

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
En Sciences
Option : Biochimie Appliquée

THEME

Evaluation de l'activité antibactérienne, anti-oxydante et cicatrisante des brûlures thermiques des composés phénoliques extraits de la plante médicinale *Cytisus triflorus* de l'Est Algérien.

Présentée par : M^{me} KHADRI Sihem

Directrice de thèse : M^{me} BOUTEFNOUCHET Nafissa

Professeur, Université d'annaba

Co-directeur de thèse : Mr. HADEF Youcef

Professeur, Université d'annaba

Membres de Jury:

Présidente : M^{me} CHETTIBI Houria

Professeur, Université d'annaba

Examineurs : M^{me} GRARA Njoud

Professeur, Université de Guelma

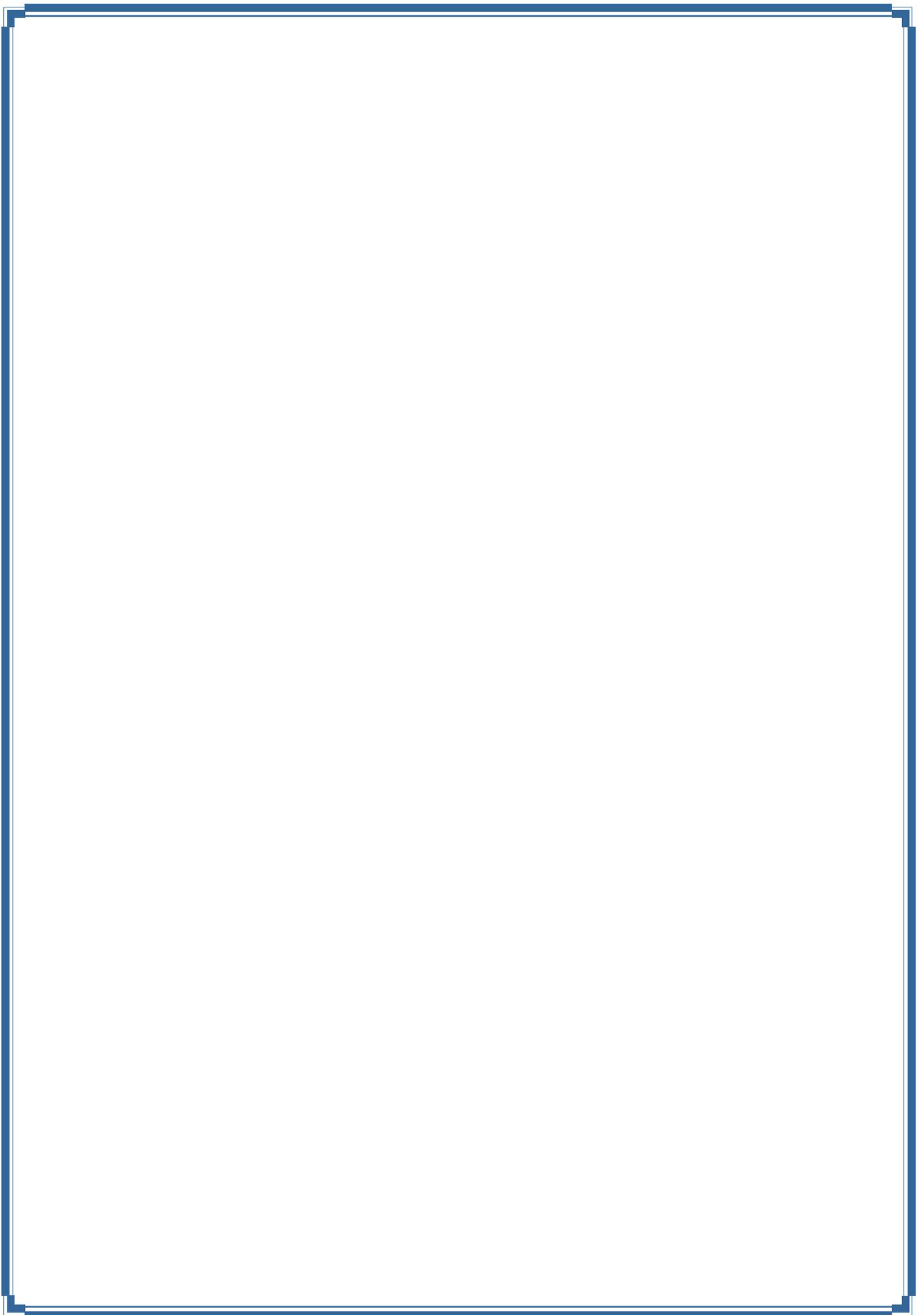
M^{me} ZAIDI Nedjouda

MCA, Université de Skikda

M^{me} CHEKROUD Zohra

MCA, Université de Skikda

Année universitaire : 2018/2019



Je dédie cette thèse

À mes chers parents et mes beaux parents

À mon cher époux et ma princesse Aridje el janna

À mes sœurs et mes belles sœurs

À mon frère et mes beaux frères

À toute ma famille, proche ou
éloignée



Les Remerciements

Je remercie Dieu tout puissant, qui ma permis de mener à bien ce travail

Je tiens à exprimer toutes mes reconnaissances à Madame Boutefnouchet Nafissa, professeur à l'université d'Annaba et Directrice de cette thèse, pour l'accueil qu'elle ma accordée pour sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et de m'avoir fait confiance tout au long de la préparation de ce travail, qu'elle trouve ici toute ma gratitude et ma sympathie.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur HadeF Youcef professeur à l'université d'Annaba, pour son aide et son soutien. Merci Monsieur d'avoir accepter de Co-encadrer ce travail.

Un grand merci à Madame Chettibi Houria, professeur à l'université d'Annaba pour l'honneur qu'il ma fait en acceptant de présider ce Jury.

Je suis également reconnaissante à Madame Graraa Noudjoud, professeur à l'université de Guelma, Madame Zaidi Nadjoua, docteur à l'université de Skikda, Madame Checroud Zohra, docteur à l'université de Skikda, pour avoir accepté d'être membres de ce jury.

Je suis très reconnaissante envers toute personne, qui ma aider à réaliser ce travail surtout mon mari, mes parents et mes beaux parents, que dieu les protège.



Sommaire

Résumés

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale 1

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Composés phénoliques chez les végétaux

1. Généralités.....	3
2. Définition des composés phénoliques	3
3. Classification et propriétés thérapeutiques des composés phénoliques	4
3.1. Les acides phénoliques.....	4
3.2. Les coumarines	5
3.3. Les quinones	6
3.4. Les tanins	6
3.5. Les flavonoïdes	7

Etude botanique de la plante médicinale *Cytisus triflorus*.

1. Présentation de la famille des <i>Fabaceae</i>	10
2. Présentation du genre <i>Cytisus</i>	11
3. L'espèce <i>Cytisus triflorus</i> L'Hérit, Cytise à trois fleurs	12
3.1. Description.....	12
3.2. Position systématique	12
3.3. Utilisations thérapeutiques.....	13

CHAPITRE II: Etude phytochimique de la plante médicinale *Cytisus triflorus*

1. Introduction	14
2. Matériel et méthodes	15
2.1. Choix de la plante	15
2.2. Description et Choix de la région de récolte	15
2.3. Récolte et identification de la plante	16
2.4. Screening chimique	17

2.5. Extraction des composés phénoliques	22
2.6. Calcul du rendement en extraits secs	23
2.7. Dosage des polyphénols totaux	23
2.8. Dosage des flavonoïdes totaux	23
3. Résultats et discussion	24
4. Conclusion	33

CHAPITRE III: Test du pouvoir antibactérien *in vitro*

1. Introduction	34
2. Matériel et méthodes	36
2.1. Matériel.....	36
• Matériel végétal.....	36
• Souches bactériennes à tester	36
2.2. Méthodes	36
2.2.1. Test du pouvoir antibactérien	36
• Méthode de diffusion en disque	36
• Méthode de dilution en milieu solide	38
3. Résultats et discussion	39
4. Conclusion	43

CHAPITRE IV: Test du pouvoir anti-oxydant *in vitro*

1. Introduction	45
2. Matériel et méthodes	49
2.1. Piégeage du radical libre DPPH	59
2.2. Pouvoir réducteur du fer	50
3. Résultats et discussion	52
4. Conclusion	56

CHAPITRE V: Evaluation de l'activité cicatrisante *in vivo*

1. Introduction	57
2. Matériel et méthodes	60
2.1. Matériel biologique	60
2.1.1. Animaux	60

2.1.2. Produits à tester.....	60
2.2. Protocole expérimentale	61
2.2.1. Préparation des animaux.....	62
2.2.2. Application des brûlures	62
2.2.3. Traitement des brûlures.....	63
2.2.4. Evaluation du processus cicatriciel.....	64
2.2.5. Observation clinique et prise du poids corporel	65
2.2.6. Analyse statistique	65
3. Résultats et discussion	66
4. Conclusion.....	72
Conclusion générale et perspective	73
Références bibliographiques	75

Résumé

Cytisus triflorus est une plante médicinale du Nord-est de l'Algérie utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs affections. Dans ce modeste travail nous avons essayés de confirmer scientifiquement certaines de ses propriétés biologiques à savoir ; antioxydante, antibactérienne et cicatrisantes des brûlures des polyphénols extraits de ses feuilles par macération dans une solution hydro-méthanolique à 80%. Tout d'abord, nous avons procédé par une étude phytochimique de la poudre des feuilles de *Cytisus triflorus*, les résultats enregistrés ont révélé une composition riche et variée en métabolites secondaires où les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes sont présents en quantité importantes. L'étude quantitative de l'extrait polyphénolique brut au moyen des dosages spectrophotométriques qui permet de déterminer la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes a révélé des taux élevés et variables qui sont respectivement de $277.268 \pm 0,848$ mg EAG/g d'extrait et $44,155 \pm 0,341$ mg EQ/g d'extrait. La capacité de l'extrait brut hydroalcoolique des feuilles de *Cytisus triflorus* à inhiber la croissance bactérienne des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes aux antibiotiques et de *Staphylococcus aureus* méthécilino-résistantes les plus rencontrées dans les infections nosocomiales chez les brûlés a été testée par la méthode de diffusion en disque et celle de dilution en milieu solide. L'activité antibactérienne s'est révélée modérée avec des CMI comprises entre 4 et 20 mg/ml et variable selon la nature de l'espèce bactérienne testée. Par la suite, l'activité antioxydante du même extrait a été évaluée *in vitro* à travers deux méthodes : le test du piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer. D'après les résultats, l'extrait est doté d'un potentiel antiradicalaire et antioxydant modérée par rapport aux antioxydants standards employés. Les résultats du test de cicatrisation qui consiste à l'application du produit à tester sur des brûlures préalablement provoquées sur le dos des lapins indiquent que le traitement des brûlures avec l'extrait test montre une très bonne activité cicatrisante et raccourcit la période d'épithélialisation (19 jours) par rapport aux autres produits de références (médicament 20 jours, la vaseline 24 jours) et celle des plaies non traitées (25 jours).

Mots clés : Activité antimicrobienne, *Cytisus triflorus*, Plantes médicinales, Polyphénols, Activité cicatrisante.

Summary

Cytisus triflorus is a medicinal plant from northeastern Algeria used in traditional medicine to treat several conditions. In this modest work we have tried to scientifically confirm some of its biological properties namely; the antioxidant, antibacterial and healing activity of burns of polyphenols extracted from the leaves by maceration in a hydro-methanolic solution (80%). First, we preceded by a phytochemical study of the leaf powder of *Cytisus triflorus*, the results recorded revealed a rich and varied composition of secondary metabolites where flavonoids, tannins and alkaloids are present in large quantities. The quantitative study of the crude polyphenol extract using spectrophotometric assays, which allows the total content of polyphenols and flavonoids to be determined, revealed high and variable levels which are respectively $277,268 \pm 0,848$ mg AGE / g of extract and 44.155 ± 0.341 mg QE / g extract. The ability of the hydroalcoholic leaf extract of *Cytisus triflorus* to inhibit the bacterial growth of the antibiotic-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and metechilin-resistant *Staphylococcus aureus* most commonly found in nosocomial infections in burns was tested by diffusion in disc and that of dilution in solid medium. Antibacterial activity was moderate with MICs between 4 and 20 mg / ml and variable depending on the nature of the bacterial species tested. Subsequently, the antioxidant activity of the same extract was evaluated in vitro through two methods: the DPPH free radical scavenging test and the iron reduction. The results show that the extract has a moderate anti-radical and antioxidant potential compared to the standard antioxidants used. The results of the scarring test, which consists in applying the test product to previously induced burns on the backs of rabbits, indicate that the treatment of burns with the test extract shows a very good healing activity and shortens the period of epithelialization. (19 days) compared to other reference products (drug 20 days, petrolatum 24 days) and that of untreated wounds (25 days).

Key words: Antimicrobial activity, *Cytisus triflorus*, Medicinal plants, Polyphenols, healing activity.

ملخص

اللقفة (*Cytisus triflorus*) هو نبات طبي من شمال شرق الجزائر يستخدم في الطب التقليدي لعلاج العديد من الحالات. من خلال هذا العمل المتواضع حاولنا أن نؤكد بشكل علمي البعض من خصائصه البيولوجية من بينها؛ مضاد للأكسدة ، مثبط للنمو البكتيري ومضمد للحروق لمستخلص متعدد الفينول المستخرج من أوراق هذه النبتة عن طريق النقع في محلول الميثانول (80 %). في البداية قمنا بدراسة كيميائية نباتية لمسحوق الأوراق حيث تبين أن النبتة تحتوي على عدد كبير ومتنوعة من التراكيب الفعالة ,توجد فيها مركبات الفلافونويد ,التانان والالكالويد بكميات كبيرة. التحليل الكمي لمستخلص متعدد الفينول الخام باستخدام المقاييس الطيفية لتحديد المحتوى الكلي لمتعدد الفينول و الفلافونويد كشف عن معدلات مرتفعة و متغيرة و التي تصل على التوالي الى $277,268 \pm 0,848$ مغ معادل حمض الغاليك /غ من المستخلص و 0.341 ± 44.155 مغ معادل الكغستين /غ من المستخلص. تم اختبار قدرة نفس المستخلص الخام لتثبيط النمو البكتيري ضد سلالات *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة للمضادات الحيوية و *Staphylococcus aureus* المقاومة للمتسيلين الأكثر شيوعاً في حالات العدوى الاستشفائية للحروق بواسطة طريقتين : طريقة الانتشار من قرص و التخفيف في وسط صلب . كشفت النتائج عن نشاط مضاد للبكتيريا معتدلاً حيث قدرت CMIs ما بين 4 و 20 ملغم / مل و متغير تبعاً لطبيعة البكتيرية التي تم اختبارها. في وقت لاحق ، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة *in vitro* باستخدام طريقتين: اختبار DPPH وإرجاع الحديد من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح أن مستخلصنا له تأثير مضاد للأكسدة معتدلة مقارنة بمضادات الأكسدة المرجعية المستخدمة. اختبار التنام الحروق الذي يحدث على تطبيق مستخلص متعدد الفينول فوق جروح تجريبية على ظهور الأرناب اظهر أن المستخلص له تأثير فعلي في التنام الحروق عن طريق تحفيز انكماشها و كذلك تقليل قدرة الشفاء (19 يوماً) مقارنةً بالمركبات المرجعية (الميبو 20 يوماً ، الفازلين 24 يوماً) و الجروح الغير المعالجة (25 يوماً).

الكلمات المفتاحية : الفعالية المضادة للبكتيريا , *Cytisus triflorus* , نباتات طبية, متعدد الفينول, التنام الجروح.

Liste des figures

Figure 1 : Principaux acides hydroxybenzoïques	4
Figure 2 : Principaux acides hydroxycinnamiques	5
Figure 3 : Principaux types de coumarines	5
Figure 4 : Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes avec la numérotation Classique.....	7
Figure 5 : Structure de quelques classes de flavonoïdes	8
Figure 6 : Famille des <i>Fabaceae</i>	10
Figure 7 : Différentes espèces de genre <i>Cytisus</i> (A. <i>Cytisus Scoparius</i> , B. <i>Cytisus multiflorus</i> C. <i>Cytisus purpureus</i> Scop, D. <i>Cytisus striatus</i>	11
Figure 8 : Différentes parties de la plante <i>Cytisus triflorus</i>	12
Figure 9 : Carte géographique montre la région de récolte	16
Figure 10 : Préparation du matériel végétal	17
Figure 11 : Test d'Amidon	18
Figure 12 : Test des Saponosides	18
Figure 13 : Test des tanins.....	18
Figure 14 : Test des Flavonoïdes.....	19
Figure 15 : Test des Tanins	19
Figure 16 : Test des composés réducteurs.....	19
Figure 17 : Test des Stérols et triterpènes	21
Figure 18 : Test des Alcaloïdes	21
Figure 19 : Test des Anthocyanes	21
Figure 20 : Protocole d'extraction des polyphénols totaux	22
Figure 21 : Extrait brut des composés phénolique de la plante médicinale <i>Cytisus triflorus</i>	29
Figure 22 : Teneur en composés phénoliques	30
Figure 23 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique	31
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	31
Figure 25 : Réduction du radical DPPH.....	49
Figure 26 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH)	51

Figure 27 : Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique brut des feuilles de <i>Cytisus Triflorus</i>	52
Figure 28: Activité antiradicalaire du standard BHT	53
Figure 29 : Pouvoir réducteur de l'extrait brut de <i>Cytisus triflorus</i> et de l'acide Ascorbique.....	54
Figure 30 : Classification des brûlures cutanées selon la profondeur	58
Figure 31 : Chronologie des phases de la cicatrisation	59
Figure 32 : Lapin Néo-Zélandais.....	60
Figure 33 : Préparation dermique à base des polyphénols de la plante <i>Cytisus</i> <i>Triflorus</i>	61
Figure 34 : Pommade commercial MEBO	61
Figure 35: Dos du lapin après application de la crème dépilatoire	62
Figure 36: Application des brûlures	63
Figure 37: Traitement des brûlures.....	64
Figure 38: Marge d'une plaie tracée sur papier transparent	65
Figure 39: Pourcentages de contraction des plaies à différents intervalles dans les brûlures traitées et les brûlures non traitées	67
Figure 40 : Chronologie de la cicatrisation des plaies des brûlures.....	69
Figure 41: Poids moyen (Kg) des lapins brûlés à différents intervalles	70

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des composés phénoliques et leurs propriétés médicinales.....	9
Tableau 2 : Situation géographique de la région de récolte	16
Tableau 3 : Espèces médicinales les plus utilisées dans la région de récolte et leurs Propriétés	24
Tableau 4 : Résultats de screening phytochimiques des feuilles de la plante médicinale <i>Cytisus triflorus</i> de la région de Collo wilaya de Skikda	27
Tableau 5 : Caractéristiques de l'extrait poly phénolique obtenu par macération de la plante <i>Cytisus triflorus</i>	29
Tableau 6 : Teneur en composés phénoliques.....	30
Tableau 7 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait polyphénolique brut (10µl / disque) de <i>Cytisus triflorus</i>	39
Tableau 8 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) en mg/ml	41
Tableau 9 : IC50 de l'extrait phénolique brut et du BHT	53
Tableau 10 : Pourcentages de contraction des plaies à différents intervalles dans les brûlures traitées et les brûlures non traitées.....	66
Tableau 11 : Résultats de l'étude statistique	67
Tableau 12 : Durée de la cicatrisation des plaies (J	68
Tableau 13 : Poids moyen (Kg) des lapins brûlés à différents intervalles	70

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ATCC : American Type Culture Collection.

BHA : Butylhydroxyanisole.

BHT: Butylhydroxytoluène.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DPPH : 2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl.

DMSO : DiméthylSulfOxyde.

EOR : Radicaux libres oxygénée.

Fe³⁺ : Ion ferrique.

Fe²⁺ : Ion ferreux.

Fe(III)- TPTZ : Complexe tripyridyltriazine ferrique.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

IC₅₀ : Concentration à 50% de DPPH perdu.

K₃Fe (CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

MEB : médicament comercial MEBO.

OMS : Organisation Mondial de la Santé.

PDAU : Plan directeur d'aménagement urbain.

POLY : Polyphénols.

SD : Standard Déviation (écart type).

TCA : Acide trichloroacétique.

