 me édition. Editions Masson, Paris.
113. **Duraffourd C., Lapraz J.C., 2002.**Traité de phytothérapie clinique.  ditions Masson, Paris.
114. **El Hilaly J. Z., Israili H., Lyoussi B., 2004.**Acute and chronic toxicological studies of

Ajuga iva in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology, 91 43 – 50

115. **Elgailani I-E-H., Ishak Ch., 2016.** Methods for Extraction and Characterization of Tannins from Some *Acacia Species* of Sudan. Pak. J. Anal. Environ. Chem. Vol. 17, No. 1 43 – 49.
116. **Elhouiti F ., 2017.** Valorisation des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum* Algérien: Composition chimique, activités antimicrobienne et antioxydante. Editions universitaires européennes, pages 116
117. **Eloff J.N., 1998.** Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? Journal of Ethnopharmacology 80: 1–8
118. **Enneb H., Belkadhi A., Cheour F., Ferchichi A., 2015.** Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis L.*). Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, 20(2), 788-793.
119. **Erel SB1., Demir S., Nalbantsoy A., Ballar P., Khan S., Yavasoglu NU., Karaalp C., 2014.** Bioactivity screening of five *Centaurea* species and *in vivo* anti-inflammatory activity of *C. athoa*. Pharm Biol; 52 (6), 775.
120. **Erlund I., 2004.** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. Nutr Res 24: 851-74.
121. **Esimone C., Nworu C., Jackson C., 2008.** Cutaneous wound healing activity of an herbal ointment containing the leaf extracts of *Jatropha curcas L.* (Euphorbiaceae). Int J Appl Res Nat Prod; 1:1-4.
122. **Evrard J., 1993.** Valorisation industrielle des acides gras des huiles vegetales. Paris: Editions CETIOM, 1993.
123. **Faraji, P., Jamei, R., 2016.** The Study of Phenolic Compounds Antioxidant Activity in Methanolic and Aqueous Extracts of Several Plant Species of *Urmia Lake Margin*. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016; 8(2); 289-296.
124. **Favier A., 2006.** Stress oxydant et pathologies humaines Oxidative stress in human diseases Annales Pharmaceutiques Françaises, Volume 64, Issue 6 November 2006, Pages 390-396.
125. **Fazavana J .G., 2012.** Développement d'une antithrombine modifiée inactive comme antidote des anticoagulants hépariniques. Thèse de Doctorat. Université Paris-Sud.
126. **Fei Y.M., Zainol J., Pillay A.G., Yusof N., 2002.** Experimental evaluation of healing process of burn wound treated by lyophilized Aloe vera dressing. Sciences 2002;2(1):1-6.
127. **Finkel T., 2003.** Oxidant signals and oxidative stress. Curr Opin Cell Biol, 15, 247-54.
128. **Flamini G., Ertugrul K., Cioni P.L., Morelli I., Dural H., Bagci Y., 2002 (a).** Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C. Pseudo Scabiosa subsp, Pseudoscabiosa* and *C. Hadimensis*. Biochem Syst Ecol 2002; 30:953-9.
129. **Flamini G., Pardini M., Morelli I., Ertugrul K., Dural H., Bagci Y., Kargioglu M., 2002 (b).** Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa subsp. pseudoscabiosa* from Turkey. Phytochemistry, 61, 433-437.
130. **Flamini G., Stoppelli G., Morelli I., Ertugrul K., Dural H., Tugay O., Demirelma H., 2004.** Secondary metabolites from *Centaurea isaurica* from Turkey and their chemotaxonomical significance. Biochemical Systematics & Ecology, 32, 533-557.
131. **Fleurentin J., Pelt J -M., Mazars G., 2002.** Des sources du savoir aux médicaments du futur, éditions IRD – SFE, Paris 2002.
132. **Fleuriet Annie, Uhel Christiane, Dedaldechamp Fabienne., 2013.** Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme. Acta bot. Gallica, 143 (6), 493-500.
133. **Fontanay S., Mougenot M -E., Raphaël Duval E., 2015.** Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires Evaluation

of antibacterial properties of essential oils and/ or of their major components. Hegel Vol. 5 N° 2.

134. **G.I., 2011.** Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of Natural Products.*, 2011, vol. 74, n° 3, pp. 496–511.
135. **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène. *Mécanismes Biochim L'Actualité Chim* Novembre. 2003; 91–6.
136. **Gazengel J –M., Orecchioni A –M., 2013.** Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique (2e ed.). Lavoisier, 15 avr. 2013, 1761 page.
137. **Geagea- A- G ., 2014.** L'Aloe Vera, Une Plante Médicinale à Vertus Hydratantes et Cicatrisantes. *Phytothérapie, HUMAN & HEALTH*, N°29.
138. **Geraud M V., 2007.** Les syndromes hématologiques d'origine toxique chez les carnivores domestiques : Etude clinique et synthèse bibliographique. Thèse de doctorat,
139. **Gersbenzon J., Croteau R., 1991.** Herbivores. Their interactions with secondary plant metabolites. Volume 1: The chemical participants. Academic Press, San Diego, Calif. Terpenoids, p. 165-219. In: G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum (ed.).
140. **Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., 1954.** Oxygen poisoning and X – irradiation : a mechanism in common. *Science*, 119, 623-626.
141. **Ghazi et Sahraoui., 2014.** Essai de synthèse d'un conjugué acide gallique inuline et étude in vitro de leurs activités anti-oxydante et prébiotique. Mémoire de magister. Université Mouloud Mammeri- Tizi-Ouzou.
142. **Ghedadba Nabil L., Hambaba Leila., Aberkane M. C., Oueld-Mokhtar S. M. , Fercha Nassima . , Bousselfela Houas., 2014.** Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* .*Algerian Journal of Natural Products* 2:2 64-74.
143. **Ghrabi-Gammar Z., Daoud-Bouattour A., Ferchichi H., 2009.** Flore vasculaire rare, endémique et menacée des zones humides de Tunisie, *Rev. Écol. (Terre Vie)*, vol. 64.
144. **Girodon F., Blache D., Monget A.D., Lombart M, Brunet-Lecompte P., Arnaud J., Richard M.J., Galan P., 1997.** Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. *J Am Coll Nutr*, 16, 357-365.
145. **Gokbulut., Ozhan O., Satilmis B., Batcioglu K., Gunal S., 2013.** Antioxidant and antimicrobial activities and phenolic compound of selected *Inula species* from Turkey *Nat Prod Commun*, 8 (4), pp. 475–478.
146. **Gonzalez A.G., Barrera J.B., Garcia T.Z., Rosas F.E., 1984.** Sesquiterpene lactones from *Centaurea* species. *Phytochemistry* 1984;23(9):2071-2.
147. **Goudable J., Favier A., 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*, 11, 115 - 120.
148. **Gravot, A., 2008.** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
149. **Greuter W., 1991.** Botanical diversity, endemism, rarity, and extinction in the Mediterranean area: an analysis based on the published volumes of *Med-Checklist*. *Bot. Chron.*, 10: 63-79.
150. **Grimaud F., 2009.** Les Astéracées du Ladakh dans la médecine tibétaine1 *Phytothérapie*, 7, 255-261.
151. **Grouzard Véronique., Jean Rigal., Marianne Sutton., 2016.** Guide clinique et thérapeutique Pour les programmes curatifs des hôpitaux et des dispensaires, à l'usage des prescripteurs, 358 pages 95-96.

152. **Guedje Nicole M., Fulbert Tadjouteu., Dongmo Robert F., Jiofack René B.T., 2012.** Médecine traditionnelle africaine (MTR) et phytomédicaments, défis et stratégies de développement. Health Sci, Dis: Vol 12 (3), Septembre 2012.
153. **Guillet Gérard., Hugues Cartier., 1998.** Dermatologie: guide pratique, dermatologie générale, dermato-allergologie, angéiologie-vénérologie, page 82 - 382 pages.
154. **Guinoiseau E., 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse doctorat, corse. option Biochimie.
155. **Gurbuz I., Yesilada E. 2007.** Evaluation of the antiulcerogenic effect of the sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* ssp. *solstitialis* by using various *in vivo* and biochemical techniques. J Ethnopharmacol, 112:284–295.
156. **Guy Mazars., 2002.** Pharmacopées du Proche-Orient Antique .Des sources du savoir aux médicaments du future.
157. **Guyton A.C., Hall J.E., 2003.** Haemostasis et coagulation sanguine. Dans : Précis de physiologie médicale. 2e éd. Traduction Dinh-Xuan A.T.Lockhart A. Piccin Nuova Libreria, Padoue.446-457.
158. **Habif Thomas P., James Campbell I Jr., Shane Chapman M., James Dinulos G.H., Kathryn Zug A., John Scott., Gérard Lorette. 2012.** Maladies cutanées, diagnostic et traitement, Elsevier Masson, 17 déc. 2012 - 700 pages.
159. **Hajimehdipoor H., Naghibi F., Bandidarian A., Moazzeni H., Pirani A., Hamzeloo-Moghadam M., 2014.** Evaluating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of three *Centaurea* species. Journal of Pharmacognosy (RJP) 3 (4):1-7.
160. **Hallouët A., Borry P. 2009.** Corticoïdes. Mémo-guide de biologie et de physiologie humaines, Pages 326–329 Cover image55 .
161. **Hamburger M., Hostettmann K., 1991.** Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochem. 30: 3864-3874.
162. **Hamliche Victoria., Merad Rachida., Azzouz Mohamed., 2013.** Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen Springer-Verlag France, Paris, pp 18-20.
163. **Harif Mhamed., 2015.** Hémostase: de la physiologie à la pathologie. Edition : Casa Blanca. Pp237.
164. **Harikesh M., Semwal M., Kumar Dubey S ., 2016.** Pharmacological Evaluation of *Chrozophora tinctoria* as Wound Healing Potential in Diabetic Rat's Model. Biomed Res Int. 2016; 2016: 7475124.
165. **Hassan S.W., Abubakar M.G., Umar R.A., Yakubu A.S., Maishanu H.M Ayeni G., 2011.** Pharmacological and toxicological properties of leaf extracts of *Kingelia africana* (*bignoniaceae*). J. Pharmacol. Toxicol., 6: 124-132.
166. **Haute Autorité de Santé (HAS), 2011.** Rapport d'évaluation technologique hémostatiques chirurgicaux. Service Evaluation des Médicaments/SEM Service Evaluation des Dispositifs/SED.
167. **Havsteen B.H., 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Therap 96: 67-202.
168. **Hayes J.E., Allen P., Brunton N., O'Grady M.N., Kerry J.P., 2011.** Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea L.*), lutein, sesamol and ellagic acid. Food Chemistry 126: 948-955.
169. **Health Technology Assessment (HTA) Phytothérapie. 2005.** Projet de l'Évaluation des Médecines Complémentaires de l'Office Fédéral de la Santé Publique : **p. 15–24.**
170. **Hebi M., Eddouks M., 2016.** Évaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana*. Phytothérapie, 14 1, 17-22.
171. **Hegnauer R., Swain T., 1963.** Chemical plant taxonomy. Academic Press, Londres,p. 289.