VAS : Vaseline.

La médication par les plantes ou phytothérapie, était d'usage courant dans les plus anciennes civilisations qui s'intéressaient aux vertus curatives de certains végétaux. On peut dire qu'il s'agit d'une des premières manifestations de l'effort immémorial de l'homme pour comprendre et utiliser la nature (**Bosserdet et Rivolier, 1977**). A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**). Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes dont il existe environ 400000 espèces de plantes dans le monde et près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité (**Benaissa, 2011**).

Le continent africain est l'un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde. L'Algérie possède une richesse floristique considérable, On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques. Ce potentiel de plantes médicinales présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles (**Quezel, 1963; Aberkane, 2006**).

En effet, certaines plantes peuvent constituer une source majeure de médicaments grâce à leur richesse en métabolites secondaires, ces derniers font et restent l'objet de nombreuse recherche in vitro comme in vivo notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les saponosides, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les tanins, les huiles essentielles et les composés phénoliques, (**Guignard et al., 1985**), ces derniers suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des chercheurs. En effet, le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques, également la toxicité des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs dans l'industrie agro-alimentaire ainsi que les dégâts cellulaires et tissulaires causés dans l'organisme par les radicaux libres, sont à l'origine de l'engouement suscité pour les plantes médicinales dont l'évaluation de ces propriétés phytopharmaceutiques notamment l'activité antibactérienne et antioxydante demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (**Teixeira da Silva, 2004**).

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de l'est algérien nous nous sommes intéressés à ce travail qui consiste à mettre en évidence certaines activités biologiques à savoir l'activité antibactérienne et antioxydante des polyphénols extraits de la plante médicinale *Cytisus triflorus* ; une plante qui a fait l'objet d'un nombre très restreint des études phytochimiques et de dépistage d'activités biologiques. Elle est très utilisée par la population de la région de Collo willaya de Skikda dans le traitement de plusieurs affections notamment la cicatrisation des brûlures, à cet effet, nous avons jugé important de confirmer scientifiquement l'efficacité de cette plante dans la cicatrisation des brûlures.

Pour ce faire, on a élaboré un plan de recherche s'articule sur quatre chapitres :

❖ Le premier chapitre est une synthèse bibliographique, où ont été abordées des notions sur les composés phénoliques des plantes médicinales et leur utilisation en phytothérapie, ainsi que des données sur l'espèce choisie « *Cytisus triflorus* ».

❖ Le deuxième a été consacré à l'étude phytochimique qualitative et quantitative appliquée sur les feuilles de la plante médicinale en question.

❖ Le troisième et le quatrième ont été consacrés à l'étude *in vitro*, respectivement de l'activité antibactérienne et antioxydante de l'extrait polyphénolique brut de *Cytisus triflorus*.

❖ Le dernier chapitre est une étude expérimentale *in vivo* sur l'activité cicatrisante dont le test de cicatrisation consiste à l'application de l'extrait polyphénolique brut à tester sur des brûlures préalablement provoquées sur le dos des lapins Néo-Zélandais.

Nous avons exposé les résultats et la discussion de chaque expérimentation de notre travail dans chaque chapitre qui lui est dédié.

Pour terminer, une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude ainsi que les perspectives ont été dégagées.

Composés phénoliques chez les végétaux

1. Généralités

Dans les dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde (**Muchuweti et al., 2006**). Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), les plantes médicinales sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (**Sofowora, 2010**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mises à profil dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composées on retrouve, dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont illustrés en thérapeutique. Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes et dans les relations entre les plantes et leur environnement (**Gravot, 2008**). Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies (**Hartmann, 2007**) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Parmi ceux-ci, on distingue trois classes principales: les isoprénoides (Terpénoides), les alcaloïdes et les composés phénoliques, ces derniers sont dotés des propriétés importantes et différentes et prennent une importance croissante à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. Ils sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature (**Crozier et al., 2010**)

2. Définition des composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (**Lebham, 2005**). Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Urquiaga et Leighton, 2000**). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés), avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000 ; Macheix et al., 2005**)

3. Classification et propriétés thérapeutiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont très hétérogènes, elle se différencient entre elles par : la complexité du squelette de base, Le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation...) et les liaisons possibles avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines...) (Herbert, 1989; Macheix *et al.*, 2005; Beta *et al.*, 2005).

3.1. Les acides phénoliques

Ils ne possèdent pas de squelette flavane. Ils sont solubles dans l'éther. Ils peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille insoluble dans l'alcool (Barboni, 2006). Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et immunostimulants (Bruneton, 1999).

On distingue :

- ✓ Les dérivés de l'acide benzoïque : ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans la **figure 1**.

	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

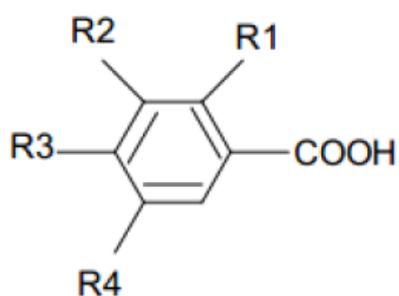


Figure 1 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

- ✓ Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques : dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Existent souvent sous forme combinée

avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Barboni, 2006). La figure 2 représente les principaux acides hydroxycinnamiques

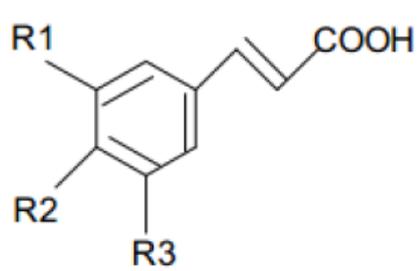
	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique	

Figure 2 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

3.2. Les coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Ils sont connus par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du coeur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (Gonzalez et al., 2007). La figure 3 montre les principaux types de coumarines

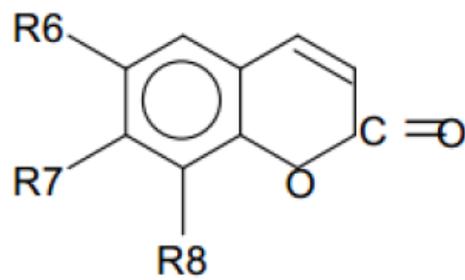
	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
H	OH	OH	Daphnétole	

Figure 3 : Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

3.3. Les quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang (**Bruneton, 1999**).

3.4. Les tanins

Les tanins se trouvent dans les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...), leurs structures complexes sont formées d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation. Selon leur structure ils sont divisés en deux groupes : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines (**Hemingway, 1992**).

✓ *Les tannins hydrolysables*

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins. Aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C3 de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins. Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres) (**Seigler, 1998**).

✓ *Les tannins condensés*

Ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelphinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine (**Andersen et Markham, 2006**).

En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (**Andersen et Markham, 2006**).

Les applications médicales des plantes à tanins découlent de leur affinité pour les protéines. La consommation de plantes à tanins pouvait affecter la biologie de certaines espèces de parasites intestinaux en diminuant la production des œufs. De nombreuses études ont montré l'effet antimicrobien des tanins sur différentes bactéries, virus et champignons. Les tanins ont aussi des propriétés proches de celles des flavonoïdes : augmentation de la résistance capillaire, diminution de la perméabilité capillaire et stabilisation du collagène (**Bruneton, 1999**). Ils ont des grandes capacités anti-oxydantes dues à leurs noyaux phénol. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (**Frutos et al., 2004**).

3.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols ; principaux métabolites secondaires des plantes. Ils ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), (**Bruneton, 1999**) dont ils sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure du 2-phényl-benzopyrone. Ce groupe comprend principalement trois familles : les flavonols, les anthocyanes et les flavanols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central, certains ont une très grande importance biologique et technologique (**Harborne, 1998**). Ce sont les couleurs de la nature : les anthocyanes pigments rouge ou bleu, les flavones et les flavonols de couleur crème ou jaune clair, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tanins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (**Medic-saric et al., 2004**).

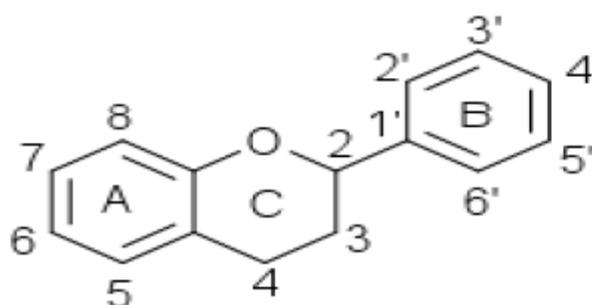


Figure 4 : Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes avec la numérotation classique (**Harborne, 1998**).

A l'état naturel ces composés existent le plus souvent sous forme d'hétérosides : les flavonosides (Heller et Forkmann, 1993).

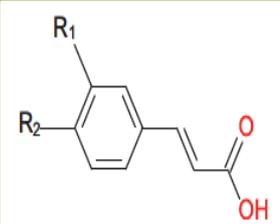
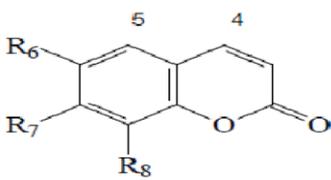
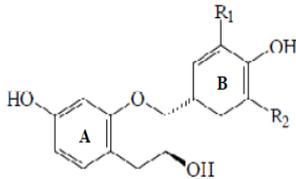
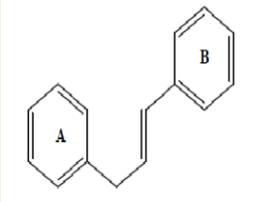
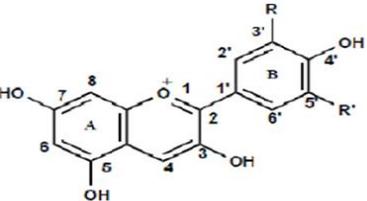
	<i>Structure chimique des flavonoïdes</i>	<i>Exemples</i>
Flavones		<p>R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₆ = OCH₃ ; R₅ = R₇ = H : Tangéretine R₁ = R₇ = H ; R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = R₆ = OCH₃ : Sinensetine R₁ = H ; R₂ = OH : Apigénine R₁ = R₂ = OH : Lutéoline</p>
Flavanones		<p>R₁ = H ; R₂ = OH : Naringénine R₁ = OH ; R₂ = OCH₃ : Hespérétine</p>
Flavanols		<p>R₁ = R₂ = OH ; R₃ = H : Catéchine R₁ = H ; R₂ = R₃ = OH : Epicatéchine</p>
Flavonols		<p>R₁ = R₃ = H ; R₂ = OH : Kaempférol R₁ = R₂ = OH ; R₃ = H : Quercétine</p>
Anthocyanidines		<p>R₁ = OH ; R₂ = H : Cyanidine R₁ = R₂ = H : Pélargonidine R₁ = OCH₃ ; R₂ = H : Péonidine R₁ = R₂ = OH : Delphinidine R₁ = OCH₃ ; R₂ = OH : Pétunidine R₁ = R₂ = OCH₃ : Malvidine</p>

Figure 5 : Structure de quelques classes de flavonoïdes (Heller et Forkmann, 1993).

Les flavonoïdes sont largement connus par leurs activités antivirales, antispasmodiques, antitumorales, anti agrégation plaquettaires, antiallergiques, hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires, anti-hypertensives, anti-oxydante et antimicrobiennes (Das *et al.*, 1994 ; Formica et Regelson, 1995; Yochum *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004 ; Cushine et Lamb, 2005). Ils peuvent empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'aldose réductase. En effet, Ong et Khoo (1997) ont rapporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques.

Le **tableau 1** résume les différentes classes des composés phénoliques et leurs propriétés médicinales.

Tableau 1 : Classification des composés phénoliques et leurs propriétés médicinales.

<i>Les métabolites secondaires</i>	<i>Classifications</i>	<i>Structures</i>	<i>Propriétés</i>
<i>Les composés phénoliques</i>	Acids phénoliques		Soluble dans l'éther Antifongiques Antioxydants anti-inflammatoires
	Les coumarins		antivirales, immunostimulantes, anticoagulantes, hypotensives
	Les quinones		colorées et brillantes la coagulation du sang
	les tannins		Antioxydants
	Les flavonoïdes		Anti carcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs Antioxydants
	Les anthocyanes		Des pigments colorent les plantes.

Etude botanique de la plante médicinale *Cytisus triflorus*

1. Présentation de la famille des *Fabaceae*

La famille des Fabacées est une grande famille se compose de plantes dicotylédones, de plantes ligneuses (zones tropicales) et herbacées (zones tempérées) avec quelques arbres et arbustes qui regroupent environ 12 000 espèces réparties en 400 à 500 genres. Cette famille se divise en plusieurs tribus dans les quelles les genres sont groupés selon :

- Le port de la plante ;
- La forme des feuilles ;
- Le degré de fusion des étamines (**Bhattacharyya et Johri, 1998**).

C'est le plus grand ensemble angiospermien, cosmopolite, prédominant en individus et en espèces dans de nombreux biomes, et surtout en régions tropicales (**Spichiger et al., 2004**).

Cette famille est aussi appelée couramment Légumineuses (*Leguminosae*) ou Papilionacées (*Papilionaceae*), mais ce ne sont pas de vrais synonymes. Chaque nom s'applique à un caractère particulier du fruit et de la fleur de ces familles de plantes.

Schématiquement le terme « légumineuses » désigne des plantes dont le fruit est une gousse. Appelé gousse ou légume : la gousse est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves portant chacune une rangée de graines ex-albuminées ; les feuilles sont composées alternes, parfois stipulées, à pétiole épaissi à sa base, dialypétales, souvent zygomorphes et papilionacées, toujours monocarpellées (**DeWitt, 1963**).



Figure 6 : Famille des *Fabaceae* (**Bhattacharyya et Johri., 1998**).

2. Description du genre *Cytisus*

Le genre *Cytisus* (famille des Fabacées) se compose d'environ 70 espèces confinées aux régions de climat doux de l'Europe du Sud et centrale, Afrique du Nord et de l'Ouest Asie.

C'est un arbrisseau à tiges brunes, dont les rameaux ont la surface verte ; Il peut se produire des bourgeons adventifs sur les racines. Relativement petites, à 3 folioles à peu près arrondies et terminées chacune par une toute petite pointe ; Les feuilles inférieures et celles des rameaux sans fleurs ont un court pétiole ,elles sont plus ou moins coriaces, sans poils, d'un vert pâle en dessous et ne noircissent pas lorsqu'elles se dessèchent, le calice est relativement court et sans poils ; L'étendard, sans poils, est plus long que la carène courbée et qui se termine en une sorte de bec dressé ; Le fruit mûr est sans poils, assez aplati, de 25 à 35 millimètres de longueur sur 9 à 11 millimètres de largeur (DeWitt, 1963).

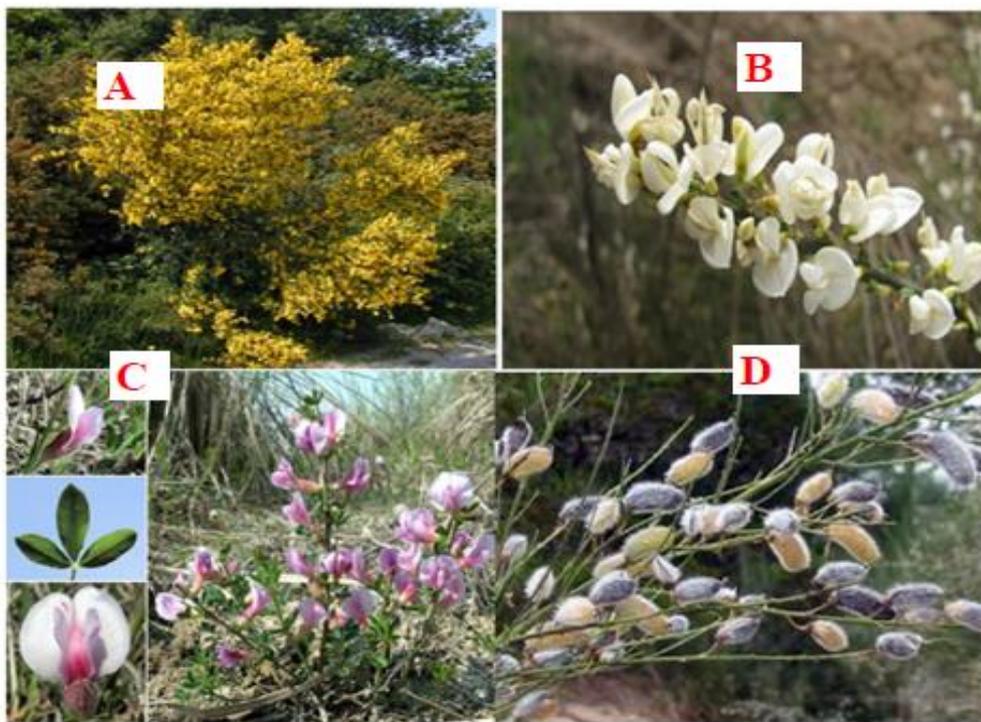


Figure 7: Différentes espèces de genre *Cytisus* (A. *Cytisus Scoparius*, B. *Cytisus multiflorus*, C. *Cytisus purpureus Scop*, D. *Cytisus striatus* (DeWitt, 1963).

3. L'espèce *Cytisus triflorus* L'Hérit, Cytise à trois fleurs

3.1. Description

Cytisus triflorus l'Hérit est une plante médicinale du Nord-Est de l'Algérie, connu sous le nom de " Ilougui ". Est un arbrisseau à rameaux nombreux, effilés, noirâtres, velus surtout vers le haut, et qui atteint la hauteur d'un homme (1- 2 m) ; ses feuilles sont pétiolées, d'un vert foncé, hérissées de poils roussâtres, surtout sur le pétiole et la surface inférieure des folioles; celles-ci sont au nombre de trois, ovales, obtuses: les fleurs naissent 3 ensemble à l'aisselle des feuilles supérieures, portées sur des pédicelles longs de 10-12 millim., et hérissés de poils roussâtres; le calice est velu, en cloche, à deux lèvres; la corolle est jaune, assez grande; les gousses sont comprimées, un peu arquées, très-hérissée (Delamarck et Decandolle, 1992; Spichiger *et al.*, 2004).



Figure 8: Différentes parties de la plante *Cytisus triflorus*. (Delamarck et Decandolle, 1992; Spichiger *et al.*, 2004).

3.2. Position systématique (Auvray et Malécot, 2013).

Règne :	Plantae
Division:	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Fabales
Famille :	Fabaceae
Subfamille :	Faboideae
Tribu:	Genisteae
Genre :	<i>Cytisus</i>
Espèce :	<i>Cytisus triflorus</i>

3.3. Utilisations thérapeutiques

La plante *Cytisus triflorus* est largement utilisée dans la médecine traditionnelle en raison de ses activités bénéfiques mais malheureusement, un nombre très restreint des études pharmacologiques ont confirmé scientifiquement une partie d'ethnomédical informations

En raison de ses propriétés astringentes, antiseptiques et cicatrisation des plaies *Cytisus triflorus* est utilisé comme un cataplasme contre l'eczéma et les infections fongiques ou en combinaison avec de l'huile d'olive pour guérir les brûlures (**Hamdi Pasha et al., 2002**). Elle est très connue également dans le Nord de l'Algérie pour ses propriétés médicinales dont elle est utilisée pour traiter les douleurs abdominales, comme cicatrisante de plaies, hémostatique et antifongique, de plus, ses feuilles agissent contre le maux des intestins, elles sont employées aussi comme « le henné » pour traiter et teindre les cheveux (**Ait-Kaci Aourahoun et al ., 2015**).

1. Introduction

Au cours des dernières décennies, il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans différentes régions du monde. Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**Muthu et al., 2006**). Sur terre, il y a près de 240 000 à 300 000 espèces de plantes à fleur, dont moins de 10% auraient été étudiées scientifiquement pour leurs propriétés pharmacologiques (**Diallo, 2001 ; Anthony et al., 2005**). Ainsi le maprouneacin (*Maprounea africana*) utilisé comme agent antidiabétique, le taxol (*Breviflora taxus*) utilisé comme drogue antitumorale, l'artémisinine (*Artemisia annua*) utilisé comme composé antipaludique efficace contre toutes les souches résistantes de *Plasmodium* ont été découverts à partir de plantes et sont directement employés (**Ajibesin et al., 2008**).

En effet, la mise en évidence de différentes classes des métabolites secondaires constituants d'une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. En effet, pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine de ses activités biologiques qui sont aussi en dépendance avec la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives (**Lee et al., 2003**).

Au cours de notre travail, nous avons entrepris une étude phytochimique de la plante médicinale *Cytisus triflorus* qui. Pour cela, un screening phytochimique a été effectué afin de connaître ses principaux constituants et, ainsi, mieux comprendre les propriétés pharmacodynamiques de ses extraits.

2. Matériel et méthodes

Notre travail a porté sur les feuilles de *Cytisus triflorus* récoltée dans la région de Collo, Wilaya de Skikda.

2.1. Choix de la plante

Le choix de l'espèce *Cytisus triflorus* s'est basé sur une enquête ethnobotanique réalisée à l'aide d'un questionnaire, auprès de la population de la région de Collo, wilaya de Skikda, ayant connaissance de l'usage des plantes en médecine traditionnelle. Les arguments justifiant ce choix sont :

- La plante est annuelle, très connue et très utilisée par la population dans le traitement de plusieurs affections notamment la cicatrisation des plaies et des brûlures.
- Elle a été peu étudiée et peut être la source de nouvelles substances bioactives.
- Elle possède un large éventail de principes actifs (huiles essentielles, polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, etc.)

2.2. Description et choix de la région de récolte

La région de Collo, wilaya de Skikda, a été choisie préférentiellement à d'autres régions, vu que :

- Ses montagnes sont dotées de ressources inépuisables de plantes médicinales, ces zones sont considérées comme des zones vierges où l'activité humaine est minime.
- Sa population a une bonne connaissance de l'utilisation des plantes médicinales qui jouent encore chez elle un rôle essentiel dans les soins de santé primaire.

Les coordonnées ainsi que la carte géographique de la région de récolte sont représentés respectivement dans le **tableau 2** et la **figure 9**.

Tableau 2 : Situation géographique de la région de récolte (PDAU, APC Collo, 2015)

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Climat
Collo	26m	37° 0' 23" Nord	6° 33' 39" Est	Méditerranéen avec été chaud



Figure 9 : Carte géographique de la région de récolte.

2.3. Récolte et identification de la plante

L'identification botanique de notre espèce a été réalisée par Pr. Bennadja, laboratoire de biologie végétale, département de pharmacie, université Badji Mokhtar, Annaba et Dr. Hamel, laboratoire des plantes médicinales, département de biologie, université Badji Mokhtar, Annaba.

Les feuilles de *Cytisus triflorus* ont été récoltées dans la région de Collo, wilaya de Skikda, durant le mois de mars de l'année 2015. Elles ont été séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant une semaine puis réduites en poudre et conservées.

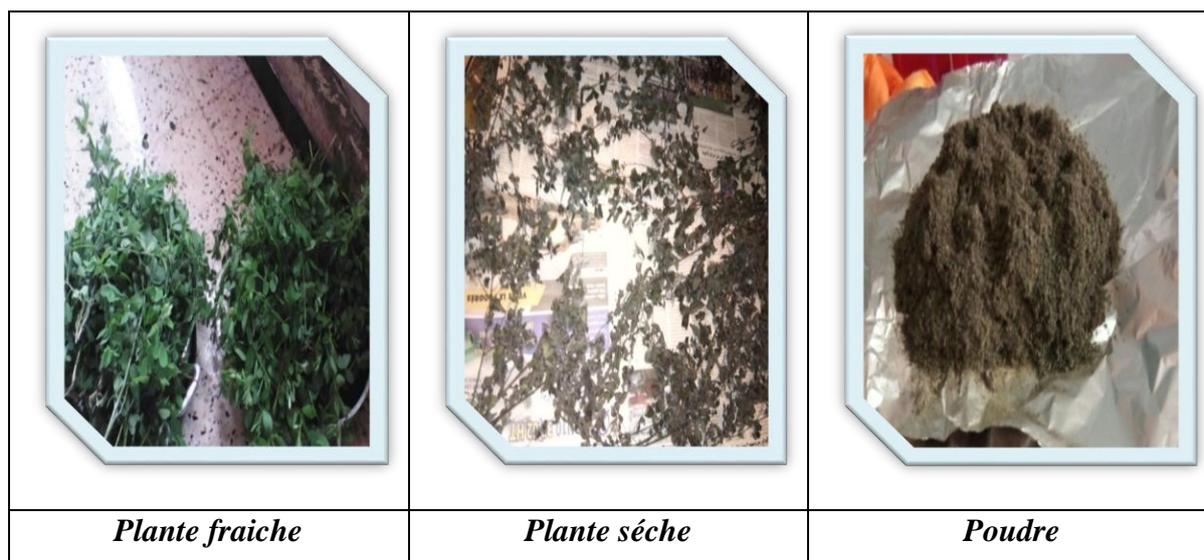


Figure 10 : Préparation du matériel végétal.

2.4. Screening phytochimique

Des tests préliminaires ont été réalisés sur les feuilles de notre plante en vue de mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires ; ceux-ci pourraient être à l'origine des effets thérapeutiques que nous recherchons. Ces essais ont été menés selon les techniques décrites par **Trease et Evans, 1987**.

A. Préparation de l'extrait aqueux

10g de poudre végétale sont mis à macérer dans 100ml d'eau distillée pendant 24H sous agitation permanente.

L'extrait aqueux obtenu après filtration est soumis aux tests des saponosides, des tanins et de l'amidon comme représenté sur les figures ci-dessous :

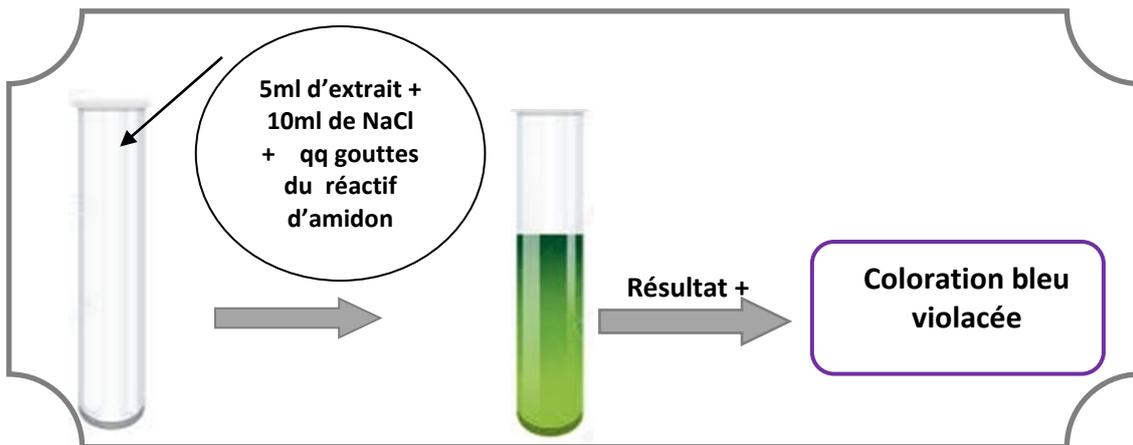


Figure 11 : Test d'Amidon.

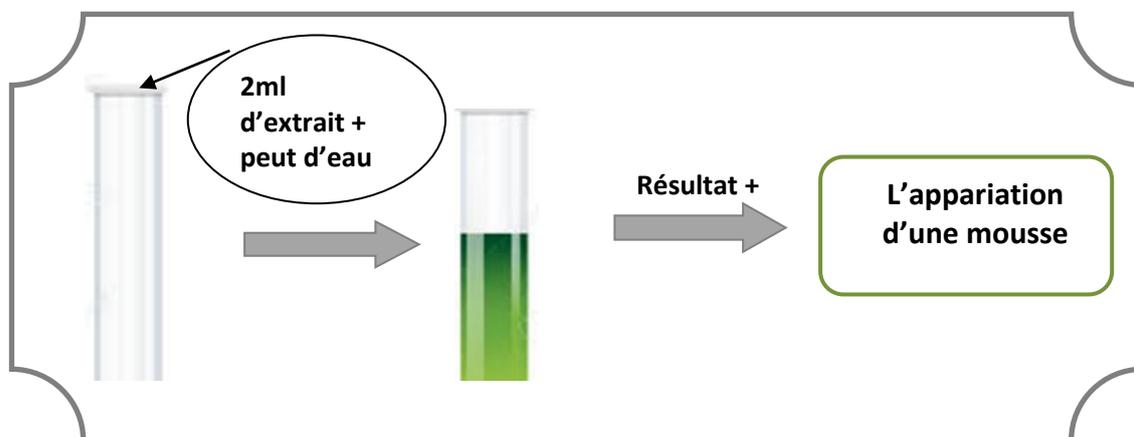


Figure 12: Test des Saponosides.

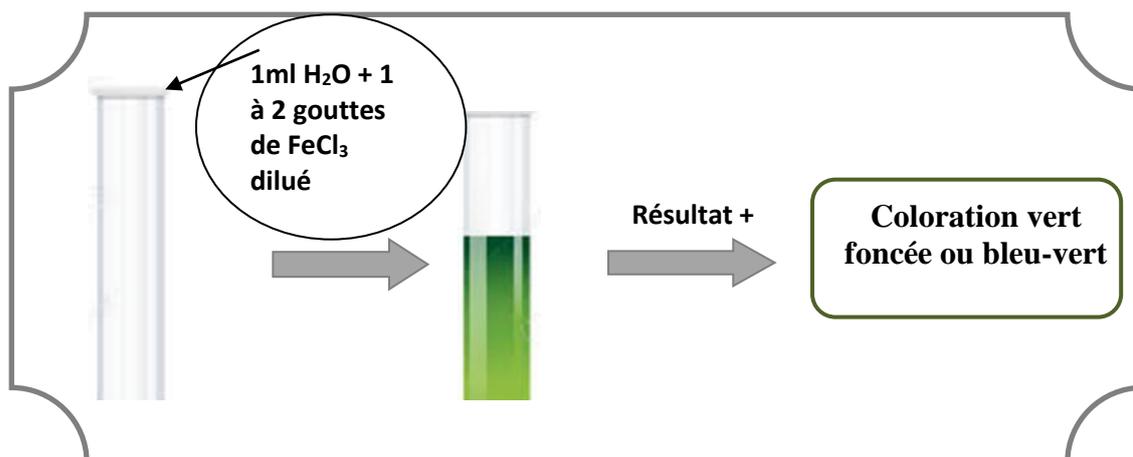


Figure 13 : Test des tanins.

B. Préparation de l'extrait méthanolique

10g de poudre végétale sont mis à macérer dans 100ml de méthanol pur pendant 24H sous agitation permanente.

L'extrait méthanolique obtenu après filtration est soumis aux tests des flavonoïdes, des tanins et des composés réducteurs comme représenté sur les figures ci-dessous :

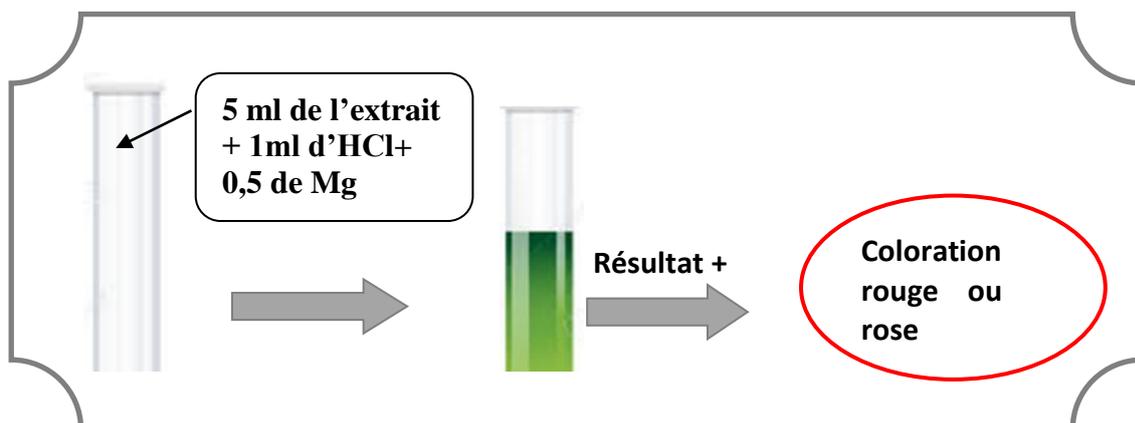


Figure 14 : Test des Flavonoïdes.

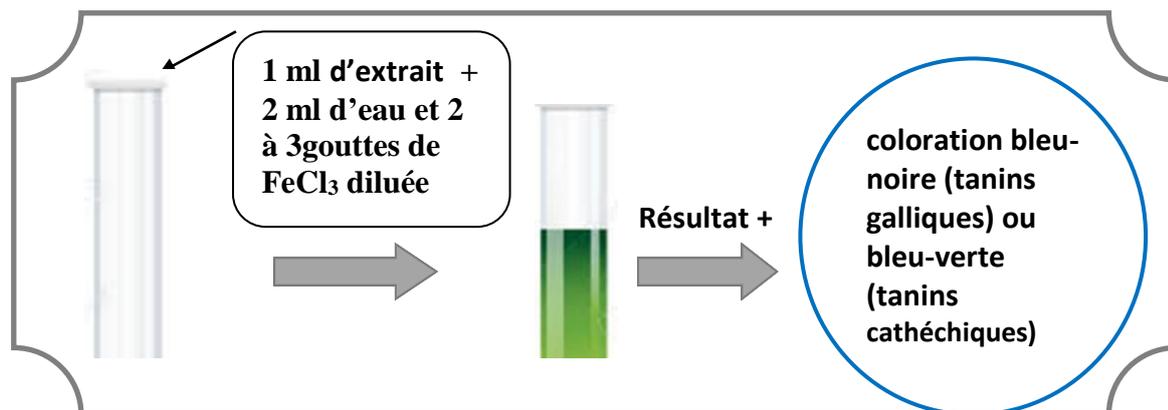


Figure 15 : Test des Tanins.

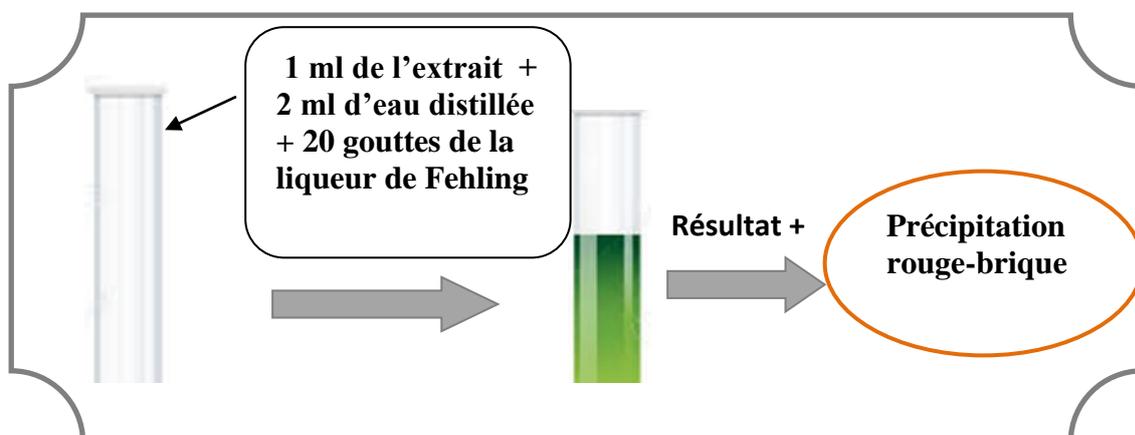


Figure 16 : Test des composés réducteurs.

C. Autres tests**➤ Stérols et triterpènes**

Il se fait sur un macérât de 24H à 5 % dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec de l'anhydride acétique puis du chloroforme. Déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante étant verte ou violette (**Trease et Evans, 1987**).

➤ Alcaloïdes

10g de poudre végétale sont mis à macérer dans 50ml d' H₂SO₄ dilué au 1/10^e pendant 24H sous agitation permanente.

Après filtration, 1ml du macérât est introduit dans un tube à essai auquel est ajouté 5 gouttes du réactif de Mayer. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15min indique la présence d'alcaloïdes (**Paris et al., 1969**).

➤ Anthocyanes

2ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2ml d'HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose- rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (**Paris et al., 1969 ; Debrayb et al., 1971**).

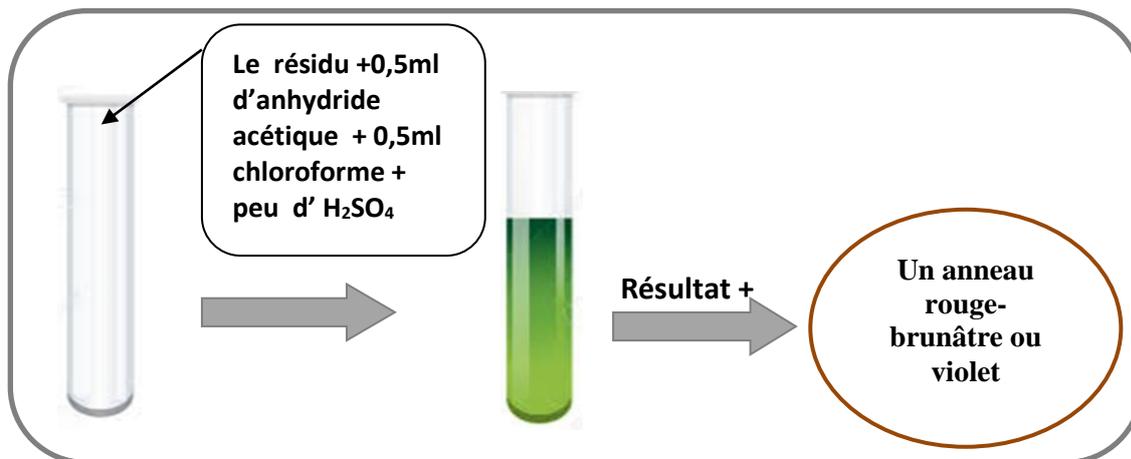


Figure 17 : Test des Stérols et triterpènes.

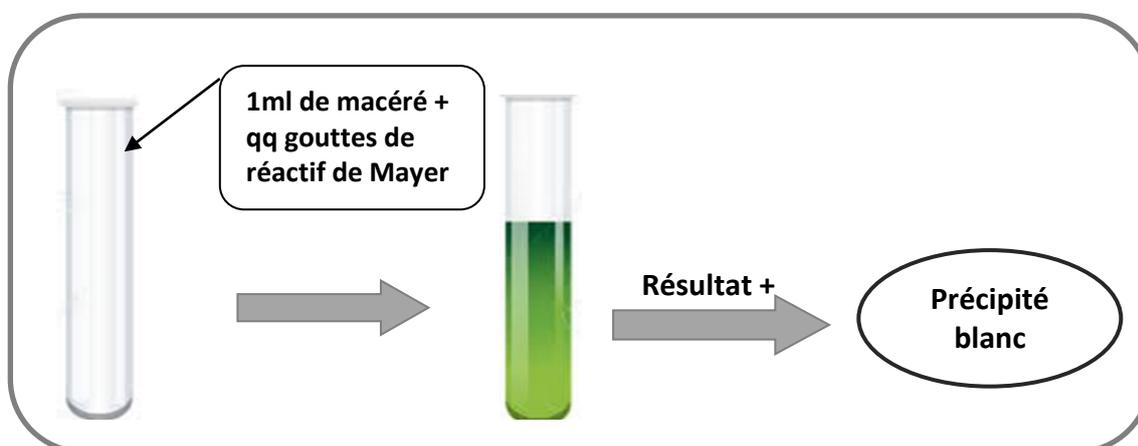


Figure 18 : Test des Alcaloïdes.