172. **Hellwig, F.H., 2004.** *Centaureinae* (Asteraceae) in the Mediterranean history of ecogeographical radiation. *Pl. Syst. Evol.* 246: 137-162.
173. **Hmamouchi I., Rachidi M., Abourazzak E- F., Khazzani H., 2012.** Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales Marocaines en rhumatologie. *Revue Marocaine de Rhumatologie, Rev Mar Rhum* 2012; 22: 52-6.
174. **Hossam M., Abdallah M A., AbdouManal M., Hamed A B., Abdel-N M., 2013.** Protective effect of *Centaurea pallescens* Del. against CCl₄-induced injury on a human hepatoma cell line (Huh7). *Medicinal Chemistry Research*, Volume 22, Issue 12, pp 5700–5706.
175. **Hseini S., Kahouadji A., 2007.** Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental). *Lazaroa*, 28: 79-93.
176. **Huang, S., Lin, B, Li, B., Bi, T., Honga, Y., 2017.** Purification of total flavonoids from loquat leaves by macroporous resin and corresponding antioxidant capacity. *College of Life Science, Longyan University, Longyan, Fujian 364012, China BIO Web of Conferences* 8,0
177. **Imoberdorfa R., Rühlinb M., Peter E., Ballmera ., 2010.** Zinc– un oligoélément vital à grand potentiel *Forum Med Suisse* ; 10(44) ; 764–768
178. **J.O., 1984.** *Journal officiel de la république française* du 24/10/1984.
179. **Jacob E. J., 2009** .Natural Products-Based Drug Discovery: Some Bottlenecks and Considerations, *Current Science*, Vol. 96, No. 6: pp. 753-754.
180. **Jain P.K., Himanshu Joshi., 2012.** Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (06), 236-240.
181. **James T., Mukinda P., Eagles F.K., 2010.** Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 128 (1), 236-240.
182. **Jehl F., 2014.** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Recommandations 2014*, Paris, (ed) Société Française de Microbiologie, 2014; 114 p.
183. **Johnston D.E., 1990.** Care of accidental Wounds. *Vet Clin Nort .Am Small Pract*, 20, 27-46.
184. **Jost J –P., Jost-Tse Y -C., 2016.** Stratégie de défense des plantes contre les maladies et les parasites. *Editions Publibook*, 28 oct. 2016, 209 pages.
185. **Jouffret P., Labalette F., Thibierge J., 2011.** Atouts et besoins en innovations du tournesol pour une agriculture durable. *Innovations Agronomiques* 14, 1-17.
186. **Julkunen-Titto R., 1985.** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33, 213–217.
187. **Kabera J., Tuyisenge R., Ugirinshuti V., Nyirabageni A., Munyabuhoro S., 2014.** Preliminary investigation on anthelmintic activity and phytochemical screening of leaf crude extracts of *Tithonia diversifolia* and *Tephrosia vogelii*. *Academic Journal*. Vol.8 (25), pp. 2449-2457.
188. **Kahlmeter G., Brown D.F.J., Goldstein F.W., Mac Gowan A.P., Mouton J.W., Odenholt I., Rodloff A., Soussy C.J., Steinbakk M., Soriano F., Stetsiouk O., 2006.** Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2[6], 501-3.
189. **Kamguia Guifo H.F., Fokunang C., Ngameni B., Njinkio Nono B., Tembe-Fokunang., 2011.** Effet cytoprotecteur de l'extrait aqueux des racines de *Dorstenia psilurus* sur l'ulcère gastrique chez les rats mâles de la souche Wistar. *Journal of Medical and Health Sciences* Vol 12, No 4.
190. **Kanoun K., Belyagoubi-Benhammou N., Ghembza N., Atik Bekkara F., 2014.** Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf, stem and berry of *Myrtus communis* L. *Int Res Food J.*; 21:1957–1962.

191. **Karumi Y., Onyeyili P.A., Ougubuaaja V.O., 2004.** Identification of active principales of *M. balsamina* (balsam apple) leaf extract. J Med Sci;4(3):179-82.
192. **KBF (Klorane Botanical Foundation)., 2011. Les Plantes Médicinales Méditerranéennes, Institut Klorane En Europe., pp 40.**
193. **Khan H., Saeed M., Muhammad N., 2012.** Pharmacological and phytochemical updates of genus Polygonatum. Phytopharmacology, 3, 286-308.
194. **Kifayatullah M., Mustafa M.S., Senguptha P., Sarker M.M.R., 2015.** Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr in BALB/c mice J Acute Dis. 4 pp. 309-315
195. **Kirpensteijn Jolle., Terhaar Gert., 2015.** Guide pratique de gestion des plaies et chirurgie reconstructive chez le chien et le chat. MED'COM.
196. **Klotoé J.R., 2013.** "Etude ethnobotanique et propriétés hémostatiques de quelques plantes médicinales du Sud-Bénin", Thèse de doctorat Unique, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 217p.
197. **Koca Ufuk., Süntar Ipek Peşin., Akkol Esra Küpeli ., Yilmazer Demet, Murat Alpe., 2011.**Wound Repair Potential of *Olea europaea L.* Leaf Extracts Revealed by *In Vivo* Experimental Models and Comparative Evaluation of the Extracts' Antioxidant Activit. Journal of medicinal food 14(1-2), 140-6 January 2011.
198. **Kollii E Had.j, León F., Benayache F., Estévez S., Quintana J., Estévez F., 2012.** Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. J. Braz. Chem. Soc. vol.23 no.5.
199. **Konan NA., Bacchi.EM., Lincopan N., Varela SD., Varanda EA., 2007.** Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale L.*) J Ethnopharmacol.110:30–8.
200. **Krahwinkel DJ., Boothe H.W., 2006 .**Topical and systémic médicaments for wounds. Vet Clin North .Anim Pract, 36, 739-757.
201. **Krief S., 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) .Thèse de doctorat, septembre 2003, Ouganda.
202. **Kumar N.H., Kumar S.M., Rajnish S., Lal K.M., 2016.** Pharmacological investigation of the wound healing activity of *Cestrum nocturnum* (L.) Ointment in wistar albino rats. J Pharm 2016; 8:1-8.
203. **Kumar V, Abul K A, Fausto N, Mitchell R., 2007.** Robbins Basic Pathology, 8th Edition, 20-60.
204. **Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., 2005.** Hemodynamic disorders, thromboembolic disease, and shock. Robbins and Cotran pathologic basi of diseases, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia. Pages 119-44.
205. **Kundu A., Ghosh A., Singh N.K., Singh G.K., Seth A., Maurya S.K, Hemalatha S., 2016.** Wound healing activity of the ethanol root extract and polyphenolic rich fraction from *Potentilla fulgens*. Pharm Biol. 2016 Nov; 54 (11): 2383-2393.
206. **Lalami EL Ouali EL-Akhal A., Ouedrhiri F ., Ouazzani W ., Chahdi F ., Guemmouh R ., Greche H ., 2013 .**Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulagris et Thymus satureioïdis*. Les Technologies de Laboratoire: Volume 8, N°31.
207. **Lamblin F ., Hano Ch., Fliniaux O., Mesnar F., Fliniaux M –A ., Lainé É ., 2008.** Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers .Médecine/Sciences ; 24, 511-9.
208. **Landsdown A.B., Williams A., 2007.** Bacterial resistance to silver in wound care and medical devices. J. Wound Care; 16(1):15-9

209. **Lapraz j.C.L., Carillon A., Chastel B., 2011.** Quel avenir pour la plante médicinale dans l'union européenne ? Société Internationale de Médecine Endobiogénique et de Physiologie Intégrative.
210. **Le Courrier de L'Unesco N° 1979 :** Renouveau des plantes médicinales. Avicenne, Laboratoire végétal africain, Médecine Tibétaine, Pharmacopée de la mer.
211. **Le Hir., 1992.** Abrégés de pharmacie galénique » 6^{ème} édition. Ed Masson.
212. **Le Hir., 2001.** Abrégés de pharmacie galénique » 8^{ème} édition. Ed Masson.
213. **Le Hir., 2005.** Abrégés de pharmacie galénique » 8^{ème} édition. Ed Masson.
214. **Le Hir., Alain. Chaumeil Jean-Claude., Brossard Denis. 2008.** Pharmacie galénique. Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 9^{ème} édition. Ed Masson.
215. **LeBlanc P.P., Bélanger P.M., 1997.** Elimination, in Traité de biopharmacie et pharmacocinétique, 3rd ed Paris, France : Vigot, pp. 179–213.
216. **Lechaux David., 2017.** Le miel et la cicatrisation des plaies. Types de plaies, protocoles de soins et qualités pharmaceutiques requises pour l'usage medical du miel Posted on 19-Jul-2017.
217. **Lee KH., 1968.** Studies on mechanism of action of salicylates II, effect of vitamin A on wound healing. J Pharm Sci 1968; 57(7):1238-40.
218. **Lee RI., White P.D., 1913.** A clinical study of the coagulation time of blood. Am J Med Sci. 1913; 145: 495–503?
219. **Leela Hugar., Ramesh H., 2014.** Evaluation of Hemostatic Effect of Cynodon Dactylon Pers in Albino Rats. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences 2014; Vol.3, Issue 11, March 17; Page: 2711-2713.
220. **Lehot J., Arvieux C., 2011.** Réanimation et urgences. Springer Science & Business Media, 15 mars 2011, 562 pages.
221. **Libbey John., 2007.** Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. Eurotext; 1396 p.
222. **Lillo-Le LA., Lasne D., Rothschild C., 2006.** Bases pharmacologiques à l'utilisation des médicaments hémostatiques, Sang Thrombose Vaisseaux. Décembre 2006, 529-37. STV, vol. 18, n° 10.
223. **Linn A.K., Jain C.P., Gaur K., Jain A., Nema R.K., 2010.** Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of leaves of *Cassia grandis*. IJPCR, 2(3):106-8.
224. **Lrhorfi A F Z., Dahmani O., Elyahyoui A., Berrani A., Samama., S Kerrouri., 2016.** The Secondary Metabolites Composition of Extracts *Genista Quadriflora* of Morocco. European Scientific Journal .Edition, vol.12, N°30 ISSN: 1857 – 7881.
225. **Lwoff.J M., 1971.** Activité ulcérogène chez le rat. Fiche technique n°12, J.Pharmacol. Tome II (n°1) :81-83.
226. **Mabberley D. J., 1987.** The Plant Book, Cambridge University Press.
227. **Majeed W., Khaliq T., Aslam B., Khan J., Iftikhar A., 2015.** Medicinal plants with gastroprotective potential. Bangladesh Journal of Pharmacology: Vol 10, No 3.
228. **Majhenic, L., Kerget, M.S., Knez, Z., 2007.** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry.104, 1258–1268.
229. **Malik A., Hassan M., Channa H., Shoaib M.A., Gilani A. H., 2017.** Pharmacological basis for the medicinal use of polyherbal formulation and its ingredients in cardiovascular disorders using rodents. BMC Complement Altern Med. 2017; 17: 142.
230. **Manal M Hamed, Mona A Mohamed, Magda T Ibrahim., 2016.** Cytotoxic Activity Assesment of Secondary Metabolites from *Tecomaria capensis* v. *aurea*. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016; 8(7); 1173-1182.
231. **Manda P., Manda O ., Obouo M., Manda V., 2017.** Étude Des Toxicités Aigue Et Subaiguë Du Remède Nature Utilise Dans Le Traitement Du Paludisme. Rev. Ivoir. Sci. Technol., 29 145 - 158