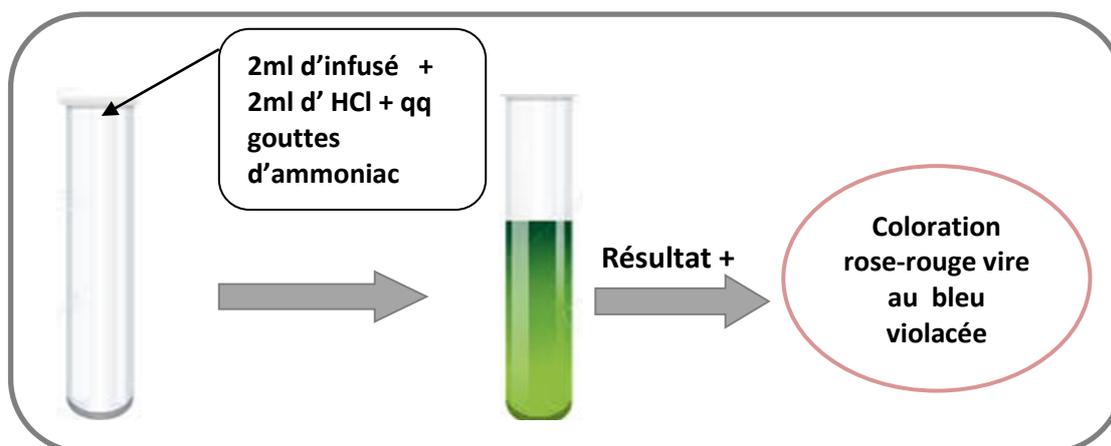


Figure 19 : Test des Anthocyanes.

2.5. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles sèches de notre plante a été réalisée par macération dans une solution hydro-méthanolique à 80%. Le rapport matériel végétal / solvant était de (1/10 : m/v). La macération s'est étalée sur trois jours successifs avec renouvellement du solvant toute les 24 heures.

Après filtration, les filtrats sont soumis à une évaporation à basse pression à 65°C, pour éliminer le maximum de solvant et concentrer l'extrait. Par la suite, l'extrait est conservé au réfrigérateur pendant 24H, afin de décanter les cires, les boues et les lipides risquant de gêner la suite des opérations.

La phase limpide a ensuite subi un lavage par l'éther de pétrole (v/v) et l'opération est répétée 3 fois permettant ainsi d'éliminer les restes de cires, lipides et de chlorophylle. Après lavage, l'extrait subit une nouvelle évaporation à sec et est conservé dans des boîtes de pétri en verre à 4°C (Benhammou *et al.*, 2007 ; Marston et Hotsmann, 2006).

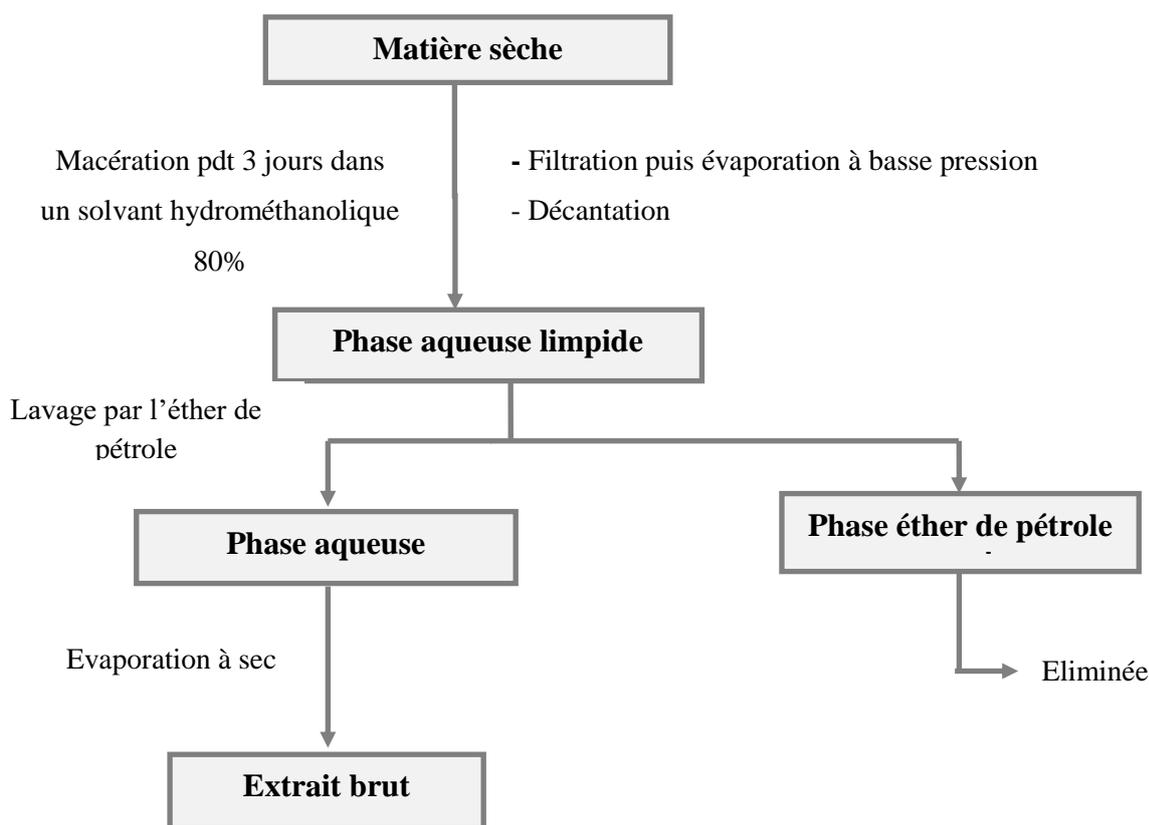


Figure 20 : Extraction des polyphénols totaux.

2.6. Calcul du rendement en extrait sec

Le rendement de la plante en extrait sec est calculé grâce au rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P_1 - P_2}{P_3} \times 100$$

P₁ : poids du ballon du rota vapeur après évaporation.

P₂ : poids du ballon vide.

P₃ : poids de la matière végétale de départ (poudre).

2.7. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu phénolique total de notre extrait brut a été estimé par une méthode spectrophotométrique après réaction avec le réactif de « Folin-Ciocalteu ». Celui-ci, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphobolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), 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 maximale est comprise entre 725 et 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal.

La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0 - 200µg) et est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg d'EAG/g d'extrait) (**Boizot et Charpentier, 2006**).

2.8. Dosage des flavonoïdes totaux

Le contenu flavonoïdique total de l'extrait brut a été mesuré par une méthode colorimétrique en utilisant le réactif de chlorure d'aluminium (AlCl₃). Ce réactif forme un complexe flavonoïdes-Aluminium ayant un maximum d'absorption à 430nm.

Les résultats sont calculés à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec de la quercétine et exprimée en milligramme équivalent de la quercétine par gramme d'extrait (mg d'QE/g d'extrait) (**Djeridane et al., 2006**).

3. Résultats et discussion

3.1. Enquête ethnobotanique

Cinquante-six personnes, sans distinction d'âge ou de sexe, ont été interviewées. A l'issue de l'enquête ethnobotanique complétée par une recherche bibliographique, une liste des plantes médicinales spontanées les plus utilisées dans la région de Collo a été dressée. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Espèces médicinales les plus utilisées dans la région de récolte et leurs propriétés thérapeutiques.

Famille	Nom Latin	Nom français	Nom local	Effet thérapeutique
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Thym	Zaâtar	- Soulage la toux causée par la bronchite et l'inflammation des voies respiratoires. - Soulage les troubles digestifs.
	<i>Teucrium polium</i> L.	Pouliot de montagne	Kheyata	- Soulage les douleurs gastriques. - Aide à éliminer les sécrétions bronchiques. - Traite les maux de tête.
	<i>Ajuga iva</i> screb.	Ivette musquée	Chandaguoura	- Apaise le diabète, l'hypertension artérielle et les douleurs rhumatismales. - Traite les diarrhées et les douleurs gastriques.
	<i>Mentha pulegium</i> L.	Menthe pouliot	Fliou	- Stimule la digestion et lutte contre les gaz abdominaux et les brûlures d'estomac.
	<i>Lavandula stoechas</i>	Lavande	Lehle le maiz	- Lutte contre l'irritabilité, la nervosité et l'insomnie.
	<i>Origanum majorana</i>	Marjolaine	Machdakoura	- Calme les douleurs rhumatismales et les coliques. - Lutte contre l'insomnie.
	<i>Asphodelus tenuifolius</i> L.	Asphodèle	Alberwag	- Soigne les blessures, les abcès et les verrues. - Effet bénéfique sur les problèmes de la peau.
	<i>Marrubium vulgare</i>	Marrube blanc	Tamarriouet	- Traite les rhumes, les maux de gorge, la toux et les bronchites.

				- Soulage la douleur et apaise les troubles digestifs.
Asteraceae	<i>Inula viscosa</i> L.	Aunée visqueuse	Magramane	- Aide à la cicatrisation des plaies. - Arrête les hémorragies. - Soigne la diarrhée.
	<i>Achillea millefolium</i> L.	Achillée millefeuille	Belkissoum	- Soulage les douleurs gastriques et intestinales. - Traite les infections des voies respiratoires. - Fait baisser la fièvre.
	<i>Taraxacum officinalis</i> Wig.	Pissenlit	Edada	- Aide à la cicatrisation des brûlures.
	<i>Artemisia absinthium</i>	Absinthe	Echih	- Soulage les maux d'estomac. - Soulage la fatigue et les maux de tête.
	<i>Pulicaria odora</i>	Pulicaire odorante	Ouednine elhalouf	- Soigne l'ulcère gastrique. - Abaisse la tension artérielle.
Anacardiaceae	<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Lentisque	Eddarou	- Soigne les troubles gastro-intestinaux, les affections respiratoires et les maladies de la peau.
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i> L.	Laurier rose	Eddefla	- Fait Baisser la fièvre, la glycémie et le cholestérol. - Facilite la digestion et réduit les spasmes et les flatulences.
Fabaceae	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Caroubier	Kharroube	- Traite l'hypercholestérolémie et la diarrhée.
	<i>Cytisus triflorus</i>	Cytise à trois fleurs	Allega	- Aide à la cicatrisation des brûlures. - Soigne les troubles gastro-intestinaux et les affections des voies respiratoires.
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i> L.	Laurier noble	Errand	- Traite la bronchite, la sinusite et la grippe. - Lutte contre les troubles rhumatismaux et arthritiques.
Rosaceae	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Ronce commune	Alallig	- Possède un effet anti-inflammatoire de l'intestin et de la bouche.
Cupressaceae	<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Cyprès	Assanaouber	- Calme les hémorragies utérines durant la ménopause. - Soulage les pathologies veineuses telles que les jambes lourdes, les varices et les hémorroïdes.

<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Paronychia argentea</i> Lam.	Paronyque argentée	Fattet-elhadjar	- Antilithiasique.
<i>Myrtaceae</i>	<i>Myrtus communis</i>	Myrte	Errayhene	- Soigne la diarrhée et les gaz abdominaux. - Fait baisser la tension artérielle.
	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Eucalyptus	Calytous	- Traite l'inflammation des voies respiratoires. - Soulage les douleurs rhumatismales et les maux de tête.
<i>Malvaceae</i>	<i>Malva sylvestris</i>	Mauve sauvage	Khobiiza	- Soulage l'asthme allergique et la grippe.
<i>Urticaceae</i>	<i>Urtica dioica</i> L.	Ortie	Herrigua	- Agit contre les douleurs de l'arthrite et du rhumatisme. - Soulage l'inflammation bénigne de la prostate.

Les résultats collectés nous ont donné un aperçu général des plantes médicinales les plus utilisées par la population de Collo ainsi que leur pouvoir curatif. Plus d'une trentaine d'espèces, à l'exclusion des espèces mal connues, sont répertoriées comme plantes à usage médicinal et aromatique, et exploitées en usage traditionnelle.

Les résultats obtenus montrent que le niveau de connaissance des propriétés curatives de certaines espèces est variable, en général, les femmes connaissent les plantes médicinales qu'elles peuvent utiliser en cas de maux d'estomac, de douleurs abdominales et de fièvre. Les plantes concernées sont des espèces communes tels que : *Thymus vulgaris*, *Mentha pulegium*, *Laurus nobilis*, *Eucalyptus globulus* et *Artemisia absinthium*.

Les connaissances des enquêtés sur les plantes médicinales varient également avec l'âge, la scolarisation, la richesse végétale de leur environnement immédiat et probablement aussi avec le revenu familial. En effet, les espèces dont les propriétés médicinales sont moins connues, ne sont généralement collectées et utilisées que par certaines femmes âgées et/ou guérisseuses.

D'autre part, les propriétés thérapeutiques des espèces médicinales dans la région de Collo sont très diversifiées et vont des malaises les plus courants comme le mal de tête et le mal d'estomac, aux pathologies chroniques comme le diabète et les calculs rénaux pour lesquels plusieurs espèces médicinales peuvent être préconisées. Dans le cas des maladies cardiovasculaires, plusieurs espèces peuvent être utilisées, par exemple *Myrtus communis* et *Pulicaria odora*. En cas de douleurs rhumatismales, la population de la région emploie

Ajuga iva, *Laurus nobilis*, *Urtica dioica* et *Eucalyptus globulus*. Contre les maux de tête : *Artemisia absinthium* et *Teucrium polium* seraient efficaces.

En outre, une même espèce végétale peut être employée pour traiter plusieurs pathologies, c'est le cas d'*Ajuga iva*, employée pour soulager le diabète, l'hypertension artérielle, les rhumatismes, les diarrhées et les douleurs gastriques. *Cytisus triflorus* est, quant à elle, utilisée contre les troubles gastro-intestinaux et les affections des voies respiratoires ainsi que pour améliorer la cicatrisation des brûlures.

Les principales indications de ces plantes ont été déterminées par leur fréquence d'utilisation car dans une étude ethnopharmacologique, la fréquence par laquelle une plante donnée est mentionnée dans le traitement d'une affection peut être un bon indicateur de son efficacité.

3.2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés dans le but de mettre en évidence les différents métabolites secondaires responsables de la plupart des activités biologiques de notre espèce végétale, sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou de la coloration, qui sont proportionnelles à la quantité de la substance recherchée. Les résultats expérimentaux de ces tests pratiqués sur les feuilles *Cytisus triflorus* de la région de Collo sont regroupés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Résultats du screening phytochimiques des feuilles de *Cytisus triflorus* de la région de Collo, wilaya de Skikda.

<i>Extrait</i>	<i>Groupes chimiques</i>	<i>Observation</i>
<i>Extrait aqueux</i>	Saponosides	+
	Tanins	++++
<i>Extrait méthanolique</i>	Flavonoïdes	++++
	Tanins	++++
	Composés réducteurs	-
<i>Autre Extrait</i>	Alcaloïdes	+++
	Anthocyanes	-
	Stérols et triterpènes	+

++++ : Très abondant ; +++ : abondant ; ++ : moyen ; + : faible ; - : absent

Les résultats enregistrés révèlent une composition riche et variée en métabolites secondaires où les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes sont présents en quantité importantes alors que les saponosides, les stérols et triterpenes existent en faibles quantités avec l'absence de composés réducteurs et des anthocyanes.

Le *Cytisus triflorus* récoltée dans la région de Collo constitue un ensemble riche en substances actives qui lui confèrent diverses propriétés biologiques. En effet, les résultats montrent que les feuilles de la plante sont très riche en flavonoïdes, ceux-ci représentent les pigments universels des végétaux responsables de la coloration des fruits, des fleurs et souvent des feuilles, ils sont très connus par leurs activités biologiques, ce sont des antioxydants par excellence (Husain *et al.*, 1987 ; D'abrosca *et al.*, 2007), des

antiulcéreux, antispasmodiques, analgésiques, anti-sécrétoires et anti-diarrhéiques (**Di Carlo et al, 1999**).

Les tanins sont des esters de l'acide gallique ou de glucose. Leurs propriétés biologiques sont liées à leur pouvoir de former des complexes avec les macromolécules en particulier les protéines, ils ont des propriétés intéressantes à titre d'exemple, ils sont antioxydants, antibactériens, antiseptiques, et anti-inflammatoires (**Bruneton, 1999**).

Le test positif des alcaloïdes, par addition du réactif de Mayer, nous a montré leur présence par l'apparition d'un précipité blanc. Ils forment un groupe important de substances naturelles d'intérêt thérapeutique par leur diversité structurale et l'éventail de leurs activités pharmacologiques. Ce sont des substances azotées qui dans certains cas, peuvent être toxiques, faisant que la plante doit être manipulée avec prudence (**Bruneton, 1999**).

Les stérols présents en quantité massive entrent en compétition avec le cholestérol animal, ce qui peut entraîner une diminution de son absorption. Alors que les terpènes peuvent conférer à la plante des effets antibiotiques et anticancéreux. Quant aux saponosides, ce sont des antiviraux, hypocholestérolémiant, hépatoprotecteurs, antitumoraux et anticancérigènes (**Hayashi et al ., 1997 ;Kuzuhara et al., 2000 ; Kerwin, 2004**).

3.3. Rendement en extrait polyphénolique brut

L'extraction par macération des feuilles de *Cytisus triflorus* dans un mélange hydrométhanolique (80%) a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brut avec un rendement de 21,33 %. Les caractéristiques macroscopiques de l'extrait sont représentées dans le **tableau 05** et sur **la figure 10**.

Tableau 5 : Caractéristiques de l'extrait polyphénolique obtenu par macération de la poudre des feuilles de *Cytisus triflorus*.

Extrait	Couleur	Aspect	Rendement (%)
Extrait méthanolique de <i>Cytisus triflorus</i>	Vert foncé	Gel visqueux	21,33%

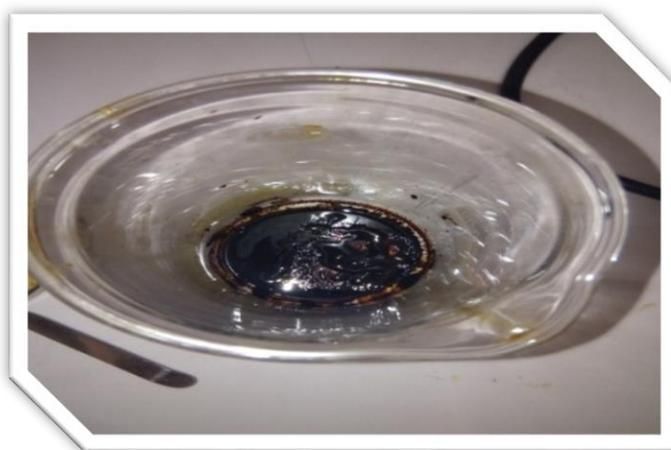


Figure 21 : Extrait brut des composés phénoliques des feuilles de la plante médicinale *Cytisus triflorus* (original).

3.4. Teneur en composés phénoliques

L'étude quantitative de l'extrait brut hydroalcoolique des feuilles de *Cytisus triflorus* au moyen de dosages spectrophotométriques, nous a permis de déterminer la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **tableau 6** et sur la **figure 20**.

Tableau 6 : Teneur en composés phénoliques.

Composé phénolique	Teneur
Polyphénols totaux	277.268 ± 0,848 ^a
Flavonoïdes totaux	44,155 ± 0,341 ^b

(Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± l'écart type)

^a : mg d'EAG/g d'extrait ^b : mg de QE/g d'extrait

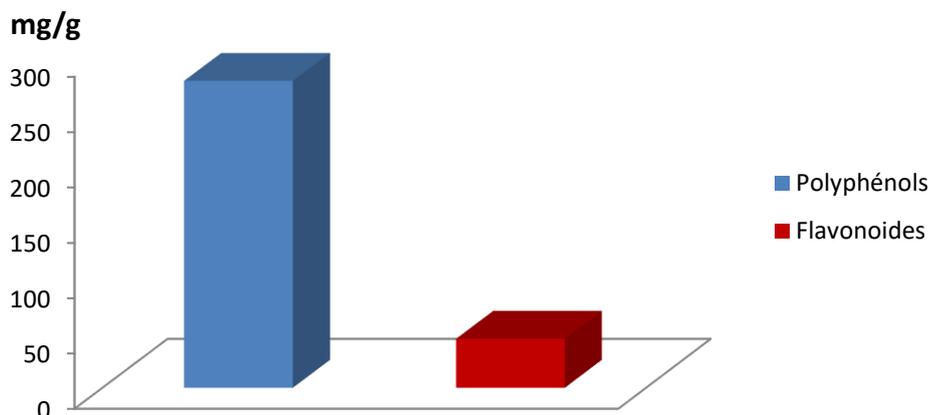


Figure 22 : Teneur en composés phénoliques

La détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette teneur a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique qui montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations, et est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg GAE/g).