232. **Maquart François-Xavier., 2015.** La matrice extracellulaire : un partenaire majeur de la cicatrisation des plaies. Bull. Acad. Natle Méd., 2015, 199, no 7, 1199-1209, séance du 13 octobre 2015
233. **Marmonier A. A., 1990.** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, technique usuelles, 227-236.
234. **Martindale. 1996.** The Extera Pharmacopoeia. Royal Pharmaceutical Society. 31th ed. London, p. 785-7.
235. **Martini Marie-Claude., 2011.** Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. Lavoisier, 1 janv. 2011, 500 pages.
236. **Massiot G., Morfaux A.M., Olivier L.M., Bouquant J., Madaci A., Mahamoud A., Chopova M., Aclinou P., 1985.** Guaianolides from the leaves of *Centaurea incana*. Phytochemistry, 25, 258-261.
237. **Mathew J, George R, Theruvil R, Tobin C, Padavil, Kurian A., 2016.** Antibacterial Activity of Leaf Extract of *Annona muricata* and *Simarouba glauca* on *Enterococcus faecalis*. The Journal of Contemporary Dental Practice, 17(8):650-653.
238. **McCord J.M., Fridovich I., 1969.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem, 244, 6049-6055.
239. **Médail F. Verlaque R., 1997.** Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southeast France and Corsica: implications for biodiversity conservation, Biological Conservation, n° 80, p. 269-281.
240. **Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R., Abdelly, C., 2014.** Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. Journal of Taibah University for Science (2014), JTUSCI-54, p: 9.
241. **Medjroubi K., Benayache F., Benayache S., Akkal S., Khalafallah N., Aclinou P., 1997.** Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Phytochemistry 1997; 45 (7) :1449-51.
242. **Mehinagic E., Bourles E., Jourjon F., 2011.** Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture, Vol. 43 (6), 364–368.
243. **Méllissopoulos A., Levacher C., 1998.** La peau .Structure et physiologie page1. Edition, 2 Publishers, Tec & Doc Lavoisier.
244. **Merazi Y., Hammadi K., Fedoul FF., 2016.** Approche ethno-vétérinaire des plantes médicinales utilisées dans la région de Sidi Bel Abbes- Algérie .European Scientific Journal June 2016 edition vol.12, No.18 ISSN: 1857 – 7881,7431.
245. **Merrien A., Carre P., Quinsac A., 2012.** Des ressources oleagineuses variees potentiellement au service du developpement de la chimie verte.
246. **Metowogo K., Lawson-Evi P., Ekl-Gadegbeku Kwashi., 2014.** Effet topique de l'extrait hydroethanolique de *l'acacia nilotica* sur la cicatrisation cutanee des brulures de second degre. European Scientific Journal. Edition vol.10, No.30.
247. **Michel Thomas., 2011.** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaë rhamnoides). Thèse Doctorat de l'université d'Orléans. Option Chimie Analytique – Phytochimie.
248. **Migdal C., Serres M., 2011.** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. Médecine/sciences. 2011; 27: 405-12.
249. **Milatova E., Milata V., 2013.** Warfarin - its synthesis and properties in a twenty year retrospective. Ceska a Slovenska Farmacie, 62(3), 111-9.
250. **Miliauskas G., Venskutonis P. R., Van Beek T. A., 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem, 85: 231–237.

251. **Miranda A Le M M., Alves Cowart K., Rodenburg D., McChesney J D., 2015.** Gastroprotective activity of the hydroethanolic extracts and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell. J Ethnopharmacol. 172, 421–429.
252. **Miranda M. A., Lemos M., Cowart K. A., Rodenburg, D., McChesney J. D., Radwan M. M., Bastos, J.K., 2015.** Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell. Journal of Ethnopharmacology, 172, 421-429.
253. **Mohamed I., Shuid A., B Borhanuddin., N Fozi., 2012** .The Application of Phytomedicine in Modern Drug Development. The Internet Journal of Herbal and Plant Medicine. Volume 1 Number 2.
254. **Mohan A., Pandurangan R., Ramalingam S., 2016.** In-Vitro Screening of Phyllanthus Amarus and *Eclipta Alba* against *Leptospira Autumnalis* .JMSCR Volume 04, Page 106-20.
255. **Mohsen T., Seyed O.N., Zatollah A., 2017.** Sub-chronic oral toxicity of *Cuminum cyminum* L.'s essential oil in female Wistar rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology.88 138 - 143
256. **Mondenard J., 2002.** Cortisone et corticoïdes. L'euphorie des performances mais aussi la certitude des défaillances et des complications. Le Courrier des addictions (4), n° 2, avril/mai/juin.
257. **Moran L.K., Gutteridge J.M., Quinlan G.J., 2001.** Thiols in cellular redox signalling and control. Curr Med Chem;8,763–72.
258. **Morand C., 2014.** Interest of flavonoid-rich foods to maintain cardiometabolic health Médecine des maladies Métaboliques , Octobre, Vol. 8 .
259. **Morel Y., Barouki R., 1998.** Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. Med Sci, Paris, 14, 713-21.
260. **Moretti C, Debitus C, FourneT A., Sauvain M, Bourdy G., Laurent D., 1993.** Diversité biologique tropicale et innovation thérapeutique, les recherches menées par l'ORSTOM. Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale, 73(3).
261. **Morgan K., 2002.** Medicine of the Gods: Basic Principles of Ayurvedic Medicine. Chapter 1 AbeBooks Seller Since.
262. **Moubayed N. M.S, Al Hourì H.J., Al Khulaifi M. M, Al Farraj Dunia A., 2017.** Antimicrobial, antioxidant properties and chemical composition of seaweeds collected from Saudi Arabia (Red Sea and Arabian Gulf). Saudi J Biol Sci. 2017 Jan; 24(1): 162–169.
263. **Mrabti H. N., Marmouz, I., Sayah K., Chemlal L., El Ouadi Y., Elmsellem H., Cherrah Y., Faouzi M. A., 2017.** *Arbutus unedo* L aqueous extract is associated with *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity. Journal of materials and Environmental Sciences, 8(1), 217-224.
264. **Mughrabi F.F., Hashim H., Ameen M., Khaledi H., Mohd A.H., 2011.** Effect of bis [benzyl N'-(indol-3-ylmethylene)-hydrazinecarbodithioato]-zinc (II) derivatives on wound healing in Sprague Dawley rats. Indian J Exp Biol. 49, 50–55.
265. **Mukinda J., Syce A., 2007.** Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. Journal of Ethnopharmacology.112 138 - 144
266. **Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D., Roussis V., 2009.** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupanetripenes. Journal of Ethnopharmacology; 6 (1): 42–48.
267. **Myers Norman, Russell A. Mittermeier, Cristina G. Mittermeier, Gustavo A. B. da Fonseca & Jennifer Kent., 2000.** Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403 pp: 853-858.

268. **Nagar H.K., Srivastava A. K., Srivastava R., Lal Kurmi M., 2016.** Pharmacological Investigation of the Wound Healing Activity of *Cestrum nocturnum* (L.) Ointment in Wistar Albino Rats. Journal of Pharmaceutics Volume 2016, 8 pages.
269. **Nedialkova Z K. Kondeva-Burdina M., Simeonov R, Tzankov V., Aluanib D., 2017.** A source of hepatoprotective flavonoids *Chenopodium bonus-henricus* L. Fitoterapia. Volume 118. Pages 13–20
270. **Newman D.J., Cragg G.M., 2012.** Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod; 75: 311–335.
271. **OCDE. 2008.** Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. In Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques Vol 1, number 4, pp 1-14. OCDE, Paris.
272. **OCDE., 2001.** Guidance document on acute oral toxicity testing. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris (2001)
273. **OECD., 2002.** Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment pp. 1–24.
274. **OECD., 2002.** Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals TG n° 405 – " Effet irritant / corrosif aigu sur les yeux". Adopté le 24 Avril, 2002, Paris.
275. **OECD., 2002.** Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals TG n° 404 – "Acute dermal irritation/ Corrosion. Adopted on Avril 24, 2002, Paris, and 12p.
276. **Oladipipo A. E., Saheed S., Abraham B. F., 2016.** Four weeks daily dose oral administration assessment of *Cyperus esculentus* L. aqueous extract on key metabolic markers of wistar rats. Pharmacologia. ;7(2-3):125–133. doi: 10.5567/pharmacologia.125.133.
277. **Omale J., Emmanuel T.F., 2010.** Phytochemical composition, bioactivity and wound healing potential of *Euphorbia heterophylla* (Euphorbiaceae). Leaf extract. Int J Pharm Biomed Res; 1(1):54-63.
278. **O.M.S., 1998.** Réglementation des médicaments à base de plantes. La situation dans le monde. Médicaments essentiels et produits de santé. 65 pages.
279. **Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 1987.** Guidelines for testing of chemicals. 1987, February. Acute Dermal Toxicity 402, 1–7.
280. **Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2000.** Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 24. Paris.
281. **Ouattara L.H, Kabran G.R.M., Guessenn N.K., Konan K.F., Mamyrbekova-Bekro J.A., 2016.** Activités antibactériennes *in vitro* des extraits d'écorces de racines de *Mezoneuron benthamianum* et de tiges de *Paullinia pinnata*: 2 plantes de la pharmacopée Ivoirienne. Revue CAMES – Série Pharm. Méd. Trad. Afr., 2016; 18(1) : 31-40.
282. **Oueslati, S., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Legault, J., Abdelly, C., Ksouri, R., 2012.** Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal Suaeda species and related phenolic compounds, Ind. Crops Prod, 2012; 36: 513-518.
283. **Ozbek H., Ozturk M., Ozturk A., Ceylan E., and Yener Z., 2004.** Determination of Lethal Doses of Volatile and Fixed Oils of Several Plants. Eastern J. Med. 9(1):4–6.
284. **PAGM De Smet., 1998.** Traditional pharmacology and medicine in Africa: Ethnopharmacological themes in sub-Saharan art objects and Utensils. J Ethnopharmacol. 63: 1-179.

285. **Paliwal S. K, Samriti S., Faujdar S .S., 2017.** Antioxidant and antibacterial activities of various extracts of *Inula cuspidata* C.B. Clarke stem. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. Volume 6, Issue 2, June 2017, Pages 97-105.
286. **Palta S., Saroa R., Palta A., 2014.** Overview of the coagulation. Indian J Anaesth 58(5): 515-523.
287. **Pattanayak S.P, Sunita P., 2008.** Wound healing, the anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. J Ethnopharmacol ; 120 (2):241-7.
288. **Picher M.T., Seoane E, Tortajada A., 1984.** Flavones, sesquiterpene lactones and glycosides isolated from *Centaurea aspera* var. *Stenophylla*. Phytochemistry 1984; 23(9):1995-8.
289. **Pierre P.J. Silva Da., Laurent Meijer., 2012.** Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique Med Sci (Paris); 28 : 534–542.
290. **Pietta R., Minoggio M., Bramati L., 2003.** Studies in Natural Products Chemistry Vol. 28. Atta-ur-Rahman (Ed.), Elsevier Science B.V.
291. **Pincemail J A.B., Karine BA., Cayeux K A., Defraigne J-OB., 2002.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. Nutrition clinique et métabolisme, 16 233–239.
292. **Pincemail J, Cillard J., 2014.** Mesure de la capacité antioxydante globale du plasma. Une revue critique Determination of the plasma global antioxidant capacity: Ann Biol Clin : a critical review , 72 (4) , 413-21.
293. **Pirvu L., Bubueanu C., Panteli M., Petcu L., Coprean Dragomir., 2015.** *Centaurea cyanus* L. Polysaccharides and Polyphenols Cooperation in Achieving Strong Rat Gastric Ulcer Open protection Chem; 13: 910–921
294. **Prasad K., Bisht G., 2011.** Evaluation of nutritive minerals and anti-oxidants values of *Euphorbia thymifolia* Linn. Curr Res Chem. 2011; 3:98-105.
295. **Price M.L., Van scoyoc S., Butler, L.G., 1978.** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, J. Agric. Food Chem, 26: 1214-1218.
296. **Puisieux F., Roblot T., 1989.** Vectorisation et vecteurs de médicament. STP Pharma, 5, 107-113.
297. **Pushplata C., Pawar R., Limaye D., Joshi Y. M., Vilasrao K ., 2014.** In-Vitro Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Centaurea behen*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 02 (04); 2012: 106-110.
298. **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.
299. **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.
300. **Quyoub A., 2003.** Mise au point d'une base de données sur les plantes médicinales. Exemple d'utilisation pratique de cette base. Thèse de Doct. Univ. Ibn Tofail. Fac. Sci. Kénitra, Maroc. 110 p.
301. **Ramos S., 2007.** Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. J. Nutr. Biochem. 18,427.
302. **Raven. 2013.** Composition moléculaire des cellules végétales Biologie végétale 3e édition.
303. **Ravina Enrique., 2011.** The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
304. **Rebey B . Bourgoulmen S ., Debez I ., Ben Slimen J Karoui I ., Hamrouni Sellami., Msaada K., 2012.** Effects of Extraction Solvents and Provenances on Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Cumin (*Cuminum cyminum L.*) Seeds. Food and Bioprocess Technology. October 2012, Volume 5, Issue 7, pp 2827–2836.
305. **Reinkes J.M, Sorg H., 2012.** Wound repair and regeneration .Eur Surg, 49:35-43.
306. **Revel T. K., 2004.** Doghmi Physiologie de l'hémostase EMC-Dentisterie 1 71–81.

307. **Revu J., 2009.** Hidradenitis suppurativa. Journal European Academy of Dermatology and Venereology JEADV 2009, 23, 985–998.
308. **Riahi L., Elferchichi M., Ghazghazi Hanene., Jebali Jed., Ziadi Sana., Chedia Aouadhi., 2013.** Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia L.* in Tunisia. Industrial Crops and Products 49 (2013) 883–889.
309. **Roze L.V., Chanda A., Linz J.E., 2011.** Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. Fungal Genetics and Biology, Vol. 48, p. 35–48.
310. **Russo-Marie Françoise., John Libbey Eurotext., 1998 .**L'inflammation pages 165-166.
311. **Salhi S., Fadli M ., Zidane L ., Allal D ., 2010.** Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc) LAZA .V31.9.
312. **Santelli M ., 2012.** Chimie bio-organique .Lavoisier, 16 juil. 2012, 384 pages.
313. **Sanwal R., Chaudhary A.K., 2011.** Wound healing and antimicrobial potential of *Carissa spinarum Linn.* In albino mice. J Ethnopharmacol; 135(3):792-6.
314. **Sarker S.D., Laird A., Nahar L., Kumarasamy Y., Jaspars M., 2001.** Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). Phytochemistry, 57, 1273-1276.
315. **Sathish D., Himabindu S., Shravan Kumar Y., Madhusudan Rao Y., 2011.** Floating drug delivery systems for prolonging gastric residence time: a review. Current drug delivery. 2011; 8(5):494–510.
316. **Sauvion N., André P C., Thierry D., Marion F P., 2013.** Interactions insectes-plantes. Editions Quae, 2013 - 784 pages.
317. **Saxena M ., Saxena J ., Nema R ., Singh D , Gupta., 2013.** Phytochemistry of medicinal plants. J Pharmacogn Phytochem. 1,168-182.
318. **Scepi M., 2013.** Principes de la consolidation osseuse et ligamentaire appliqués à la cheville traumatique Prise en charge aux urgences .Traumatisme de la cheville, pp 17-21, Springer-Verlag Paris.
319. **SchauenberG P., Paris F., 2005.** Guide des plantes medicinales. Paris :Delachaux et Niestle, 396p
320. **Schauenberg Paul, Delachaux., 2005.** Niestlé Guide Des Plantes Médicinales - Analyse, Description et Utilisation de 400 Plantes.
321. **Schwartz P., Alexeline P., Hecker M., 2013.** Thérapeutique pharmacologie module. Editions, Vernazobres-Grego, 11 CSCT, page 141, page 292.
322. **Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S., Nacro M., 2008.** Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du burkina faso. Pharmacopée et médecine traditionnelle africaines, 15: 41- 49.
323. **Sévenet, T., Tortora C., 1994.** Plantes, molécules et médicaments. Nathan, CNRS. Editions.Paris.
324. **Shailajan S., Gurjar D., 2016.** Wound healing efficacy of *Mimusops elengi L* flowers in albino Wistar rats using excision wound model. Pharmacogn Commn. 2016; 6:72–9.
325. **Sharififar F., Dehghn-Nudeh B.G., Mirtajaldini M., 2009.** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium L.* Food Chem.112:885–888.
326. **Sherwood Lauralee., 2015.** Physiologie humaine .De Boeck Supérieur, page 317 : 746
327. **Shoeb M., MacManus S.M., Jaspars M., Trevidu J., Nahat L., ThooLin P.K., Sarker S.D., 2006.** Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cell. Tetrahedron 62:11172–11177 4.
328. **Singh A.G., Kumar A., Tewari D.D., 2012.** An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Terai forest of western Nepal Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 8:19.

329. **Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
330. **Skaltsa H., Lazari D., Panagouleas C., Georgiadou E., Garcia B., Sokovic M., 2000.** Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry*, 55,903-908.
331. **Skliar M.L., Toribio M.S., Oriani D.S., 2005.** Antimicrobial activity of *Centaurea diffusa*. *Fitoterapia*. 76,737-739.
332. **Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C., 2002.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med*, 33, 575-586.
333. **Sokmen A., Gulluce M., Akpulat H.A., 2004.** The in vitro antibacterial and antioxidant activity of the essential oils and methanol extracts of endemic *thymus spathulifolius* Food control .15:627-634.
334. **Sokovic M., Ciric A., Glamoclija J., Skaltsa H., 2017.** Biological Activities of Sesquiterpene Lactones Isolated from the *Genus Centaurea L.* (Asteraceae). *Curr Pharm Des.* 2017;23(19):2767-2786.
335. **Sowemimo A., Samuel F., Fageyinbo M.S., 2013.** Anti-inflammatory activity of *Markhamia tomentosa* (Benth.) K. Schum. Ex Engl. ethanolic leaf extract. Format: AbstractSend to *Journal Ethnopharmacol.* 2013 Aug 26; 149(1):191-4.
336. **Spichiger Rodolphe-Edouard., Vincent V., Savolainen., Murielle Figeat-Hug., Daniel Jeanmonod., 2002.** Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales .PPUR presses polytechniques, 413 pages.
337. **Springob K., Kutchan T.M., 2009.** Introduction to the Different Classes of Natural Products. In: Osbourn AE et Lanzotti V, éditeurs. *Plant-derived Natural Products; Synthesis, Function, and Application.* London New York, Springer, p. 4 – 17.
338. **Squarcioni Catherine., 2006.** Histologie de la peau et des follicules pileux, *médecine/sciences*, 22, 131-7.
339. **Stanković M. S., 2011.** Total phenolic content, flavonoïd concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum L.* extracts, *Kragujevac. J. Sci.*, 3363-72.
340. **Stevens A., James L., Barbara Y., 2004.** Anatomie pathologique .De Boeck Supérieur, 26 avr. 2004, page 10.304 pages.
341. **Stora Denis., 2013.** Pharmacologie et thérapeutique. 2e édition - Editions Lamarre240 pages.
342. **Strobe G. Strobel G., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R.S., Hess W.M., 1996.** Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an *endophytic fungus of Taxus wallachiana*, *Microbiology*, Vol 142: 435-440.
343. **Suhartono E., Viani E., Apriyansa R, M., ISyahuri G., Rakhman M Farid., 2012.** Screening of Medicinal Plant for Total Flavonoid and Antioxidant Activity in South Kalimantan of Indonesian. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, Vol. 3, No 4.
344. **Sunita S., Deepti G., 2016.** Wound healing activity of *Chrysophyllum cainito L.* Leaves: Evaluation in rats using excision wound model. *J Young Pharm*; 8(2):96-103.
345. **Suntar I., 2014.** The Medicinal Value of Asteraceae Family Plants in Terms of Wound Healing Activity. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 39, 21-31, 2014.
346. **Suntar I.P., Akkol E.K., Yilmazer D., Baykal T., Kirmizibekmez H., Alper M., Yesilada E., 2010.** Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum L.* *J Ethnopharmacol.* 127:468–477.
347. **Switzer BR., 1991.** Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem* 1991; 2(4):229-31.