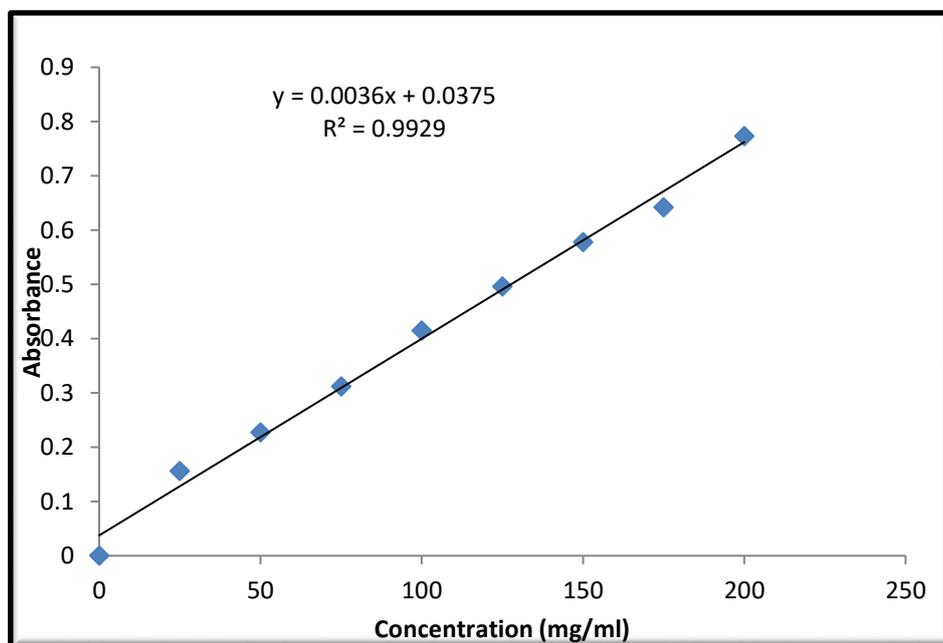


Figure 23 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

La méthode au trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans l'extrait brut, dont la quantité a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de quercétine, et est exprimée en mg équivalent de quercétine par g d'extrait (mg QE/g).

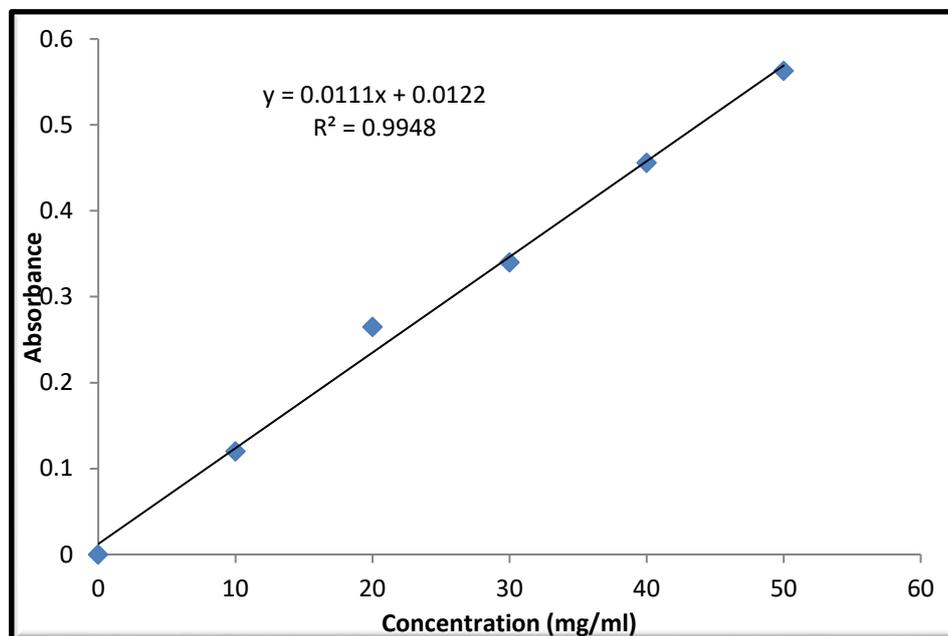


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

La phytochimie quantitative a révélé des taux élevés et variables en polyphénols et flavonoïdes, en effet, les études précédentes montrent que le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques (**Sahreem et al., 2010 ; Xia et al., 2010 ; Bouzid et al., 2011**). Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (**Seidel, 2005**). De plus, le déroulement de la macération sous agitation pendant un temps étalé (72H) et à température ambiante permet, respectivement, l'épuisement du solvant en composés extraits et la prévention de leur altération ou modification probable par la température élevée, en plus, l'extraction hydroalcoolique a été faite après avoir séché la plante à l'ombre et l'avoir pulvérisé. En fait, l'utilisation d'un matériel sec est recommandée du moment que les flavonoïdes (particulièrement les glycosides) peuvent être soumis à une dégradation enzymatique quand le matériel végétal est frais ou non séché (**Marston et Hostettmann, 2006**). De plus, les fermentations microbiennes causées par l'humidité peuvent être la cause de cette dégradation (**Seidel, 2005**).

D'autre part, le réactif de Folin-Ciocalteu est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). Le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane *et al.*, 2006), donc le dosage par ce réactif donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007). La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique.

Une étude effectuée par Ait-Kaci *et al.* (2015) sur la même espèce provenant de la région d'Azazga a révélé des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes égale à $204 \pm 4,24$ mg EAG/g et $52,13 \pm 1,69$ mgQE/g, respectivement. Ces valeurs sont très proches de nos résultats avec une légère différence qui peut être due à plusieurs facteurs parmi lesquels nous pouvons citer : l'état physiologique de la plante au moment de la récolte, en effet la composition chimique d'une drogue varie avec son cycle végétatif, ces variations peuvent être qualitatives : apparition d'un principe actif et disparition d'un autre, et/ou quantitatives : la teneur en principes actifs peut passer par un maximum et décroître ensuite rapidement ; donc le choix de la période de récolte est très important.

La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (Lee *et al.*, 2003), ainsi que les différences génotypiques et géographique des plantes, en effet, il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas elle favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (Andrew, 2005 ; Perez *et al.*, 2011).

Nos résultats sont aussi très proches de ceux trouvés dans d'autres espèces du genre *Cytisus* ; c'est le cas de *Cytisus scoparius* dont la teneur totale en phénols des extraits éthanoliques de cette plante était de 225,32 mg équivalents d'acide gallique/g d'extrait sec (González *et al.*, 2013).

1. Introduction

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des bactéries qui vont progressivement coloniser son revêtement cutané-muqueux. Pour résister à ces bactéries de nombreux moyens sont mis en jeu: les barrières anatomiques, les mécanismes de résistances naturelles et l'immunité acquise. Les infections bactériennes sont causées par différentes bactéries et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues (**Kaufmann, 1997**). En particulier, les infections nosocomiales sont des infections qui sont contractées dans un milieu hospitalier, une infection est considérée comme telle lorsqu'elle était absente au moment de l'admission du patient et apparaît après un délai de 48 heures d'hospitalisation (**Grundmann et al., 2006**).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques dont leur utilisation à grande échelle et parfois inappropriée conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations bactériennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons), elle s'est développée contre la majorité des antibiotiques rendant ainsi les traitements inefficaces (**Gopal Rao, 1999**).

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (MRSA), les entérocoques résistants à la vancomycine et les pseudomonas résistants sont des exemples de bactéries multirésistantes qui deviennent un véritable problème de santé publique. Les MRSA et les pseudomonas sont probablement les bactéries résistantes les plus communes trouvées dans les hôpitaux, responsables d'infections nosocomiales (**Grundmann et al., 2006**) dont ils sont les deux types de bactéries les plus fréquemment isolées dans les services de brûlés en posant des vrais problèmes thérapeutiques, étant l'une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les brûlés dont il est nécessaire de chercher des nouveaux agents antibactériens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) (**García-Ruiz et al., 2008 ; Kempf et Zeitouni, 2009**).

A cet effet, le développement du traitement alternatif semble être nécessaire d'où l'intérêt croissant aux pouvoirs antibactériens des substances biologiquement actives issues des plantes médicinales qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments à partir de produits du métabolisme secondaire tel que les polyphénols, ces substances possèdent de nombreuses vertus ce qui justifie leur utilisation dans de nombreux domaines comme la parfumerie, l'industrie alimentaire, le cosmétique voir même comme agents antibactériens en médecine populaire. Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des bactéries. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines bactériennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**). En plus, plusieurs chercheurs ont montré également que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi l'attachement du virus à la cellule hôte (**Mahmoud et al., 1993**)

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer qualitativement et quantitativement l'activité antibactérienne de l'extrait brut des composés phénoliques de la plante médicinale *Cytisus triflorus* contre les deux espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées dans les infections nosocomiales chez les grands brûlés : *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes aux antibiotiques et *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistante.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

❖ Matériel végétal

Notre travail a porté sur l'extrait polyphénolique brut de la plante médicinale *Cytisus triflorus* (**Voir chapitre II**).

❖ Souches bactériennes étudiées

Un nombre de 09 souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes et de 09 souches de *Staphylococcus aureus* méthécillino-résistantes ont été isolées de prélèvements d'origine pathologique provenant du service des grands brûlés de deux centres hospitalo-universitaires de la ville de Annaba: CHU Dorban et CHU Ibn-Rochd durant la période du mois de Décembre 2015 au mois d'Avril 2016.

2.2. Méthodes

L'ensemble des techniques faites au cours de cette étude bactériologique ont été effectuées au sein du laboratoire de microbiologie Appliquée université Badji Mokhtar Annaba

La vérification de la pureté des souches, l'identification biochimique ainsi que le test de sensibilité aux antibiotiques ont été effectués dans le cadre d'un mémoire de fin d'étude en master spécialité microbiologie.

2.2.1. Test du pouvoir antibactérien

Nous avons testé le pouvoir antibactérien de notre extrait végétal par deux méthodes :

❖ Méthode de diffusion en disque

• Principe

Cette méthode est inspirée de l'antibiogramme, elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des extraits végétaux par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier buvard ou de cellulose imprégné d'extrait ou de produit à base d'extrait végétal.

- **Mode opératoire**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée selon la technique de diffusion décrite par **Vincent (1991)**.

- ✓ **Préparation de la suspension bactérienne**

- A partir d'une culture jeune sur gélose nutritive, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester.
- Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, la suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau distillée stérile s'il est trop fort.

- ✓ **Préparation de la solution mère de l'extrait et des disques**

L'extrait polyphénolique a été dissous dans un solvant organique le diméthyl sulfoxyde (DMSO). On a opté pour ce solvant pour son innocuité vis-à-vis des bactéries, et pour l'absence d'interférence avec l'extrait testé.

A l'aide d'un emporte-pièce, des disques de 6mm de diamètre de papier Wattman N°40 sont fabriqués. En suite, ces disques sont mis à l'autoclavage dans un tube à essai stérile.

- ✓ **Ensemencement**

- Le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé en boîte de pétri à une épaisseur de 0.4mm.
- Après la solidification, la surface de la gélose estensemencée parécouvillonnage avec l'inoculum.
- Un disque de papier Wattman stérile imprégné dans la solution mère de l'extrait est placé à la surface de la boîte de Pétri, un disque imprégné de DMSO a été placé pour servir du témoin.
- Incuber à 37° C pendant 24 h.

✓ Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de disque où aucune croissance n'est observée.

Pour la détermination de la nature de l'effet antibactérien de notre extrait un prélèvement à l'anse est réalisé autour chacun des disques ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé en stries sur gélose Mueller-Hinton. La boîte ensemencée est incubée à 37C° pendant 24h.

❖ Méthode de dilution en milieu solide**• Principe**

Cette méthode se base sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle aucune croissance visible à l'œil nu n'est observé, cette technique consiste à disperser l'extrait à des concentrations variable dans le milieu gélosé avant sa solidification et à inoculer ce milieu avec les souches bactériennes à tester (Skandamis et Nyeha, 2001).

• Mode opératoire

La détermination de la CMI a été réalisée selon la technique décrite par **Benjilali et al (1986)** et rapporté par **Billerbeck et al (2002)**.

- Une gamme de concentration de l'extrait dilué dans le DMSO a été préparée avec des dilutions successives à raison de ½ (la concentration de la solution mère est de 40mg/ml)
- 2 ml de chaque dilution a été incorporée à 18 ml de MH maintenu en surfusion.
- Aussitôt, le mélange a été réparti dans des boites de Pétri. Après solidification du milieu, l'ensemencement a été exécuté par des spots à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Un témoin de croissance a été réalisé.
- L'ensemble a été incubé à 37C° pendant 24h.

• Lecture

La CMI sera donnée par la première des concentrations de l'extrait qui inhibe sur la gélose toute culture apparente.

Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne de trois essais.

3. Résultats et discussion

Rappelons que le choix des souches bactériennes à tester a été basé sur leur fréquence dans les infections nosocomiales des grands brûlés ainsi que leur caractère de multirésistance envers les antibiotiques classiques.

3.1. Méthode de diffusion en disque

La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait polyphénolique brut de *Cytisus triflorus* (incluant le disque 6 mm).

Souches bactériennes	Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
	DMSO (témoin)	Extrait Brute
<i>S.aureus</i> ATCC	-	10,4
<i>S. aureus 1</i>	-	10,5
<i>S.aureus 2</i>	-	13
<i>S. aureus 3</i>	-	15,7
<i>S. aureus 4</i>	-	18,1
<i>S. aureus 5</i>	-	13,2
<i>S. aureus 6</i>	-	16,05
<i>S. aureus 7</i>	-	17,2
<i>S. aureus 8</i>	-	17,45
<i>S. aureus 9</i>	-	10
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	-	8,3
<i>P. aeruginosa 1</i>	-	9,4
<i>P. aeruginosa 2</i>	-	12,3

<i>P. aeruginosa 3</i>	-	-
<i>P. aeruginosa 4</i>	-	-
<i>P. aeruginosa 5</i>	-	10,6
<i>P. aeruginosa 6</i>	-	9,3
<i>P. aeruginosa 7</i>	-	-
<i>P. aeruginosa 8</i>	-	11,7
<i>P. aeruginosa 9</i>	-	9,85

- : Absence d'une zone d'inhibition.

Les résultats enregistrés révèlent que l'extrait polyphénolique brut de *Cytisus triflorus* exerce un effet antibactérien vis-à-vis de 17 souches bactériennes testées de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition de 10-18 mm et 8-12 mm respectivement ,cependant, les souches de *Staphylococcus aureus* sont les plus sensibles. Le DMSO n'a, cependant, produit aucun effet vis-à-vis de toutes les souches testées.

Nous avons procédé également au repiquage des souches à partir des zones d'inhibition sur la gélose nutritive afin de déterminer la nature de l'activité antibactérienne. Après 24h l'incubation, la totalité des souches bactériennes repiquées avaient poussé, ce qui indique l'effet bactériostatique de notre extrait brut sur les bactéries testées.

La quantité d'extrait absorbée par les disques ainsi que la mal diffusion de certains composants hydrophiles de l'extrait brut dans la gélose Mueller Hinton pourraient être à l'origine d'absences de certaines zones d'inhibition et de celles qui sont faibles.

3.2. Méthode de dilution en milieu solide

L'ensemble des concentrations minimales inhibitrices obtenues sont consignées dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) en mg/ml.

Souches Extrait (mg/ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC, 1 et 6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2, 5,8 et 9	<i>Staphylococcus aureus</i> 3,4,5 et 6	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC, 1 et 2
Solution mère (40mg/ml)	S	S	S	S
Dilution 1/2	S	S	S	S
Dilution 1/4	R	S	S	S
Dilution 1/6	R	R	S	S
Dilution 1/8	R	R	S	S
Dilution 1/10	R	R	S	R
Dilution 1/12	R	R	R	R
DMSO	R	R	R	R

S: sensible. R : résistante.  : CMI

D'après les valeurs enregistrées, les souches de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* ont montré des sensibilités différentes pour notre extrait méthanolique, par ailleurs, l'étude a révélé des valeurs de CMI relativement élevées, ce qui témoigne d'un pouvoir antibactérien modéré dont il a présenté un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne aux dilutions 1/8 et 1/10, ce qui correspond à une CMI comprise entre 5 et 4mg/ml, et ce contre les souches de *S. aureus*. Les valeurs de CMI les plus élevées ont été enregistrées chez les souches de *P. aeruginosa* sur qui l'efficacité de l'extrait n'a pu être observée qu'à la dilution 1/4, soit 10 mg/ml, avec 3 souches qui se sont montrées résistantes.

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpénoïdes (**Rojas et al., 1992**), le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques. Il est important de souligner aussi que la méthode utilisée, le choix des solvants ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée à chaud ou à froid, affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (**Lee et al., 2003**).

A cet effet, La modeste activité antibactérienne de notre extrait méthanolique envers les souches testées de *S. aureus* méthicilino-résistantes et *P. aeruginosa* multirésistantes pourrait être expliquée par le fait que les conditions de séchage et de broyage des feuilles de la plante sont à l'origine de la génération de chaleur responsable de la perte de certaines molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles qui pourraient être à l'origine de cette activité (**Jones et Kinghorn, 2005**). D'autre part, il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les diterpénoïdes phénoliques, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes (**Fernandez-Lopez et al., 2005**). Ces composés sont de nature hautement lipophile est par conséquent sont extraits par des solvants de faible polarité (**Albano et Miguel, 2010**), en outre, selon **Candan et ses collaborateurs (2003)**, les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'intercaler dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

D'après nos résultats, nous constatons également que le pouvoir inhibitrice de croissance des polyphénols varie d'une espèce à une autre dont *P. aeruginosa* représente l'espèce la plus résistante aux extraits naturels, cette différence de sensibilité des souches bactériennes étudiées peut être expliquée par le fait que les bactéries à Gram- sont censées être plus résistantes que les Gram+, ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (**Inouye et al., 2001, Lopez et al., 2005, Bozin et al., 2006**), la pénétration des composés actifs présents dans les polyphénols est donc différente (**Kheyeret et al., 2014**). Chez les bactéries à Gram -, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; riche en lipopolysaccharides dont les charges négatives

de surface empêchent la diffusion des molécules hydrophobes (Nikaido, 2003), toutefois, quelques composés phénoliques de faible poids moléculaire peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires à l'aide de leurs groupes fonctionnels et se faufiler jusqu'à la membrane intérieure plus vulnérable (Dorman *et al.*, 2000). Autrement dit, les composés hydrophobes sont capables de perturber la membrane plasmique et la membrane externe des bactéries Gram – en induisant sa perméabilité et la mort cellulaire (Wang *et al.*, 2012).

L'effet antibactérien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (Dhaouadi *et al.*, 2010), en effet, de nombreux auteurs, ont constaté que la composition chimique des extraits végétaux affecte directement leurs propriétés biologiques (Celiktas *et al.*, 2007 ; Van Vuuren *et al.*, 2007), donc l'activité antibactérienne de notre extrait brut est probablement due à leurs diversités structurales ; les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les bactéries, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composants (Essawi et Srour, 2000), qui lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement (Sarker *et al.*, 2005). Cela est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols. Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons.

4. Conclusion

Les valeurs de CMI qui sont relativement élevées trouvées avec l'extrait polyphénolique brut de *Cytisus triflorus* constituent un résultat important, car comme nous le savons, c'est la première fois que l'efficacité antibactérienne est rapportée pour cette plante. Vu ces résultats nous pouvons dire que les feuilles de cette plante utilisées

traditionnellement pour traiter les brûlures peuvent probablement prévenir l'infection d'une plaie brûlée ou la désinfecter in vivo.

1. Introduction

Un radical libre est une molécule ou atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche électronique la plus externe ce qui le rend extrêmement réactif. Ils sont produits d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS) (Gutteridge, 1993).

Parmi toutes les espèces susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule tels que lipides, protéines, glucides. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tel l'anion superoxyde O_2^\bullet et le radical hydroxyle OH^\bullet , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^\bullet . D'autres espèces dérivées de l'oxygène tel que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH) peuvent être des précurseurs de radicaux libres. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

Les radicaux libres sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (Gauche et Hausswirth, 2006). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- ✓ des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Hébuterne *et al.*, 2009).
- ✓ des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (Moussard, 2006 ; Revuz, 2009 ; Clos, 2012).
- ✓ du système xanthine déshydrogénase/ oxydase activé lors d'ischémie-reperfusion (Li *et al.*, 2007 ; Valko *et al.*, 2007 ; Lacolley *et al.*, 2007).