348. **Tabuti J.R.S., Kukunda C.B., Kaweesi D., Kasilo O.M.J., 2012.** Herbal medicine use in the districts of Nakapiripirit, Pallisa, Kanungu, and Mukono in Uganda *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8-35.
349. **Tekeli Y., Zengin G., Aktumsek A., Sezgin M., Torlak E., 2011.** Antibacterial activities of extracts from twelve *centaurea* species from turkey. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 63 (3), 685-690.
350. **Tekwu, E.M., A.C. Pieme, and V. P. Beng., 2012.** Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *J. Ethnopharmacol.*142:265–73.
351. **Tešević V, Aljančić I, Milosavljević S, Vajs V, Đorđević I, Jadranin M, Menković N & Matevski V., 2014.** Secondary metabolites of three endemic *Centaurea* L. species. *Journal of the Serbian Chemical Society* 79: 1355–1362.
352. **The Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labelling of Chemicals., 2011.** 4th revised edition. New York and Geneva: United Nations;. pp. 109–110.
353. **Tilburt J. C., Kaptchuk T. J., 2008.** Herbal medicine research and global health An ethical analysis. *Bull World Health Organ* ,86(8),594–9.
354. **Toé S., 2004.** Essais de Mises au point de formulation de Cremes et Laits Corporels à base du Beurre De Karite Du Burkina Faso. These de Doctat en Pharmacie. Uninersite De Ouagadougou.
355. **Togola A., Korotimi K., Adama D., 2014.** effet protecteur des feuilles de *Opilia celtidifolia* contre l’ulcère induit par l’éthanol chez le rat .*Int. J. Biol. Chem. Sci.* 8(6), 2416-2423, December 2014.
356. **Torres-González L., Munoz-Espinosa L.E., Rivas-Estilla A.M., Trujillo-Murillo K., Salazar-Aranda R., Waksman De Torres N., Cordero-Pérez P., 2011.** Protective effect of four Mexican plants against CCl4-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Ann. Hepatol.* 10, 73–79.
357. **Tortora Gerard J., Bryan Derrickson., 2017.** Manuel d'anatomie et de physiologie humaine .De Boeck Supérieur, page 125. 824 pages.
358. **Touaibia F., Chaouch Z., 2017.** Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Myrtus nivellei*. *Phytothérapie*, (15) 16-22.
359. **Trduyer J.M., 2000.** Réanimation Urgences. Pharmacologie des corticoïdes chez l’enfant et l’adulte. 9 : 639-45
360. **Trduyer J.M., 2000.** Réanimation Urgences. Pharmacologie des corticoïdes chez l’enfant et l’adulte. 9: 639-45 ologie, 54, page212-217.
361. **Trease G.E., Evans W.C., 2002.** Pharmacognosy. 15th Ed. London: Saunders Publishers; pp. 42–44. 221–229, 246–249, 304–306, 331–332, 391–393.
362. **Tréchet J.Y., Jouzeau. 2014** .Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. *Revue française d’allerg*
363. **Tubaro A., Dri P., Delbello G., Zilli C., Della Loggia R., 1986.** The croton oil ear test revisited. *Agents Actions* 1986;17(3-4):347-9.
364. **Vandamme., Rival., Pabst., Heitz., 2010.** Initiation à la connaissance du médicament. 337 pages, Edition Lavoisier.
365. **Verbois Sylvie., 2003.** Huiles essentielles et parfums qui guérissent et relaxent: la voie de l'ayurveda. La médecine indienne Fondements et pratiques de l’Âyurveda. Editions Trajectoire – 2001
366. **Vercauteren J., Catherine Chèze., 1996.** 18th International Conference on Polyphenols, Bordeaux (France), July 15-18. Editions Quae, 1998 - 289 pages
367. **Verpoorte R., 2000.** Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. *J. Pharmacol.* 52,253-262.

368. **Versteeg H.H., Heemskerk J.W., Levi M., Reitsma P.H., 2013.** New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.*, 93(1), 327-58, 2013.
369. **Weill B., Frédéric B., 2003.** Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur, 12 mars 2003, page 16. 312 pages.
370. **Wendum D., 2013.** Ouvrage Anatomie pathologique. Collège français des pathologistes. (CoPath). Figure 4.25.
371. **Wheater P R., Young B., O'Dowd G. Woodford P. 2015.** Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater .De Boeck Supérieur, page 168. 455 pages.
372. **Wheater P R., Young B., O'Dowd G, Woodford P. 2015.** Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater .De Boeck Supérieur, page 168. 455 pages.
373. **Williamson E. M., 2001.** Medicinal plants of the world. Volume 2. Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Ivan Ross. Humana Press.
374. **Wong S.P., Lai P.L., Jen H.W.K., 2006.** Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 2006; 99:775–783.
375. **Zeggwagh AA., Lahlou Y., Bousliman Y., 2013.** Enquête sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie utilisée par un herboriste à Fes, Maroc. *The Pan African Medical Journal.* 14:125.
376. **Zeghal K.M., Sahnoun Z., 2013.** La réaction inflammatoire et le stress oxydant. In: *Abrégé de physiologie à l'usage des acupuncteurs et des réflexothérapeutes. Médecines D'Asie, Savoirs & Pratiques*, vol 2. Springer, Paris.
377. **Ziegler J., Facchini P.J., 2008.** Alkaloid Biosynthesis. *Metabolism and Trafficking. Annu Rev Plant Biol.* Vol 59, 735-769.

Annexes

Questionnaire décrit par Benkhniq et al. (2010,2011)

- Date.....
- Commune.....
- Auteur.....
- Lieu dit.....
- Numéro de relevé.....

Informateur :

- Age :
- Profession :
- Situation familiale : Célibataire Marié
- Sexe : Masculin Féminin
- Niveau académique : Néant Primaire Secondaire Universitaire
- Localité : Douar Village Ville Nomade
- Médecine traditionnelle Médecine moderne
- Les deux
- Raison

Matériel végétal :

- Nom vernaculaire :
- Nom scientifique :
- Type de plante :
- Sauvage Cultivée Adventice
- Usage de la plante :
- Thérapeutique Cosmétique Autres
- Technique de la récolte :
- Manuel Mécanique
- Moment de la récolte (saison) :
- Plante seule Association possible (de plantes) :
-
- État de la plante : Fraîche Desséché Après traitement
- Si desséché, méthode de séchage :
- Partie utilisée : Tige Fleurs Fruits Graine Écorce Rhizome Bulbe
- Feuilles
- Plante entière Autres combinaisons :
- Forme d'emploi : Tisane Poudre Huiles essentielles
- Huiles grasses Extrait (teinture, solution, gélule) :

▪ Mode de préparation : Infusion Décoction Cataplasme Cru Cuit

Autres :

▪ Dose utilisée :

▪ Pincée poignée Cuillerée

▪ Dose précise :

▪ Quantité en g / verre :

▪ Quantité en g/ litre :

▪ Autres :

Mode d'administration : Oral Massage Rinçage Badigeonnage

Autres :

▪ Posologie : nombre de prise par jour.

Pour qu'elle espèce BV OV CN CT

Durée d'utilisation (durée de traitement) :

Un jour Une semaine Un mois Jusqu'à la guérison

▪ Méthode de conservation :

A l'abri de la lumière Exposé à la lumière Autres :

Utilisation :

▪ Type de maladie :

▪ Affections dermatologiques ▪ Affections des tubes digestifs

▪ Affections respiratoires ▪ Affections des glandes

▪ Affections cardio-vasculaires annexes du tube digestif

▪ Affections génito-urinaires ▪ Affections neurologiques

▪ Affections ostéo-articulaires

▪ Affections métaboliques

▪ Diagnostic Par :

Lui-même Le vétérinaire L'herboriste Autres :

▪ Résultats : Guérison Amélioration Inefficace

▪ Effet secondaires :

▪ Toxicité :

▪ Précaution d'emploi :

Publication

IN VIVO EVALUATION OF WOUND HEALING AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACT OF ROOTS OF *CENTAUREA AFRICANA* (L.) IN TOPICAL FORMULATION

MOHAMED ZAOUANI^{1*}, AREZKI BITAM², AHCEN BAZ³, YASMINE BENALI⁴, MERIEM HIND BEN-MAHDI¹

¹Research Laboratory of Health and Animal Production, National Higher Veterinary School of Algiers, Issad Abbes, Oued Smar, Algiers, Algeria. ²Department of Food Technology and Human Nutrition, Agronomic Higher National School El-Harrach, Algiers, Algeria.

³Department of Biology, Laboratory of Animal Physiology and Cell Signaling, ENS Kouba, Algiers 16000, Algeria. ⁴Department of Veterinary Pathology, Laboratory of Cytopathology Veterinary, Pasteur Institute of Algiers, Algeria. Email: m.zaouani@ensv.dz

Received: 28 September 2016, Revised and Accepted: 06 October 2016

ABSTRACT

Objective: The present study was to evaluate the anti-inflammatory and wound healing activities of methanolic extract of *Centaurea africana* roots in albino Wistar rats.

Methods: Following extraction of the *C. africana* roots with 80% methanol, the extract was formulated as an ointment (5% and 10% w/w). The ointment was then evaluated for wound healing activity using excision and incision wound models. Parameters, including wound contraction, epithelization time, histopathologically, and hydroxyproline content, were determined using the excision model, whereas tensile strength was measured from the incision model. In parallel, edema of the ear, locally induced by croton oil, was studied for the assessment of anti-inflammatory activity.

Results: Wound treated with 5% and 10% methanolic extract ointment exhibited a significant wound healing activity in both models as evidenced by increased wound contraction, shorter epithelization time, higher tissue breaking strength, and increased hydroxyproline content. The methanolic extract also produced dose-related significant reduction ($p < 0.001$) of inflammation.

Conclusion: Results of the present study revealed that *C. africana* displays remarkable wound healing and anti-inflammatory activities.

Keywords: Anti-inflammatory activity, *Centaurea africana* roots, Methanolic extract, Incision and excision wound model.

© 2017 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i1.15436>

INTRODUCTION

The plant world is an inexhaustible source of biologically active molecules to discover, and the pharmaceutical chemistry builds on these models in its designs requiring scientific validation. Several drugs obtained from plant sources are known to increase the healing of different types of wounds [1]. Moreover, herbal medicine is less toxic and less costly when compared to synthetic drugs [2]. Among these plants, we cite a plant which is traditionally used for the treatment of wounds, cuts, and burns in Algeria, *Centaurea africana* of the family Asteraceae, endemic of North Africa, hence the name africana [3]. This plant was the subject of many botanical and chemical investigations while its biological activities are still little studied. The species of *Centaurea* revealed their richness in secondary metabolites such as the lactones, the sesquiterpenes [4,5], sterols [6,7], the phenolic compounds of flavonic type and at a lesser degree, and the alkaloids [8]. Similarly, they have demonstrated their activities: Antirheumatic, anti-inflammatory, digestive, antibacterial, and antipyretic [9]. We are unable to find any information on the wound healing properties of this plant. The aim of our work is, therefore, an attempt to assess the healing and anti-inflammatory properties by topical of a methanolic extract-based ointment, of the roots of *C. africana*, at two concentrations: 5% and 10%.

METHODS

Plant material

The plant material is composed of the roots of *C. africana* var. africana (Bonnet) M, harvested in June 2014, in the region of Kabylie (Draa El Mizan), located at 42 km Southwest of TiziOuzou and at 110 km Southeast of Algiers, Algeria. The plant has been identified by Doctor

Belmokhtar, Botanist Researcher at the Laboratory of Botany located at the Faculty of Pharmacy in University of Algiers. A specimen of this plant has been authenticated by comparison with that recorded in the herbarium of the National Superior School of Agronomy of Algiers.

The roots have been dried, sheltered from the sun and at room temperature, then finely grounded, and stored in sterile vials and sealed.

Preparation of extract and ointment

A volume of 50 g of powder has been put in maceration in a mixture of 500 ml of methanol-water solution (80:20 v/v) then with stirred for 72 hrs at room temperature and protected from light. After filtration, the obtained extract has been subjected to evaporation under reduced pressure using a Rotavapor of type (Heidolph Laborota 4000) at 40°C then lyophilized by using the lyophilizer (VirTis benchtop K) for 12 hrs. The extraction yield has been calculated from the powder of the lyophilized *C. africana* roots.

Two ointments, of 5% and of 10% concentration, were prepared. The formula and proportions used for the preparation of the ointment are reported in Table 1.

The simple ointment of the 80% methanolic extract has been prepared following the formula indicated in Table 1. It should be noted that this formula is described in the British Pharmacopoeia [10]. It must be signaled that the three ointment preparations weigh 200 g each, with 5% and 10% w/w and the simple vehicle ointment, with 0% w/w, serves as a witness. The extract was prepared using the reduced formula the master formula (MF) (Table 1).

The four key steps of the adapted operative mode in this study are the weighing of the different raw materials, according to the quantities mentioned in the formula indicated in Table 1 followed by melting and mixing. The first mixture consists of melting, with stirring, the liquid paraffin, and the cetyl alcohol at 80°C. Thereafter, we proceeded with the preparation of the second mixture and this on the eve of the formulation by fluidizing the lanolin and the petrolatum by using a hot plate. The two resulting mixtures have been homogenized by a propeller stirrer IKA (Labortechnik Staufen, Germany). The ointment has been obtained by adding the principle active, 10 g and 20 g, of an 80% methanolic extract in 190 g and 180 g, respectively, in the base ointment. The mixture has been cooled prior to 50°C and maintained stirred at 80 rev/m to obtain a homogeneous product. In preparing the vehicle ointment, 200 g of the base ointment was collected and treated in the same way with which the ointment, without active ingredient (MF), has been formulating [11].

Preliminary phytochemical screening

Secondary metabolites existing in the extract of the powder of the studied roots have been identified by characterization tests based on the coloration reactions and/or precipitation according to the standard procedure previously described [12,13]. The tannins and polyphenols have been highlighted by the ferric chloride test. The Liebermann-Burchard test allowed the characterization of the triterpenes and steroids. The appearance of foam after shaking the extract allowed us to identify the saponins. It must be signaled that the flavonoids have also been characterized [14].

Evaluation of acute toxicity

In this evaluation, two processing modes have been studied; one by contact and the other by ingestion of the *C. africana* powder roots.

Experimental animals

The study has been performed on albinos Wistar rats which were purchased from Pasteur Institute of Algiers, aged about 3 months, and weighing (200±20 g). After an adaptation period of 10-day, the witness animals and treated animals have been isolated in cages with water and food. The food used is a standard diet, supplied by the National Office for Animal's Feed, situated at Bejaia in Algeria. The study animals were used to identify different activities such as the acute toxicity, anti-inflammatory activity, and the healing wound activity, which have been subjected to identical experimental conditions of temperature (21°C±2°C), hygrometry (55-60%), and the photoperiod with a 12 hrs daylight/dark cycle. The experiments have to be carried out as per instructions, partly from the Institutional Animal Ethical Committee (I.A.E.C), and another part from the National Instructions on the Care and Use of Laboratory Animals.

Acute toxicity study

The acute toxicity test has been performed according to the toxic class method 423 as per the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines. The methanolic roots extract of *C. africana* was given orally in a single dose of (2000 mg/kg) body weight to a treated group of 10 rats. The witness group (with n=10) received only water. The rats have been placed under observation continuously for 24 hrs after treatment and for 14 days for changes in signs and symptoms and mortality.

Acute dermal toxicity

The evaluation of dermal acute toxicity has been carried out according to the toxic class method 402 as per the OECD guidelines. A total of 10 (5 females and 5 males) rats were used. Animals showing normal skin texture were housed individually in a cage and acclimatized to the laboratory condition for 5 days prior to the test. Around 10% of the body surface area fur was shaved 24 hrs before the study from the dorsal area of the trunk of the test animals. A limit test dose (2000 mg/kg) of the 10% formulation was applied uniformly over the shaved area for 24 hrs. The rats were maintained under observation during a period of 14 days to detect any possible skin reaction and to report any registered mortality.

Anti-inflammatory activity

Topical anti-inflammatory activity was evaluated as inhibition of the croton oil-induced ear edema in rats [15]. Male Wistar rats were used for the study and divided into four groups of six rats each. Group-I: Control group, applied with sample ointment base+croton oil solution, Group-II: Standard Voltaren® Emulgel 1% (diclofenac sodium topical gel) novartis+croton oil solution. Group-III: Ointment extract 5%+croton oil solution and Group-IV: Ointment extract 10%+croton oil solution. For tests in rats, the following croton oil solution was prepared (v/v): 4 parts croton oil, 10 parts ethanol, 20 parts pyridine, and 66 parts ethyl ether. The standard drug and the test extract were dissolved in this solution. Formulation of each extract was applied after application of croton oil irritant solution. The test compounds and standard drug diclofenac were dissolved in a concentration of 10 mg/ml in the irritant solution. Irritant solution (0.02 ml) was then applied on both sides of the right ear (RE). The left ear remained untreated. The irritant solution was applied under ether anesthesia. 6 hrs later, the animals were killed by cervical dislocation; the right and left ears of each animal were removed. The left ear (LE) was considered as a control. Circular sections were taken with a cork borer (diameter of 7 mm) and weighed. The anti-inflammatory effect has been determined by expressing the change in weight of the treated ear as compared to the untreated ear and also the control group. The data are expressed as mean±standard error of the mean.

The edematous response was measured as the weight difference between the two plugs.

$$\% \text{ of edema} = \frac{\text{RE} - \text{LE}}{\text{LE}} \times 100$$

The percentage of reduction of edema in the treated rats (T) compared with controls (C) has been calculated by using the following relation:

$$\% \text{ reduction of edema} = \frac{\% \text{ edema C} - \% \text{ edema T}}{\% \text{ edema C}} \times 100$$

Excision wound model

The healing wound activity from the excision model in rats has been studied by the daily application of the prepared ointment with based methanolic extract at (5%, 10%), the Cycatril® reference product and of the vehicle ointment without extract on the circular wounds of 2.5 cm in diameter (500 mm² surface) and of 2 mm of the depth at the dorsal-cervical region on previously shaved and anesthetized rats by injection of Ketamine® by intraperitoneally at a dose of (150 mg/kg) [16].

The animals were divided into four groups in individual cages; each group contains six animals. Group-I (control) received an application of sample ointment base. Group-II (standard) received the application of standard drug (Cycatril®). Group-III received the application of formulation at 5% ointment and Group-IV received formulation at 10% ointment. The various parameters such as wound contraction percentage, epithelialization period, hydroxyproline content, and histopathology of granular tissues were evaluated.

The percentage of wound closure has been calculated using the following formula [17].

$$\text{Wound closure on day N} = \frac{\text{Area on day 0} - \text{Open area on day N}}{\text{Area on day 0}} \times 100$$

Incision wound model

The distribution of the different groups has been made the same way than in the case of the skin excision model. After waxing and anesthesia by Ketamine® (150 mg/kg), a longitudinal incision of 5 cm length was made through the skin and cutaneous muscle at a distance of about 1.5 cm from the midline of each side on the back depilated immediately

after, the wound was connected with staples at 0.5 cm of intervals to ensure its proper closure. The ointment with methanolic extract at (5% and 10%), the Cycatril® reference product and the vehicle ointment have been applied once daily for 9 days [18]. When wounds were cured thoroughly, the sutures were removed on the 9th day, and tensile strength was measured with a tensiometer using Lee method [19].