- ✓ d'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement (**Tamer, 2003**).

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « *stress oxydatif* » (**Rahman, 2002**). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (**Valko et al., 2007**). Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies (**Aruoma, 1998**). Parmi les, nous citons, les maladie d'Alzheimer (**Smith et al., 1996 ; Smith et al., 2004**), de Parkinson (**Bolton et al., 2000**), de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (**Ali et al., 2008**), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (**Jha et al., 1995**), les oedèmes et vieillissement prématuré de la peau (**Georgetti et al., 2003**) et le cancer (**Ali et al., 2008**).

De nombreuses espèces oxydantes sont produites et bien qu'elles soient souvent indispensables à l'organisme, elles ne sont pas moins responsables de dégâts importants. Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydants. Mais bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels les vitamines et poly phénols, doivent être apportés par notre alimentation. (**Pincemail et Defraigne, 2004**).

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans 3 catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (**Viroto, 2004**).

- ❖ **Prévention à plein temps** : Ce type est un système qui agit en permanence pour but de prévenir la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe, Cu) ou exogènes (quinone) susceptibles de les générer. Par exemple, la liaison de la transferrine (protéine chélatrice) avec deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique rend ce métal incapable d'être impliqué dans les mécanismes d'oxydoréduction générateurs de radicaux libres (**Viroto, 2004**).
- ❖ **Détoxification active suite à une attaque oxydante** : Ce système de défense repose principalement sur 3 enzymes (**Valko et al., 2006**).

- **Super oxyde dismutase (SOD)** : Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde (H₂O₂) et en oxygène.

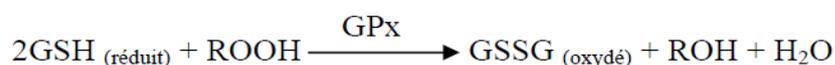
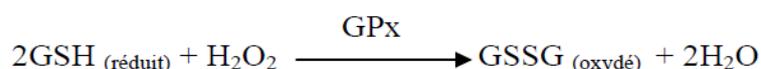


Dans l'être humain, il y a 3 isoformes des SOD à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (**Landis et Tower, 2005**).

- **Catalase** : Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (**Valko et al., 2006**). Elle permet de convertir deux molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂.



- **Glutathion peroxydase** : Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Valko et al., 2006**).



- ❖ **Détoxification passive** : Elle permet la réduction des radicaux oxygénés qui ont pu passer les deux premières lignes de la défense. Elle incluse tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les polyamines, l'acide lipoïque, etc.... (**Svoboda et Hampson, 1999 ; Valko et al., 2006**).

Les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires généralement et les polyphénols particulièrement tant dans la santé et vis-à-vis des maladies pernicieuses (cancer) que dans l'industrie agro-alimentaire. Ces composés qui sont représentés par la famille des flavonoïdes sont très utilisés dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (**Rice-Evans et al., 1996 ; Kolesnikov et Gins, 2001**). Vue leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (**Rice-Evans et al., 1995; Cook et Samman, 1996; Valko et al., 2006**). Notant que l'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux libres est due principalement à leurs structures phénoliques avec la présence des groupements hydroxyles.

Vu ce pouvoir antioxydant majeur des polyphénols, nous nous sommes intéressés dans cette partie de notre travail à l'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des composés phénoliques extraits de la plante médicinale *Cytisus triflorus* où un très peu de travaux se sont penchés sur l'activité antioxydante de cette plante.

2. Matériel et méthodes

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de notre extrait des composés phénoliques de la plante médicinale *Cytisus triflorus* a été réalisée par deux techniques chimiques : le piégeage du radical libre DPPH[•] et le pouvoir réducteur du fer.

2.1. Piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

La méthode du radical de DPPH utilisée dans la présente étude, est une procédure commune dans la quelle l'activité antioxydante de l'échantillon étudié est estimée par le degré de décoloration de la solution de DPPH.

❖ Principe

Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite avec une perte de la couleur violette. La décoloration sera directement proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel à 517 nm. Elle permet d'évaluer le taux de réduction du DPPH et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir antioxydant de l'extrait étudié (Gulçin *et al.*, 2010). La **figure 27** montre la réaction de la réduction du radical DPPH.

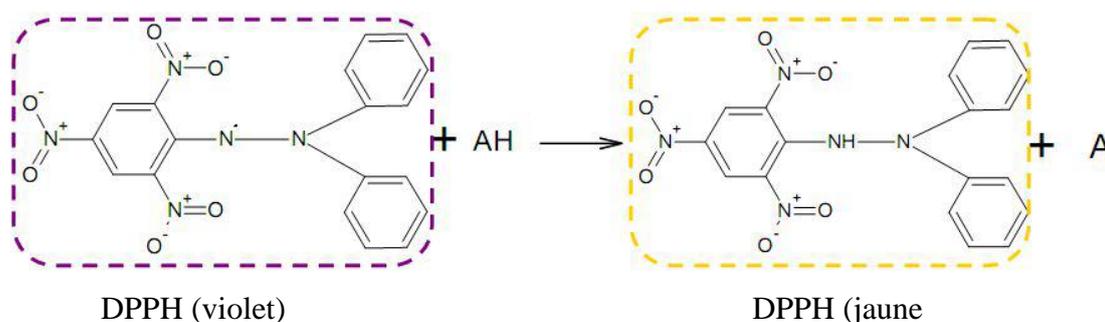


Figure 25 : Réduction du radical DPPH (Boubekri, 2014).

❖ Mode opératoire

L'effet de notre extrait sur le DPPH[•] est mesuré selon la procédure décrite par Brand-Williams *et al.* (1995).

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol (elle ne se conserve pas plus de 4-5 jours à -5C° et à l'obscurité). Un

volume de 100µl de l'extrait végétal (à différentes concentrations) a été ajouté à 2ml de la solution de DPPH. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité. Les absorbances ont été mesurées à 517nm contre le blanc (solution DPPH/méthanol).

Le BHT a été utilisé comme antioxydant synthétique de référence. La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Le pourcentage d'activité antioxydante a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité antioxydante} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517nm.

Le paramètre IC₅₀ (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur), elle a été calculée par régression linéaire à partir des graphes des taux d'inhibition.

2.2. Pouvoir réduction du fer

❖ principe

La technique est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). Cette réaction se manifeste par l'apparition d'une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au potentiel réducteur. la réduction directe de Fe³⁺ (CN⁻)₆ en une forme ferreuse Fe²⁺ (CN⁻)₆ qui est déterminée par la détection spectrophotométrique du complexe (Fe³⁺)₄[Fe²⁺(CN⁻)₆]₃ ayant une forte absorption à 700 nm (**Le et al., 2007**). La couleur jaune du milieu réactionnel change en vert dont l'intensité est en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié (**Zou et al., 2004**). La figure 28 montre le mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant.

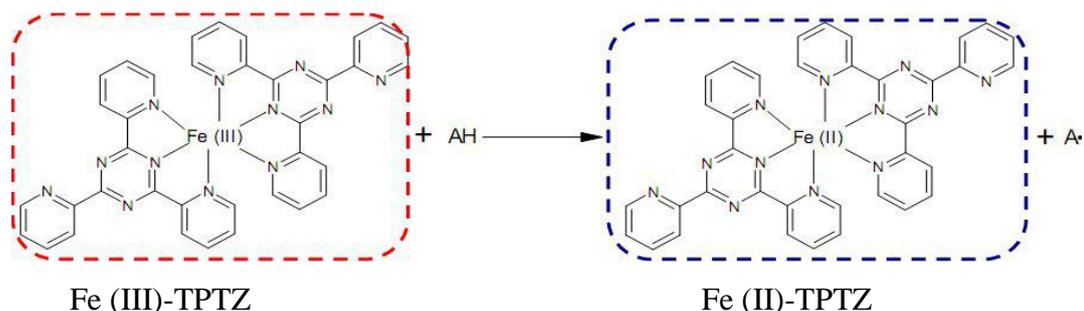


Figure 26 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH) (Djahra, 2013).

❖ Mode opératoire

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986).

Les différentes concentrations des extraits dans l'eau distillée (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne de trois essais \pm SD.

3. Résultats et discussion

3.1. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité antiradicalaires de l'extrait étudié et du témoin positif BHT a été déterminée par la méthode au DPPH dont leur efficacité à piéger le radical DPPH' traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction de leur différentes concentrations. Les **figures 35** et **36** illustrent les résultats obtenus qui sont représentés sous forme de droites chacune avec son équation de régression où l'abscisse est représentée par les concentrations des composés testés et l'ordonnée par l'activité antiradicalaire en pourcentage d'inhibition.

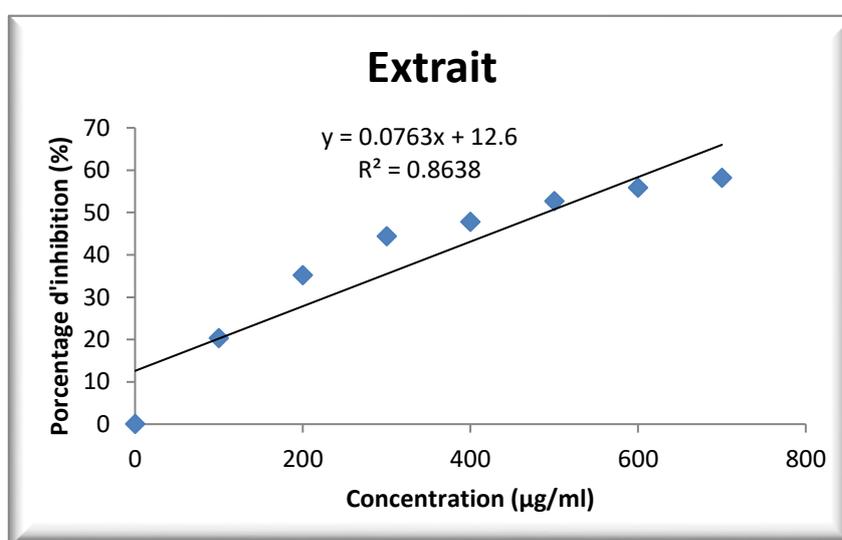


Figure 27 : Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique brut des feuilles de *Cytisus triflorus* (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

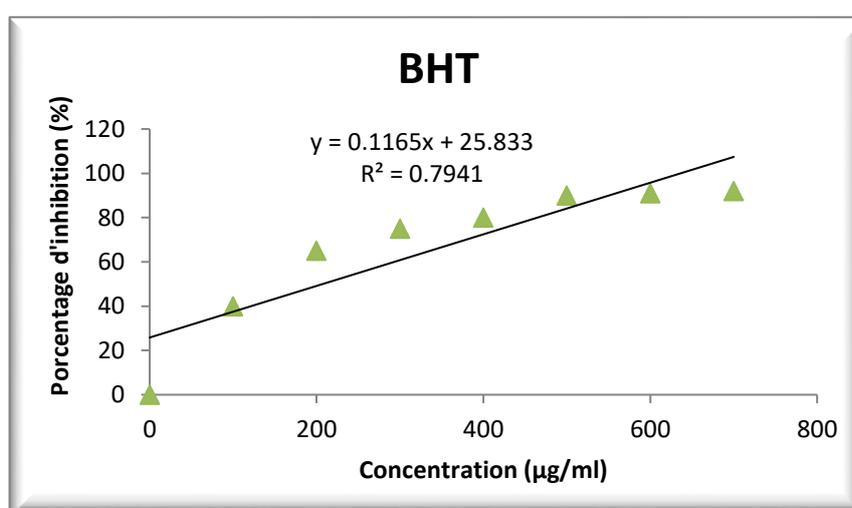


Figure 28: Activité antiradicalaire du standard BHT (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm S)

D'après les résultats obtenus, l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait dans le milieu réactionnel dont le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement presque total du radical DPPH présent dans le milieu. En effet, notre extrait a une bonne activité antiradicalaire dont il montre un effet d'inhibition maximal de presque 60% à la concentration 700 µg/ml, cependant, le BHT utilisé comme antioxydant standard a montré un effet maximal de 95% envers le radical DPPH à la même concentration.

La valeur IC₅₀ a été déterminée pour chaque échantillon, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et DPPH. Le **tableau 9** donne les valeurs d'IC₅₀ de l'extrait testé et de l'antioxydant standard.

Tableau 9: IC₅₀ de l'extrait phénolique brut et du BHT.

	IC ₅₀ en µg/ml
Extrait phénolique	3.96± 0.06
Antioxydant standard	1.93±0,2
BHT	

La valeur d'IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition) d'un composé, en effet, Plus elle est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable. Le BHT, pris comme antioxydant de référence a manifesté in vitro une capacité très puissante sur le radical libre DPPH, justifiée par la valeur IC₅₀ la plus basse obtenue expérimentalement (1.93±0,2 µg/ml) par rapport à celle de notre extrait qui est de 3.96± 0.06 µg/ml. Ce standard demeure le piègeur le plus efficace, dirigé contre les radicaux libres.

3.2. pouvoir réducteur du fer

Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants. Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 37**.

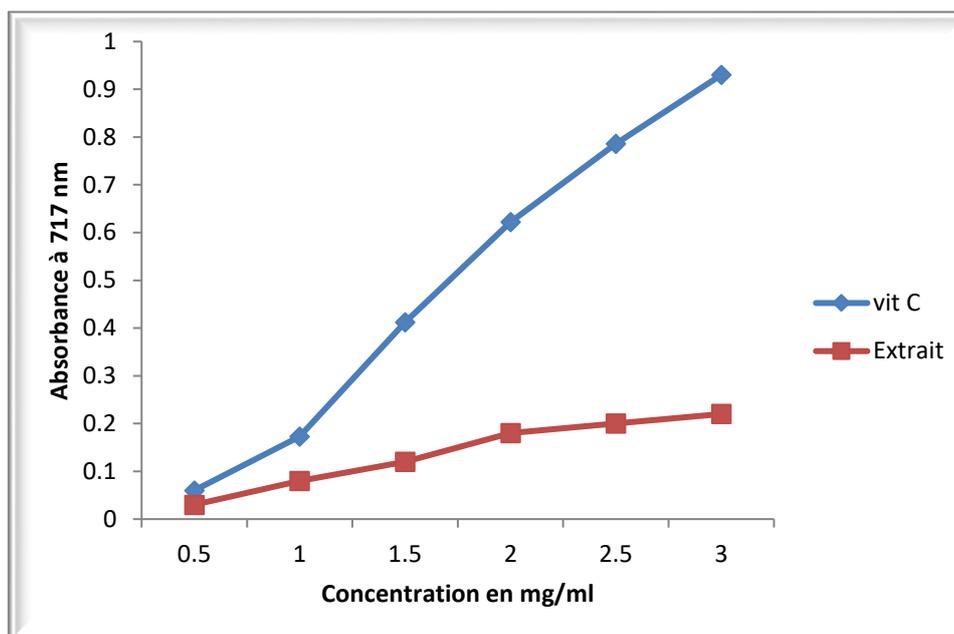


Figure 29 : Pouvoir réducteur de l'extrait brut de *Cytisus triflorus* et de l'acide ascorbique (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons. L'absorbance du pouvoir réducteur de l'extrait brut testé dans notre travail s'est élevée à $0,22 \pm 0,74$ à la concentration 3 mg/ml néanmoins, faible par rapport à l'acide ascorbique qui s'est élevé à $0,93 \pm 0,502$ à la même concentration de 3mg/ml.

Beaucoup de publication ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre l'activité antioxydante et la puissance de réduction des composants de quelques plantes, en effet, la capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yildirin *et al.*, 2001 ; Yan *et al.*, 2008).

Le potentiel antioxydant des polyphénols est désormais munis d'un grand intérêt du à son effet chimioprotecteur contre les maladies dégénératives telles que les maladies neurologiques et cardiovasculaires ainsi qu'à son effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des denrées alimentaires (Bubonja-Sonje *et al.*, 2011). Les processus oxydatifs sont multiples et la nature de l'activité antioxydante peut être multiforme et attribuée à différents mécanismes tels que le piégeage des radicaux libres, la chélation des ions métalliques de transition, la prévention de l'initiation d'une chaîne de réactions productrice des ERO et la décomposition des peroxydes (Ozen, 2009). Ainsi, la combinaison de

plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Ksouri *et al.*, 2009).

La propriété considérable de notre extrait de *Cytisus triflorus* à piéger des radicaux libres montrée par nos résultats, pourrait être attribuée à sa teneur phénolique élevée précédemment identifiée dans le chapitre II. Ces composés sont connus comme substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Kelly *et al.*, 2002). Par ailleurs, de nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité antioxydante dont les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic *et al.*, 2003).

Ksouri et ses collaborateurs (2009) ont prouvé également qu'il y a une forte corrélation entre le contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques des fleurs et des feuilles de *Tamarix gallica* et leurs activités antioxydantes. Ces auteurs réfèrent l'activité antioxydante des extraits de cette plante à la présence d'un nombre de molécules identifiées à savoir des acides phénoliques et des flavonoïdes. Cependant, ils ont trouvé que cette corrélation ne s'applique pas à la teneur en tannins.

En plus, d'autres études ont montré que la capacité antioxydante de nombreux fruits et légumes était directement associée au contenu phénolique, avec un coefficient de corrélation élevé (Gião *et al.*, 2007 ; Conforti *et al.*, 2008). En outre, il a été rapporté que les composés phénoliques de haut poids moléculaire ont plus de capacités à éteindre les radicaux libres et leur efficacité dépend de: poids moléculaire, le nombre de cycles aromatiques et la nature de la substitution du groupe hydroxyle par rapport au poids spécifique des groupes fonctionnels (Hagerman *et al.*, 1998).

Une étude menée par Ait-kaci Aourahoum *et al.* (2015) sur la même espèce de plante de notre étude a montré des IC₅₀ de 19,17 µg/ml et 77,81 µg/ml des feuilles et des fleurs respectivement, ces valeurs sont nettement supérieures à celle trouvée avec notre extrait. Comme pour d'autres espèces de *Cytisus*, les valeurs de IC₅₀ de différents extraits hydro-alcooliques de la partie aérienne de *C. monspessulanus* et les fleurs de *C. multiflorus* étaient respectivement de 14 µg / ml et 13,4 ± 0,5 µg / ml (Boulanouar *et al.*, 2013 ;

Pereira et al., 2013), de même, l'extrait hydro-éthanolique, les extraits éthanoliques et aqueux d'une partie aérienne de *C. scoparius* présentaient des valeurs de IC₅₀ de 1320 µg / ml , 65 µg / ml et 120 µg / ml respectivement(**Luis et al., 2009 ; González et al., 2013**). Cette différence dans les valeurs des IC₅₀ peut être expliquée par la différence des espèces et du matériel végétal testés ainsi que par les conditions d'extraction, qui affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes et par conséquent affecte l'activité antioxydante médiées par ces métabolites dont elle peut être due à l'un des constituants majoritaires ou à d'autres constituants minoritaires ou également à une synergie entre eux (**Gião et al., 2007 ; Wang et al., 2012**).

4. Conclusion

Les valeurs des IC₅₀ obtenus dans cette partie de notre travail montrent que l'extrait méthanolique de *Cytisus triflorus* possède une capacité réductrice considérable bien qu'elle est inférieure à celle du BHT et de la vitamine C. Cela démontre leur propriété de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux libres. Les flavonoïdes sont des principaux donneurs d'électrons (**Le et al., 2007**).

1. Introduction

La peau, appelée tégument (du latin tegumentum = couverture) est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme, pesant 4 Kg et représentant une surface de 2 m². Son épaisseur varie de 1 à 5 mm selon les endroits du corps. Beaucoup plus qu'une simple enveloppe recouvrant notre corps, la peau est en effet le siège de nombreuses fonctions : sensorielle, métabolique, protection, d'échanges, de thermorégulation et d'auto-réparation ou cicatrisation. Elle est constituée de trois couches superposées. L'épiderme (la couche la plus externe), Le derme et L'hypoderme (les couches les plus profondes) ainsi que les annexes cutanées représentées par les glandes et les phanères dont il existe deux sortes de glandes : sudoripares excréant la sueur et sébacées excréant le sébum, alors que les phanères sont les poils et les ongles (**Marieb, 2008**).