Hydroxyproline content

The hydroxyproline is a basic constituent of collagen [20]. The collagen content of granulation tissue has been determined by estimating the content of hydroxyproline [21]. On the 12th day of observation, the animals from each group were sacrificed through an overdose of anesthesia of ketamine hydrochloride (150 mg/kg) and xylazine hydrochloride (25 mg/kg). Once the samples of the scar were removed, the hydroxyproline content of the granulation tissue has been measured after hydrolysis of the samples in the HCl-6 N at 105°C for 18 hrs. The hydroxyproline was oxidized by chloramine-T (1.4% w/v in acetate citrate buffer, pH 6.0) and incubated for 20 minutes in the reactant, Ehrlich type, à 60°C. After acid extraction with toluene, the hydroxyproline in each tissue sample was deduced from a standard calibration curve. The hydroxyproline rate has been expressed in milligrams per gram of dry tissue weight.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed by using one-way analysis of variance followed by Dunnett's test for individual comparison of groups with control. $p < 0.001$ was considered as significant.

Histopathological studies

On the 12th day, the granulation tissues of all groups of animals, in the excision model, were quickly removed, washed in 0.9% NaCl solution, fixed in 10% formalin, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections of 5 µm have been colored with hematoxylin and eosin.

The histopathological examination was applied to determine the regeneration of collagen, the infiltration of the fibroblasts, the neovascularization, and the epithelialization in the zone of the wounds compared to the control group and treated group with Cycatril® reference product.

RESULTS

Qualitative phytochemical screening

The results of the preliminary phytochemical screening confirm the presence of several chemical groups that might be responsible for the pharmacological activities. The results revealed the presence of the flavonoids, tannins, anthocyanins, leucoanthocyanin, coumarin, glycosides, terpenoids, quinones, and saponins. The extraction yield was evaluated 9.7%.

Acute dermal toxicity study

No mortality signs or even clinical signs of toxicity such as the irritation, sensitivity, redness, and the inflammation were registered during the 14 days of observation. This allowed us to estimate that the acute toxicity found is >2000 mg/kg.

Acute oral toxicity study

No mortality was recorded in these animals up to 14 days. Thus, the methanol extract was found to be non-toxic up to a dose of 2000 mg/kg body weight.

Anti-inflammatory activity

The results of the anti-inflammatory activity of the methanolic extract of the roots of *C. africana* at a concentration of 5% and 10% are illustrated in Table 2. The reference drug was found to be comparatively more potent as compared to the formulated ointment of 5% and 10%. In addition, the percentage reduction of edema is higher in the case of the ointment at 10% than that of 5%. The anti-inflammatory activity is concentration dependent.

Incision wound model

Table 3 shows the effects of 5% and 10% *C. africana* topical ointment on wound healing activity in rats inflicted with incision wound. In our study, the tensile strength of skin was found to be significantly increased ($p < 0.001$), in standard Cycatril®, 5% extract ointment and 10% extract ointment groups when compared with the control group of animals. The tensile strength of animals treated with the standard drug was higher than the 5% extract-treated animals although no apparent difference was detected with 10% formulation of the extract. These observations of incision wound model confirm the prohealing effect of the application of the ointment with based methanolic extract as observed in excision wound model.

Excision wound model

The methanolic extract 80% of the roots of *C. africana* formulated by ointment was presented in Table 4 and Fig. 1. It was observed that the wound contracting ability of the extract ointment in both concentrations were significantly greater ($p < 0.001$) on days 4, 8, 12, and 16 compared to the control group (sample ointment base). This was shown by the percentage of wound closure and epithelialization period that indicates the rate at which wound healing was progressed. The animals treated with ointment 10% of methanolic extract shown the healing of wound completed within 17 days compared to standard reference Cycatril® Group-II took 18 days for the complete wound. The epithelialization period was found to be less ointment extract 5% methanolic extract (20 days). All the recorded observations confirmed that the extract ointment at 10% is found to be the most potent.

Effect on hydroxyproline content in rats

The hydroxyproline content of the granulation tissue followed the same pattern as that of wound contraction (Table 5). The highest concentration of hydroxyproline is seen in the case of animals, which received with ointment extract 10%, was comparatively more significant. Followed by animals treated with Standard Cycatril® and animals treated with ointment extract 5%. The animals which receiving no treatment have the lowest content of hydroxyproline.

Histopathology

The histopathology study of excision wound skin at day 12 stained with hematoxylin and eosin ($\times 25$) granulation tissue sections is presented in Fig. 2. Control rats (Fig. 2a) showed the presence of acute inflammatory, fibroblastic connective tissue, and very less number of blood vessels. The collagen fibers could not be distinguished to indicate incomplete healing of the wound in the control animals. Granuloma tissue of the animals treated with ointment extract 5% (Fig. 2b) showed incomplete epithelial cells, fibrosis, and mild edema with lymphoid cells. Ointment extract 10% (Fig. 2c)-treated animals showed a moderate amount of collagen and fibroblasts and increased number of blood vessels. The reference ointment (Cycatril®) (Fig. 2d) showed a large amount of granulation tissue, re-epithelialization, and a small number of inflammatory cells.

DISCUSSION

The pharmacological potentialities of methanolic extract of the roots of *C. africana* determined in this study are due principally to the presence of this extract of secondary metabolites such as flavonoids, coumarin, terpenoids, and tannins. These have been identified from the preliminary phytochemical screening of the methanolic extract of the study as indicated above. Indeed, tannins and flavonoids are reported to inhibit prostaglandin synthesis [22] and also known for their role in the strengthening of the healing process of the wound, mainly due to their antimicrobial property [23] and also the flavonoids and triterpenoids are also known as active compounds promoting the healing process because of their astringent and antimicrobial properties [24,25].

In the present study, the topical application of the ointments of the methanolic extract of the roots of *C. africana* promoted the healing of the wound as evidenced by the increase of wound contraction during the

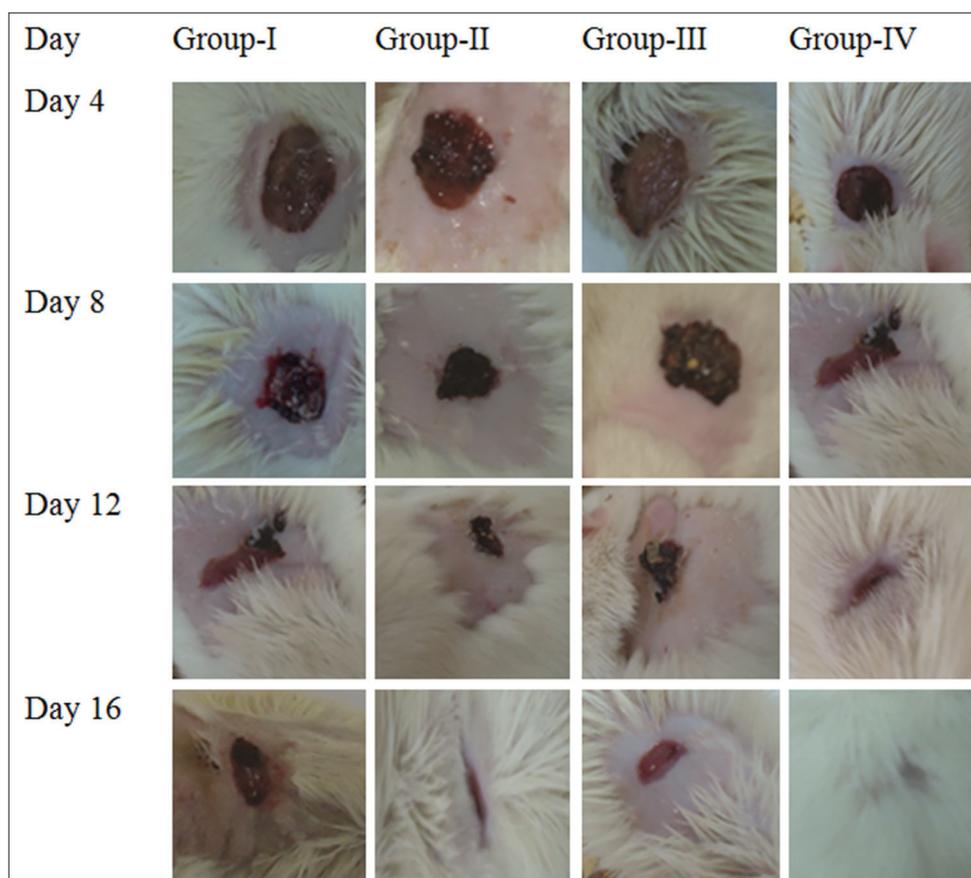


Fig. 1: Photographical representation of wound healing in rats subjected to skin excision wounds on different days: Group-I: Control sample ointment base; Group-II; Standard reference Cycatril®; Group-III: Ointment extract 5%; Group-IV: Ointment extract 10%

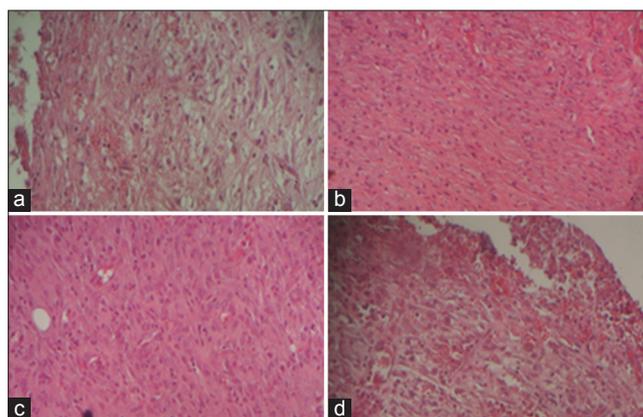


fig. 2: Histopathological evaluation of wound healing process in different treatment groups: (a) Control (ointment base), (b) standard (Cycatril®), (c) ointment (extract 5%), (d) ointment (extract 10%)

Table 1: The formula used for preparing the ointment

Composants	MF (g)	RF (g)
Wool fat	45	9
Hard paraffin	150	30
White soft paraffin	800	160
Cetostearyl alcohol	5	1
Total	1000	200

MF: Master formula, RF: Reduced formula

Table 2: Effect of topical application of the ointment formulated from 80% methanol extract of the roots of *C. africana* on edema induced in the rat by croton oil

Groups	Edema (mg)	Percentage inhibition of edema
Control Group-I	46.81±4.48	-
Standard diclofenac Group-II	12.13±1.31*	73.93
Ointment extract 5% Group-III	18.02±1.00*	61.26
Ointment extract 10% Group-IV	12.71±0.85*	72.68

*p<0.001 compared to control. Values are mean±SEM (n=6). *C. africana*: *Centaurea africana*, SEM: Standard error of mean

Table 3: Effect of topical application of the ointment formulated from 80% methanol extract of the roots of *C. africana* on tensile strength of incision wound

Groups	Incision tensile strength (g)
Control Group-I	451.67±7.70
Standard Cycatril® Group-II	595.00±18.71*
Ointment extract 5% Group-III	532.00±16.87*
Ointment extract 10% Group-IV	620.00±19.80*

*p<0.001 compared to control. Values are mean±SEM (n=6). *C. africana*: *Centaurea africana*, SEM: Standard error of mean

proliferative phase. The wound contraction enhances closure by pulling the edges of the wound toward the center; this centripetal movement of wound margin is believed to be due to the activity of myofibroblast [26].

Table 4: Effect of topical application of the ointment formulated from 80% methanol extract of the roots of *C. africana* on wound contraction and epithelization period of excision wound model

Groups	Percentage of wound contraction				Day of epithelization
	4 th day	8 th day	12 th day	16 th day	
Control Group-I	20.74±8.05	30.56±7.02	43.69±6.12	60.53±8.71	24.00±0.37
Standard Cycatril® Group-II	34.04±3.20*	62.53±3.13*	81.66±14.98*	92.35±2.43*	18.00±0.49*
Ointment extract 5% Group-III	26.32±3.98*	56.51±3.50*	73.37±3.02*	80.11±4.74*	20.67±0.46*
Ointment extract 10% Group-IV	33.89±4.63*	62.22±3.57*	82.20±3.17*	97.99±5.43*	17.00±0.49*

*p<0.001 compared to control. Values are mean±SEM (n=6). *C. Africana*: *Centaurea Africana*, SEM: Standard error of mean

Table 5: Hydroxyproline content of excision wounds following the topical application of the ointment formulated from 80% methanol extract of roots of the *C. africana*

Groups	Hydroxyproline (mg/g tissue)
Control Group-I	108.91±1.77
Standard Cycatril® Group-II	169.68±3.34*
Ointment extract 5% Group-III	155.59±3.08*
Ointment extract 10% Group-IV	221.75±2.47*

*p<0.001 compared to control. Values are mean±SEM (n=6). *C. Africana*: *Centaurea africana*, SEM: Standard error of mean

The time of the epithelization was also found to be significantly shorter in animals treated with ointments containing the methanolic extract. It must be noted that the epithelization involves the proliferation and migration of epithelial cells across the wound bed [27]. Hence, the shorter epithelization time can be due to a facilitated proliferation of epithelial cells and/or to an increase of the viability of epithelial cells [28]. The hydroxyproline was used as a biochemical marker of collagen tissue. The rate of the increase of the hydroxyproline content of the treated groups has been significantly high compared to the control group, which indicates an increase in collagen synthesis [29]. Histopathological examination of wounds showed a more elaborate granulation tissue with a regeneration of collagen, an increase in vascularization, and an abundance of the fibroblasts in the wound area of the treated animals compared to the control ones [30]. In the study of the incision wound, the increase in tensile strength of treated wounds may be attributed to an increase in collagen concentration which is a constituent of growing cell and of the stabilization of the fibers [31]. Collagen is a major protein of the extracellular matrix and is the component that ultimately contributes to wound strength. This ability of plants to accelerate wound healing has also been observed on other plants [32,33]. The use of the ointment against acute inflammation (ear edema induced by croton oil) was also studied. This investigation showed good anti-inflammatory activity similar to that obtained with the reference product diclofenac gel. The application of croton oil can induce a significant inflammatory response, characterized by the apparition of edema, neutrophil infiltration, a prostaglandin production, and an increase in vascular permeability [34]. The anti-inflammatory compounds can act as effective agents for wound healing [35,36]. This investigation confirms the powerful healing and local anti-inflammatory properties of the methanolic extract of the roots of *C. africana* comparison to the respective reference product.

CONCLUSION

The data generated from the present study indicate that the topical application of a methanolic extract of the roots of *C. africana* possesses the wound healing and anti-inflammatory activity. These results suggest that the traditional use of this plant is mostly justified. Further researches are needed to find the bioactive chemical constituents existing in the roots of *C. africana* responsible for these pharmacological activities.

REFERENCES

- Kiran K, Asad M. Wound healing activity of *Sesamum indicum* L seed and oil in rats. Indian J Exp Biol 2008;46(11):777-82.

- Chowdhury MA, Abdellatif KR, Don Y, Das D, Suresh MR, Knaus EE. Synthesis of celecoxib analogs possessing a N-difluoromethyl-1,2-dihydropyrid-2-one s-lipoxygenase pharmacophore: Biological evaluations dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. J Med Chem 2009;52(6):1525-9.
- Quézel P, Santa S. The new flora of Algeria and southern desert regions. The French National Center for Scientific Research; 1962. p1170.
- Gonzalez AG, Barrera JB, Garcia TZ, Rosas FE. Sesquiterpene lactones from *Centaurea species*. Phytochemistry 1984;23(9):2071-2.
- Medjroubi K, Benayache F, Benayache S, Akkal S, Khalafallah N, Aclinou P. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Phytochemistry 1997;45(7):1449-51.
- Flamini G, Ertugrul K, Cioni PL, Morelli I, Dural H, Bagci Y. Volatile constituents of two endemic *Centaurea species* from Turkey: *C. Pseudo Scabiosa* subsp. *Pseudoscabiosa* and *C. Hadimensis*. Biochem Syst Ecol 2002;30:953-9.
- Picher MT, Seoane E, Tortajada A. Flavones, sesquiterpene lactones and glycosides isolated from *Centaurea aspera* var. *Stenophylla*. Phytochemistry 1984;23(9):1995-8.
- Ahmed ZF, Rimpler H, Rizk AM, Hammouda FM, Ismail SI. The flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt. Phytochemistry 1970;9(7):1595-601.
- Arif R, Küpeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea L.* Species (review). Gazi Univ J Sci 2004;17(4):149-64.
- Department of Health and Social Security Scottish Home and Health Department. British Pharmacopoeia. 2nd ed. UK: Office of the British Pharmacopoeia Commission; 1988. p. 713.
- Ansel HC. Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms. 4th ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1985. p. 299-301.
- Bruneton J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. 2nd ed. Hampshire: Intercept Ltd.; 1999. p. 385-6.
- Picher MT, Seoane E, Tortajada A. Flavones, sesquiterpene lactones and glycosides isolated from *Centaurea aspera* var. *Stenophylla*. Phytochemistry 1984;23(9):1995-8.
- Karumi Y, Onyeyili PA, Ogugbuaja VO. Identification of active principales of *M. balsamina* (balsam apple) leaf extract. J Med Sci 2004;4(3):179-82.
- Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C, Della Loggia R. The croton oil ear test revisited. Agents Actions 1986;17(3-4):347-9.
- Pradhan D, Panda PK, Tripathy G. Wound healing activity of aqueous and methanolic bark extracts of *Vernonia arborea* Buch. Ham. In wistar rats. Natl Prod Radiance 2009;8(1):6-11.
- Li H, Fu X, Zhang L, Huang Q, Wu Z, Sun T. Research of PDGF-BB gel on the wound healing of diabetic rats and its pharmacodynamics. J Surg Res 2008;145(1):41-8.
- Morton JJ, Malone MH. Evaluation of vulnerary activity by an open wound procedure in rats. Arch Int Pharmacodyn Ther 1972;196(1):117-26.
- Lee KH. Studies on mechanism of action of salicylates II, effect of vitamin A on wound healing. J Pharm Sci 1968;57(7):1238-40.
- Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan BN. *In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. J Ethnopharmacol 1999;65(1):1-11.
- Switzer BR. Determination of hydroxyproline in tissue. J Nutr Biochem 1991;2(4):229-31.
- Linn AK, Jain CP, Gaur K, Jain A, Nema RK. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of leaves of *Cassia grandis*. IJPCR 2010;2(3):106-8.
- Lodhi S, Singhai AK. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn on streptozotocin induced diabetic rats. Asian Pac J Trop Med 2013;6(4):253-9.
- Omale J, Emmanuel TF. Phytochemical composition, bioactivity and wound healing potential of *Euphorbia heterophylla* (*Euphorbiaceae*)

- leaf extract. Int J Pharm Biomed Res 2010;1(1):54-63.
25. Chintamani U, Deepali B, Mhapsekar R. Phytochemical investigations and antimicrobial and anticancer activities of *Homonioia riparia* Lour. IJPCR 2014;6(11):237-43.
 26. Chitra V, Prasad PD, Pavan KK, Alla NR. Wound healing activity of alcoholic extract of *Buchanania lanzan* in albino rats. Int J Chem Tech Res 2009;1(4):1026-31.
 27. Esimone C, Nworu C, Jackson C. Cutaneous wound healing activity of a herbal ointment containing the leaf extracts of *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*). Int J Appl Res Nat Prod 2008;1:1-4.
 28. Sanwal R, Chaudhary AK. Wound healing and antimicrobial potential of *Carissa spinarum* Linn. In albino mice. J Ethnopharmacol 2011;135(3):792-6.
 29. Sunita S, Deepti G. Wound healing activity of *Chrysophyllum cainito* L. Leaves: Evaluation in rats using excision wound model. J Young Pharm 2016;8(2):96-103.
 30. Kumar NH, Kumar SM, Rajnish S, Lal KM. Pharmacological investigation of the wound healing activity of *Cestrum nocturnum* (L.) Ointment in wistar albino rats. J Pharm 2016;8:1-8.
 31. Pattanayak SP, Sunita P. Wound healing, the anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. J Ethnopharmacol 2008;120(2):241-7.
 32. Akkol EK, Koca U, Pesin I, Yilmazer D. Evaluation of the wound healing potential of *Achillea biebersteinii* Afan. (*Asteraceae*) by *in vivo* excision and incision models. Evid Based Complement Alternat Med 2011;2011:474026.
 33. Abdulla MA, Hassandarvish P, Hapipa MA, Noor SM, Mahmoud FH, Bashah NS, et al. Acceleration of wound healing potential of *Lantana camara* leaf extract in experimental rats. Res J Med Sci 2009;3(2):75-9.
 34. Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. Inflammation 1993;17(6):723-41.
 35. Chandran PK, Kuttan R. Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. J Clin Biochem Nutr 2008;43(2):58-64.
 36. Fei YM, Zainol J, Pillay AG, Yusof N. Experimental evaluation of healing process of burn wound treated by lyophilized *Aloe vera* dressing. Sciences 2002;2(1):1-6.