Une brûlure est une détérioration des tissus de la peau associée à une destruction des cellules ; elle est occasionnée par une chaleur intense, un courant électrique, les rayonnements ionisants (coups de soleil) ou certaines substances chimiques (comme les acides) (**Marieb, 2008**). Les brûlures sont classées selon leur profondeur en :

- **Brûlures du premier degré** : Seul l'épiderme est touché. Des rougeurs et un œdème apparaissent.
- **Brûlures du deuxième degré** : Endommagent l'épiderme et la couche superficielle du derme. La peau est rouge et sensible, et des cloques apparaissent.
- **Brûlures du troisième degré** : Touchent toute l'épaisseur de la peau. Elles sont aussi nommées brûlures profondes. La région brûlée prend une coloration blême (grisâtre) ou noire. Les terminaisons nerveuses ayant été détruites (**Marieb, 2008**). La **figure 30** illustre les différentes classes des brûlures.

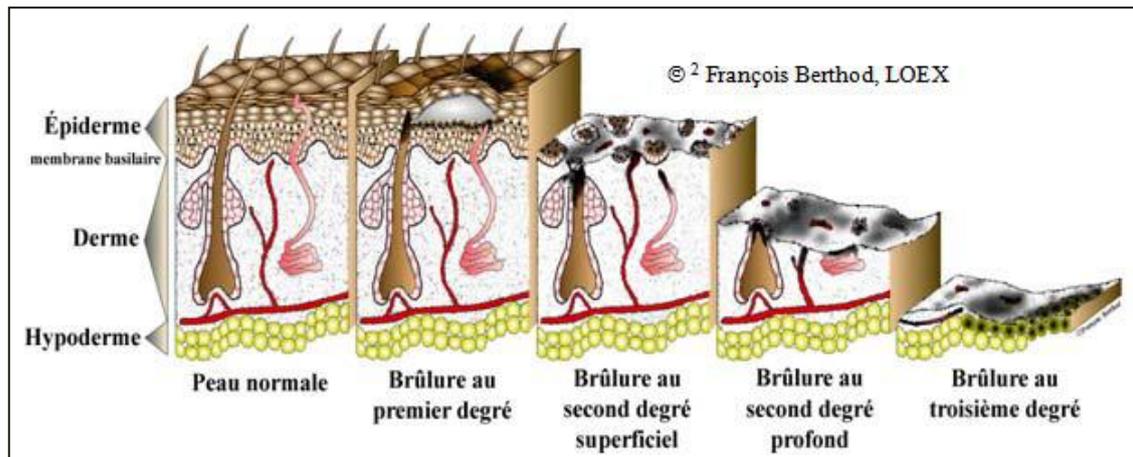


Figure 30: Classification des brûlures cutanées selon la profondeur (Marieb, 1993).

La cicatrisation cutanée est un phénomène biologique très complexe, dynamique, qui se met en place après une blessure de manière à rétablir le plus rapidement possible l'intégrité et l'homéostasie de la peau. La fermeture correcte d'une lésion est possible grâce à la coopération entre de nombreux médiateurs solubles (facteurs de croissance et cytokines), la mise en jeu de différents types cellulaires (cellules inflammatoires, endothéliales, sanguines, épithéliales et immunitaires) et les interactions avec la matrice extracellulaire (Martin, 1997 ; Singer et Clark, 1999). Le processus de la cicatrisation cutanée se déroule en trois phases (figure 31) :

- **Phase inflammatoire :** L'inflammation est une réaction vasculaire et cellulaire qui permet d'éliminer les substances étrangères qui pourraient infecter la plaie.
- **Phase proliférante (prolifération, granulation et contraction) :** La phase de granulation débute à peu près quatre jours après la blessure initiale et dure normalement jusqu'au jour 21 pour les plaies aiguës et selon la taille de la plaie. En pratique clinique on la distingue par un tissu rouge et rugueux dans le lit de la plaie. Ceci implique le remplacement des tissus dermiques et parfois des tissus sous-cutanés dans les plaies plus profondes en plus d'une contraction de la plaie.
- **Phase de remodelage :** Le remodelage des tissus cicatriciels peut durer jusqu'à un an et parfois plus. Au début de cette phase, l'épiderme a retrouvé son épaisseur normale et la croûte formée à partir du caillot sanguin tombe. Les fibres de collagène commencent à être mieux organisées ; initialement fines et désordonnées, elles

deviennent plus épaisses et alignées avec les autres fibres des marges de la plaie (Smith *et al.*, 1998 ; Hunt *et al.* 2000).

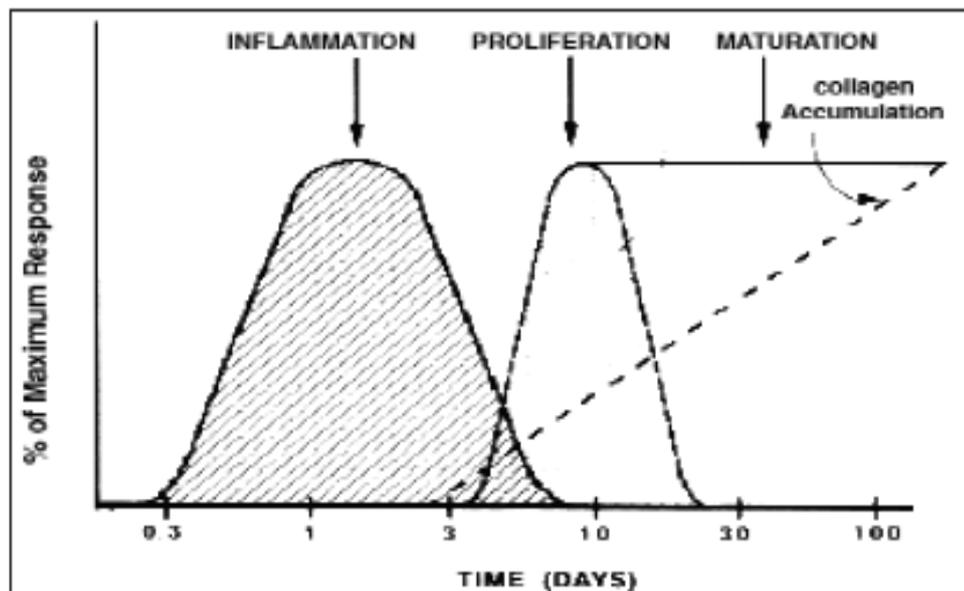


Figure 31: Chronologie des phases de la cicatrisation (Fournier et Mordon, 2005).

L'utilisation empirique des plantes médicinales dans le traitement des plaies et brûlures qui constituent une menace grave pour l'organisme car elles perturbent les fonctions protectrices de la peau, est bien reconnue dans la plupart des pays africains car les plantes avec leur nombre illimité constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et activités biologiques notamment leur pouvoir cicatrisant des brûlures (Djerrou, 2011).

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales algériennes nous nous sommes intéressés à cette partie de notre travail qui consiste à mettre en évidence l'éventuel effet cicatrisant d'une plante médicinale très utilisée par la population de la commune de collo wilaya de skikda dans le traitement des brûlures. Afin d'apporter une justification scientifique quant à l'utilisation traditionnelle de celle-ci, nous avons testé l'activité cicatrisante des polyphénols extraits de cette plante sur des brûlures thermiques provoquées sur la peau de lapins Néo-zélandais.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Animaux

Notre travail a porté sur huit (08) lapins de race Néo-Zélandaise (**figure 34**), mâles en bonne santé, pesant $1,62 \text{ Kg} \pm 0,21$ au début de l'expérimentation et issus d'une ferme privée située à el harrouch wilaya de skikda. Les animaux ont été gardés dans des cages individuelles et acclimatés pendant trois semaines avant l'essai, ils ont été maintenus dans des conditions normales d'humidité, de température et d'éclairage avec accès libre à l'eau et à la nourriture (*ad libitum*).

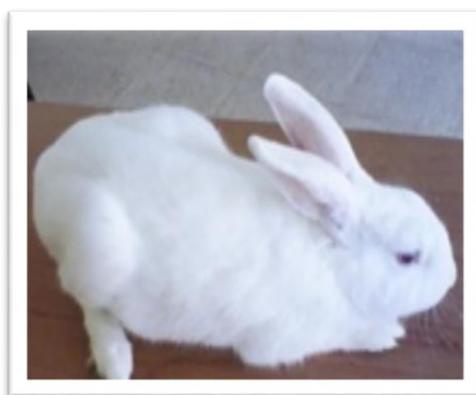


Figure 32 : Lapin Néo-Zélandais (originale).

2.1.2. Produits à tester

- ✓ Pommade à base de l'extrait polyphénolique de la plante médicinale *Cytisus triflorus* (voir chapitre II) qui a été préparée de la manière suivante: Nous avons trituré avec un pilon, dans un mortier en porcelaine, l'extrait poly phénolique et la vaseline. Cette dernière a été ajoutée en petite quantité jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Une spatule a été utilisée afin de détacher la pommade du pilon et de la mettre dans une boîte de pétri en verre. La **figure 35** montre la préparation dermique utilisée dans notre travail.



Figure 33: Préparation dermique à base des polyphénols de la plante *Cytisus triflorus*.
(originale)

- ✓ Vaseline pure (100%) a été achetée d'une pharmacie privée, elle a été utilisée comme un excipient dans la préparation d'une pommade dermique à base de notre extrait poly phénolique brut.
- ✓ Pommade commercial MEBO très utilisé dans le traitement des brûlures et des plaies, a été acheté d'une pharmacie privée pour servir de référence.

Chaque 100g de MEBO contient : Substance active : β - sitostérol o, 25 g

Excipient : huile de sésame, cire d'abeille



Figure 34 : Pommade commercial MEBO (originale).

2.2. Protocole expérimentale

Notre étude a été réalisée au niveau de l'animalerie du département des sciences de la nature et de la vie de l'université 20 Août Skikda.

L'expérimentation a été réalisée conformément à la technique décrite par **Hamdi-Pacha et al. (2002)**.

2.2.1. Préparation des animaux

Les lapins ont été marqués à la tête dans le but de les identifier. Le dos de chaque lapin a été rasé avec une crème dépilatoire cinq jours avant l'application des brûlures. La **figure 35** montre un lapin avec un dos rasé.



Figure 35 : Dos du lapin N° 2 après application de la crème dépilatoire (originale).

2.2.2. Application des brûlures

Chaque lapin a reçu sur son dos quatre brûlures circulaires distribuées de part et d'autre de la colonne dorsolombaire, 2 dorsales (gauche et droite) et 2 lombaires (gauche et droite). Après d'être localisées et anesthésies localement (Unicaine 2 %), les 4 zones ont été brûlées à l'aide d'une masselotte de 200 g ayant 22 mm de diamètre préalablement immergé dans l'eau bouillante pendant 3 minutes (100°C) et immédiatement séché et déposé sur la peau du lapin pendant 15 secondes sans exercer aucune force.

La figure ci-dessous représente les étapes d'application des brûlures :

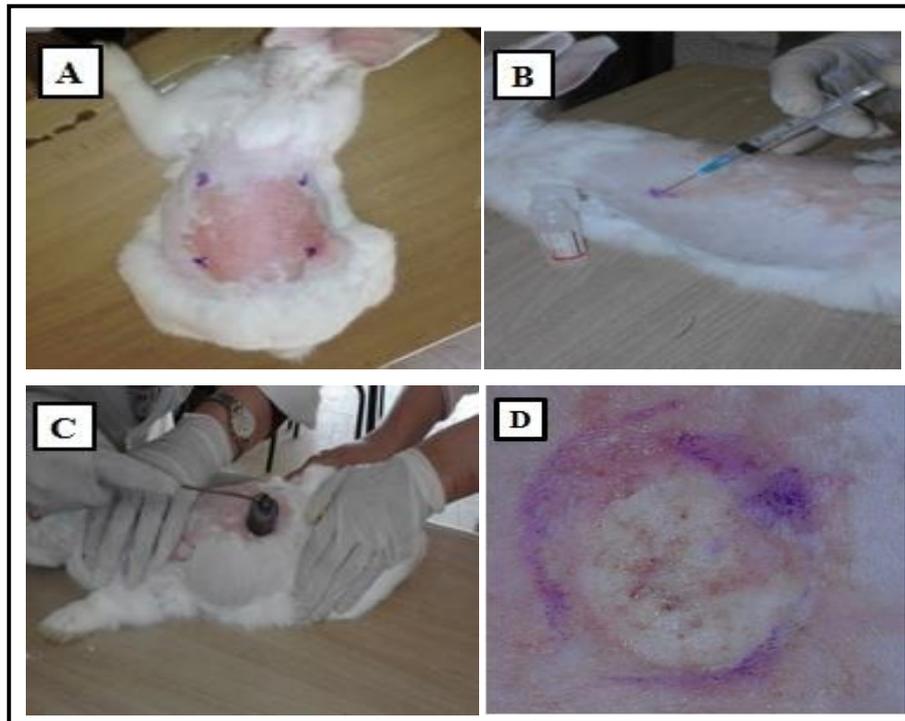


Figure 36 : les différentes étapes d'application des brûlures (originale)

- A.** Localisation des brûlures sur le dos de chaque Lapin, **B.** Anesthésie locale des zones à brûler avec l'UNICAINE à 2%, **C.** Masselotte chaude appliquée, **D.** Brûlure circulaire sur le dos du lapin.

2.2.3. Traitement des brûlures

Sachant que chaque animal a servi comme son propre témoin. Les produits à tester ont été appliqués par voie topique à une dose d'environ 0,5g/379,94mm² (Surface initiale de chaque plaie) le même jour de la réalisation des brûlures. La **figure 39** montre le traitement des brûlures.

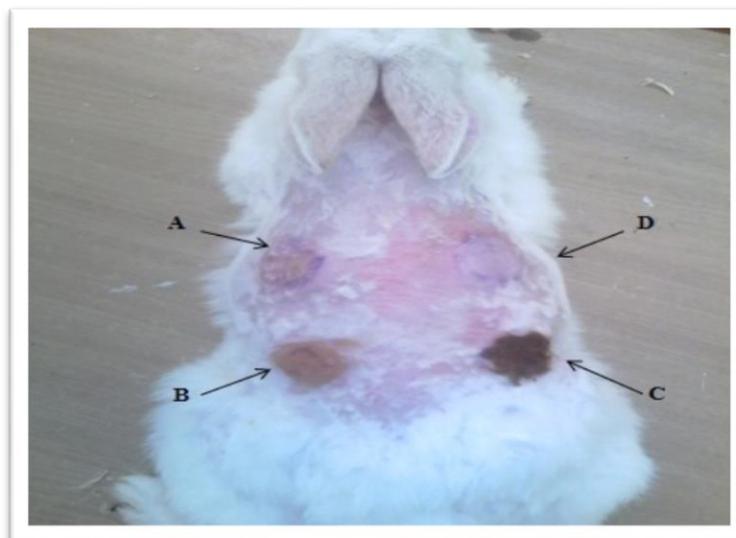


Figure 37: Traitement des brûlures (originale)

A : Vaseline (témoin positif), **B :** Pommade MEBO (référence),
C : pommade à base de l'extrait polyphénolique, **D :** Aucun traitement (témoin négatif).

Le traitement des brûlures a été rotatif, de façon à ce que chaque produit a été appliqué dans la région dorsale et lombaire chez tous les lapins.

2.2.4. Evaluation du processus cicatriciel

Notre étude a été basée sur deux critères d'évaluation qui sont :

- ❖ durée de cicatrisation
- ❖ évolution de la surface des plaies qui permet de comparer les différentes cicatrisations et leurs évolutions sur la base de la modification de la taille de la cicatrice, de ce fait, nous avons procédé à la mesure du pourcentage de la contraction des plaies chaque 2 jour dont les marges des plaies ont été tracées sur un papier transparent comme il est montré dans la **figure 38** a fin de déterminer la surface de chaque brûlure à l'aide d'un papier millimétré, puis le pourcentage de la contraction de chaque plaie a été calculé selon l'équation suivante :

$$Pr. J_n = \frac{M. J_1 - M. J_n}{M. J_1} \times 100$$

D'où * M.J₁ : mesure au 1^{er} jour

* M.J_n : mesure au n^{ème} jour



Figure 38 : Marge d'une plaie tracée sur papier transparent (originale).

2.2.5. Observation clinique et prise du poids corporel

Les modifications cliniques chez les lapins sont notées régulièrement. L'observation a porté sur l'état général, la mortalité ainsi que tout autre changement à savoir appétit, comportement, signe de douleur et état des fèces (solide, liquide, présence du sang ...). Les lapins ont été pesés à l'aide d'une balance ordinaire une fois par semaine pendant toute la période de l'expérimentation.

2.2.6. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont analysés statistiquement à l'aide du logiciel Minitab16, les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Le seuil de signification a été fixé à $p < 0,05$.

3. Résultats et discussion

Les lapins ont survécu pendant toute la période expérimentale. Tous les animaux ont été en bonne santé et disponibles pour l'évaluation. Le processus de guérison s'est passé par plusieurs phases ; une disparition progressive de l'inflammation (plaies devenaient moins rouges), une phase de contraction (les plaies devenaient dures et se couvraient de croûtes un peu noirâtres); Le traitement a permis d'obtenir une guérison complète des plaies.

3.1. Pourcentage de contraction des plaies

Au jour zéro, toutes les brûlures avaient le même diamètre ainsi que les mêmes signes d'inflammation. L'observation de l'évolution des brûlures traitées avec les différents produits a montré une diminution de leurs surfaces au fil du temps, cette réduction est en chronologie variable en fonction de chaque type de traitement. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 10** et la **figure 41**, en pourcentage de contraction de la plaie calculée chaque 2 jours.

Tableau 10: Pourcentages de contraction des plaies à différents intervalles dans les brûlures traitées et les brûlures non traitées.

Contraction de la plaie (%) Moyenne ± SD									
(n=8)	J2	J4	J6	J8	J10	J12	J14	J16	J18
VAS	22,488±	30,384±	33,345 ±	40, 385±	45, 32±	51,571±	55,19±	61,573±	83,331±
	13,699	10,847	15,735	8,963	9,394	10,985	13,961	17,720	10,408
T	3 ,866 ±	5,972 ±	8, 67 ±	16,632 ±	22,093 ±	50,519±	54,401 ±	59,994±	70,522 ±
	5,377	8,180	12,193	14,773	5,598	4,397	8,057	13,736	16,093
MEB	11,631±	16,368±	18,606±	24,922±	34,398±	57, 296±	68,942±	80,063±	86,84±
	7,5	5,5	11,295	12,580	11,676	9,323	5,715	13,647	15,620
POLY	12,289±	21, 567±	23 ,87 ±	44,465±	55,519±	64,994±	81, 576±	90, 985±	93,771±
	12,764	8,042	12,038	8,485	11,776	11,165	5,099	16,213	9,866

VAS = Vaseline, **T** = Témoin, **MEB** = MEBO, **POLY** = Polyphénols

Tableau 11 : Données statistiques

	J2	J4	J6	J8	J10	J12	J14	J16	J18
POLY Vs T	S	THS	HS	THS	THS	HS	THS	THS	HS
POLY Vs MEB	NS	S	NS	THS	THS	S	THS	S	NS
POLY Vs VAS	HS	HS	S	NS	HS	HS	HS	THS	S

Vs : Versus, S : Significatif (p<0,05), NS : Non Significatif (p>0,05), HS : Hautement Significatif, THS : Très Hautement Significatif

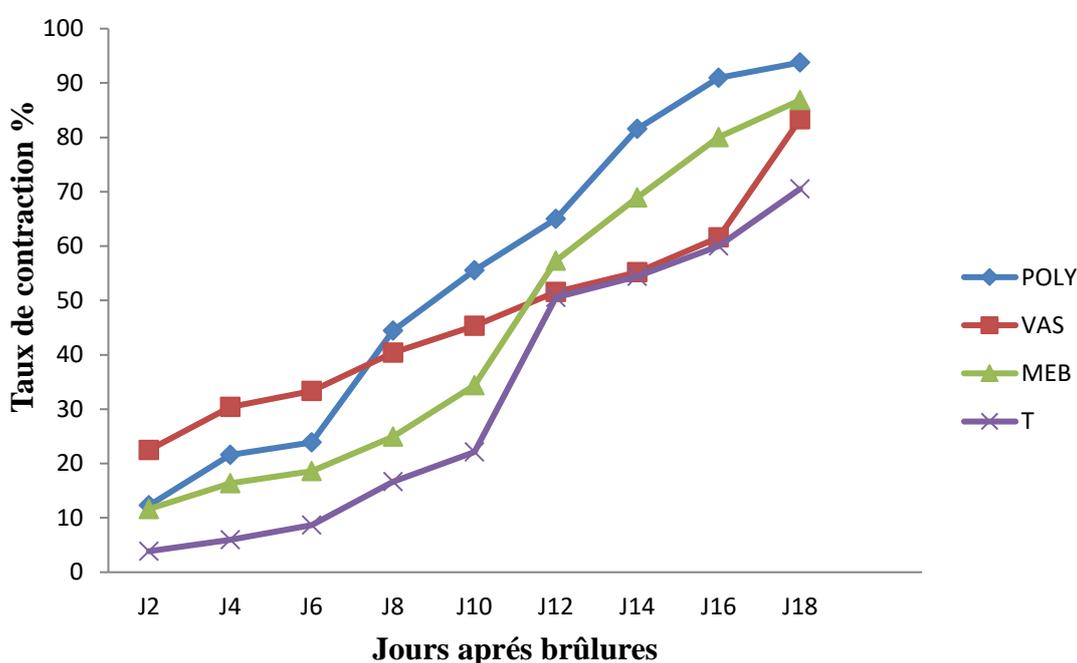


Figure 39 : Pourcentages de contraction des plaies à différents intervalles dans les brûlures traitées et les brûlures non traitées.

- POLY : brûlures traitées avec les poly phénols, VAS : brûlures traitées avec la vaseline pure, MEB : brûlures traitées avec la pommade MEBO et CRL : brûlures non traitées (control).

Aucour de la phase inflammatoire du 2^{ème} jour au 6^{ème} jour, le pourcentage de contraction dans les plaies traitées par la vaseline est meilleur (avec un effet significatif) que celles enregistrées lors du traitement par l'extrait polyphénolique et le médicament commercial MEBO, le plus petit taux de contraction est noté dans les plaies non traitées. Pu et al (1999), mentionnent qu'en période précoce du processus de cicatrisation, la

vaseline est capable d'inhiber l'évaporation d'eau de la plaie, ainsi, il est connu qu'un environnement physiologique humide doit être formé dans la plaie pour la réparation de la peau et la régénération des tissus endommagés. Cependant, une thérapie prolongée peut entraîner l'altération et la macération de tissus (**Xu et Xiao, 2003**). Contrairement aux résultats obtenue par **Djerrou et al (2010)** et de **Maameri (2012)** qui mentionnent que l'huile de lentisque améliore l'effet cicatrisant dès le 4^{ème} jour, les plaies traitées par notre extrait polyphénolique montrent les plus grand pourcentages de contraction à la fin de la phase inflammatoire, du point de vue planimétrique, cet extrait favorise la phase inflammatoire progressivement, ce qui est primordial au bon déroulement du processus cicatriciel. Du 12^{ème} jour au 18^{ème} jour le résultat montre que les deux produits MEBO et l'extrait polyphénolique stimulent la contraction de la plaie de façon significative ($p < 0,05$) comparativement à la vaseline et les plaies non traitées. Toutefois, le second semble être plus efficace que le premier.

3.2. Période d'épithélialisation

Tableau 12 : Durée de la cicatrisation complète des plaies (Jours).

	POLY	T	MEB	VAS
Période d'épithélialisation (J) Moy ±SD	19,333 ± 1,153	24,667± 1,155	20 ± 2	24± 2

Poly Vs MEB: NS ($P > 0,05$), Poly Vs VAS: S ($P < 0,05$), Poly Vs T: HS ($P < 0,01$)

La période d'épithélialisation a été significativement plus courte dans les brûlures traitées par l'extrait polyphénolique comparativement à la vaseline et aux plaies non traitées. De même, les plaies traitées avec le médicament commercial MEBO guérissent avant les plaies traitées avec de la vaseline. Enfin le temps de cicatrisation le plus long à été obtenu dans les brûlures non traitées.

Les photos ci-dessous montrent le rétrécissement des différentes plaies en fonction de la durée de traitement.

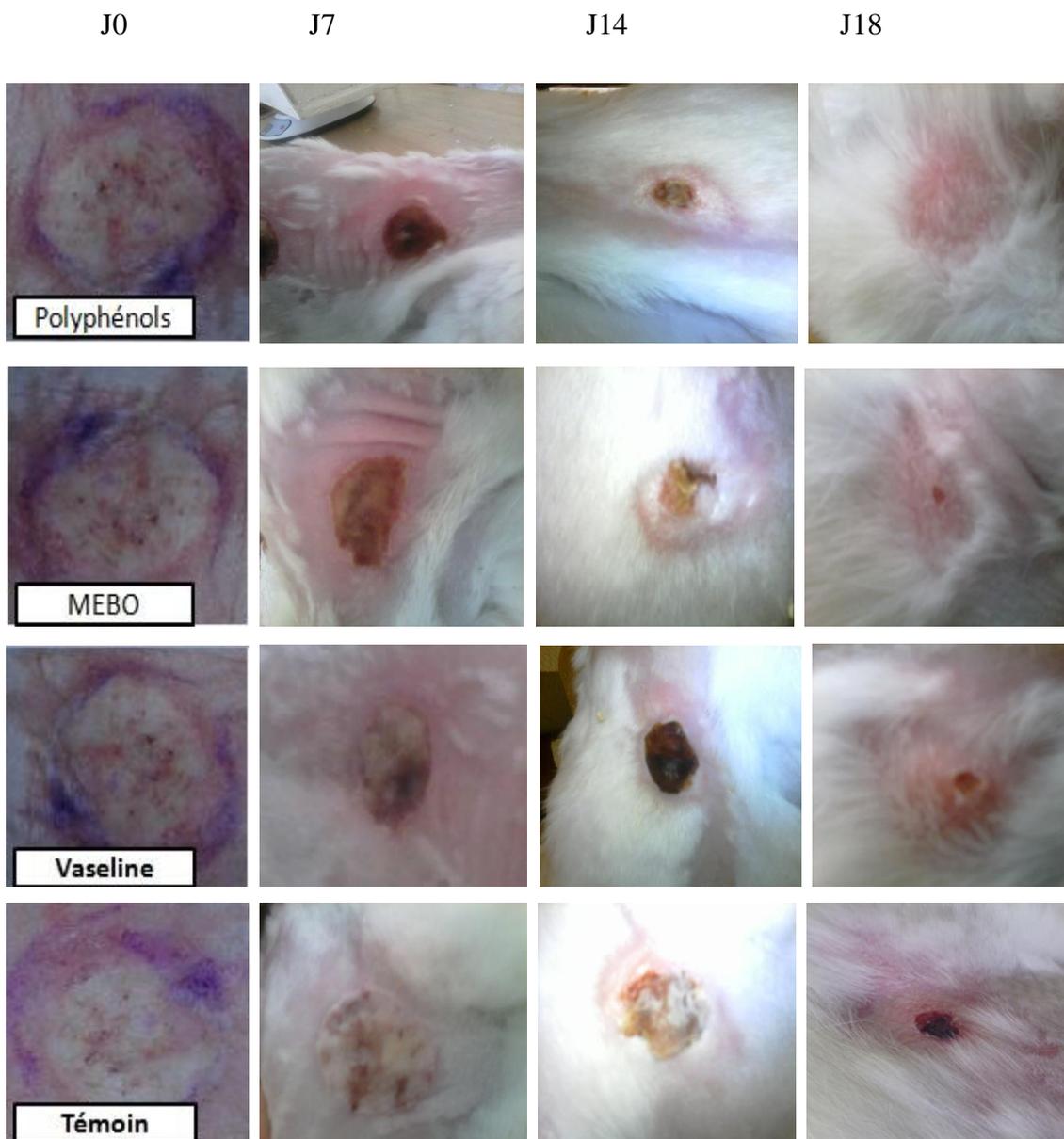


Figure 40 : Chronologie de la cicatrisation des plaies des brûlures (originale).

3.3. Evolution du poids corporel

L'application quotidienne des différents produits testés n'a pas perturbé l'état général des lapins, aucune mortalité ou signe clinique n'est relevé. L'évolution corporelle des lapins n'a pas montré de différence significative.

Tableau 13: Poids moyen (Kg) des lapins brûlés à différents intervalles.

Jours	J0	J7	J14	J22
Poids corporel des lapins (moyenne ±écart type)	1,62 ± 0,21	1,46 ± 0,20	1,61 ± 0,23	1,68 ± 0,20

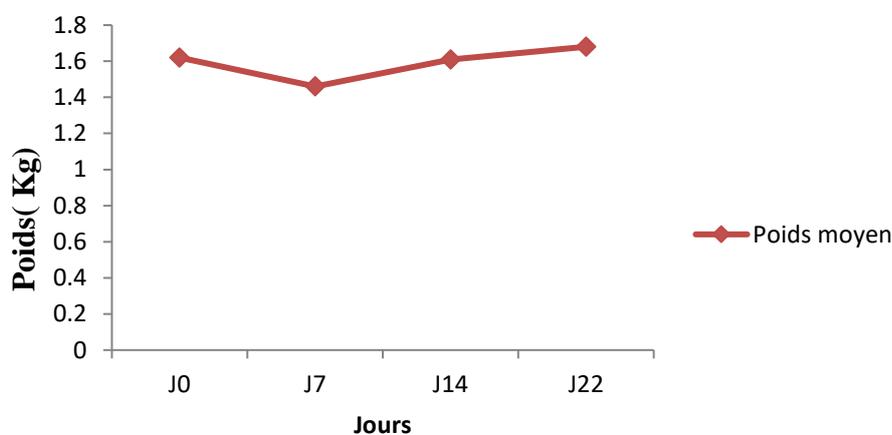


Figure 41 : Poids moyen (Kg) des lapins brûlés à différents intervalles.

Un léger ralentissement de la croissance pondérale des animaux de l'étude est observé à la première semaine, puis une reprise de la croissance pondérale jusqu'à la fin de l'expérience. Ces résultats montrent clairement que la diminution du poids corporel indépendamment de la nature du traitement est probablement liée à l'effet direct du traumatisme lésionnaire et d'autres facteurs physiopathologiques du processus de cicatrisation (Belfadel, 2009).

L'évaluation du processus de cicatrisation a adopté des paramètres morphologiques, y compris le pourcentage de contraction de la plaie et la période d'épithélialisation. Dans les conditions naturelles, la contraction est la principale voie de cicatrisation. C'est un phénomène naturel qui facilite grandement le traitement des plaies cutanées étendues, elle se poursuit jusqu'à ne laisser qu'une cicatrice réduite. Elle constitue donc un critère d'appréciation macroscopique de l'évolution de la plaie d'une part et est la conséquence des phénomènes microscopiques qui la sous-tendent d'autre part.

Notre travail est une investigation à l'étude de la propriété cicatrisante d'une pommade à base d'extrait polyphénolique obtenue des feuilles de *Cytisus triflorus* par rapport à un cicatrisant commercial de référence (MEBO). Le modèle expérimental a été du lapin Néo-zélandais avec une surface du dos suffisante permettant la réalisation de quatre brûlures cutanées identiques. L'extrait a été préparé sous forme de pommade semi solide, cette forme est le plus souvent destinée à être appliquée sur la peau dans le but de libérer localement (de façon transdermique) les principes actifs. Son application sur une plaie est plus facile que celle d'extrait sec et elle permet une estimation correcte de la quantité du produit utilisée dans le traitement.

Le produit testé est un extrait brut constitué d'un mélange des composants appartenant à des différentes classes chimique comprend notamment les flavonoïdes et les tanins qui sont des composés ayant une forte activité anti- inflammatoire et antioxydante (**Rice-Evans, 1995**). En effet, de nombreux travaux ont prouvé que les plantes utilisées traditionnellement comme cicatrisantes possèdent des propriétés d'activation du système immunitaire, cette activation serait le mécanisme de guérison des plaies (**Yamada et Kiyohara, 1999 ; Nergård et al., 2005**). Ainsi que les différents antioxydants sont capables de réduire les radicaux libres, en empêchant la dépréciation au niveau cellulaire. Ils inhibent l'inflammation, qui conduit à l'appauvrissement de collagène, et ils offrent une protection contre les dommages photoniques et le cancer de la peau (**Djerrou et al., 2010**), par ailleurs, Les rapports des études précédentes ont montré aussi que la neutralisation des radicaux libres par les antioxydants et les piègeurs de radicaux soulage l'inflammation. Les flavonoïdes et les tanins sont bien connus pour présenter l'action anti-inflammatoire par inhibition de la synthèse des prostaglandines. Les flavonoïdes peuvent interagir directement avec le système de prostaglandine et d'inhiber la lipoxygénation ainsi que des

enzymes impliquées dans l'inactivation ou biotransformation des Prostaglandines (**Ait-kaci et al., 2016**).

D'autre part, **Ait-kaci et al (2016)** ont montré que les feuilles de la plante *Cytisus triflorus* sont riches en acide gras insaturés (72,51%) dont l'acide alpha linoléique et l'acide linoléique constituent les composants dominants de cette fraction avec un pourcentage de 13,73% et 48,24% respectivement et des acide gras saturés (27,43%) notamment l'acide palmitique (22,29%). Les acide gras sont capables de réduire la perte d'eau trans-épidermal et d'ainsi augmenter l'hydratation de la peau (**Dweck, 2002**). L'acide alpha linoléique et l'acide linoléique sont connus par leur effet anti-inflammatoire et leur capacité de fournir des lipides nécessaires pour la réparation et la respiration des cellules (**Loden et Andersson, 1996**).

Enfin, peut-être les différentes propriétés des composants précédemment cités de l'extrait polyphénolique des feuilles de *Cytisus triflorus* pourraient expliquer son effet cicatrisant prometteur. En effet, tous les résultats obtenus prennent en charge les utilisations traditionnelles de *Cytisus triflorus* comme plante cicatrisante des brelures, en particulier ses feuilles qui sont la partie centrale la plus utilisé.

4. Conclusion

A la lumière des résultats de cette expérimentation, il ressort que l'extrait polyphénolique des feuilles de *Cytisus triflorus* a une activité cicatrisante évidente, ceci par diminution de la phase inflammatoire, par stimulation de la contraction de la plaie et en réduisant la période de cicatrisation avec un effet significative ($p < 0,05$) comparativement à la vaseline et les plaies non traitées.

Conclusion générale

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. La présente étude a porté sur les feuilles de la plante médicinale *Cytisus triflorus* provenant de la région de collo de la wilaya skikda dont elle a fait l'objet d'une étude phytochimique ainsi que de l'évaluation de l'activité antibactérienne, anti-oxydante et cicatrisation des brûlures thermique provoquées sur le dos des lapins Néozélandais .

Qualitativement, les tests préliminaires de la composition chimique montrent que la plante médicinale étudiée dispose d'un réservoir très varié des métabolites secondaires. L'évaluation quantitative du contenu des polyphénols totaux ainsi que des flavonoïdes nous mène à conclure que *Cytisus triflorus* est très riche en composés phénoliques notamment en flavonoïdes.

Par la suite, nous avons testé le pouvoir antibactérien de l'extrait polyphénolique brut de *Cytisus triflorus* vis-à-vis des souches bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistante aux antibiotiques et *Staphylococcus aureus* méthécilino-résistantes dont il a montré une activité inhibitrice de croissance bactérienne modérée qui varie d'une espèce à une autre, cette différence de sensibilité peut être expliquée par le fait que les bactéries à Gram- sont censées être plus résistantes aux polyphénols que les bactéries à Gram+.

Le potentiel antioxydant du même extrait a été déterminé par la méthode de DPPH et la réduction du fer dont les résultats ont montré une bonne activité anti-oxydante. Néanmoins, cette activité reste bien inférieure aux antioxydants standards utilisés.

Le test de cicatrisation des brûlures thermique révèle que les polyphénols de *Cytisus triflorus* sont dotés d'un pouvoir cicatrisant évident, ceci par diminution de la phase inflammatoire ainsi que par stimulation de la contraction de la plaie en réduisant la période de cicatrisation avec un effet significative ($p < 0,05$) comparativement à la vaseline et les plaies non traitées

Afin d'approfondir les aspects entrevue dans ce travail, un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées :

- ❖ L'exploration d'autres facettes des propriétés biologiques de cette plante médicinale pourrait être réalisée.
- ❖ Déterminer les fractions les plus actives et éventuellement de caractériser les molécules responsables de ces activités.
- ❖ Elargir le panel des micro-organismes en testant la sensibilité des autres espèces bactériennes, des champignons et virus.
- ❖ Evaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante *in vivo* sur un modèle biologique.
- ❖ Faire des études immuno-histo-chimiques qui sont nécessaires pour confirmer et élucider le mécanisme derrière l'activité cicatrisante.

Références bibliographiques

A

- Aberkane, M.C. (2006).** Etude phytochimique de la plante *Publicaria laciniata*. Thèse de doctorat. Batna.163p.
- Ait-Kaci Aourahoun, K., Fazouane, F. et Benayache, S. (2015)** .Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent. *Der Pharmacia Lettre*, 7 (5) ,104-110.
- Ait-kaci Aourahouna,K., Fazouane, F., Benayache,S. et Souici,F. (2016).** Fatty acid Profiles of soxhlet and Ultrasonic obtained oils from the promising medicinal legume *Cytisus triflorus* L'Hérit. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* ,5 (4): 05-09
- Ajibesin, K.K., Ekpo, B.A., Bala, D. N., Essien, E. E. et Adesanya, S. A. (2008).** Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* **115**,387–408
- Akowauh, G.A., Zhari, I., Norgyati, I., Sadikun, A. et Khamsah, S.M. (2004).** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, (87), 559-566.
- Albano, S. M. et Miguel, M. G. (2010).** Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 1-6.
- Alemdaroglu, C., Degim, Z., Celebi, N. et al. (2006).** An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor *Burns* .32(10), 19-27.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A. et Bora, U. (2008).** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*, 41: 1–15.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D. et Trinajstic, N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemical Acta*, 76, 55-61.
- Andersen, Y. et M Markham, K. R. (2006).** Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, p. 553-616.
- Anthony, J.P., Fyfe, L. et Smith, H., (2005).** Plant active components - a resource for antiparasitic agents? *TRENDS in Parasitology* Vol. 21, No.10 October
- Antonot, E. et Marchal, R. (1998).** Chromatographie. Stage MAPEN, p 5.

Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 199–212.

Auvray, G. et Malécot, V. (2013). A revision of *Cytisus* sections *alburnoides*, *spartopsis* and *verzinum* (genisteeae, fabaceae). *edinburgh journal of botany* 70, 61-120.

B

Bahorun, T. (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d’approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiass*,p 83-94.

Barboni, T. (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l’amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d’incendie. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l’université de Corse, p26.

Benhammou, N., Atik Bekkara, F. et Kadifkova, P. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*, 29(3), 155-161.

Benjlali, B., Tantaoui-Elarki, A. et Ismaili-Alaoui, M. (1986). Méthode d’étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélose. *Plant MédPhytothér.*20: 155-167.

Benaissa, O. (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d’espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. *Activité Biologique*, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.

Beroual, K. (2014). Impact de *Linum usitatissimum* sur la régénération épithéliale et sur la pousse de poils. Thèse de doctorat : pharmacologie toxicologie. Constantine: université Constantine ,1.121 p.

Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E. et Sapirstein, H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *CrealChem*: 390 - 393.

Bhattacharyya, B. et Johri, B.M. (1998). Flowering plants,taxonomy and phylogeny. Ed Springer-Verlag, Berlin.

Billerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P. et Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d’huiles essentielles. *Hygiènes X-n°3*: 248-251.

- Boizot, N. et Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le cahier des techniques de l'Inra : 79-82.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G. et Monks, T. J. (2000).** Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, 13: 135.
- Bosserdet et Rivolier. (1977).** Secret et vertus des plantes médicinales. Paris 463p. of the Missouri Botanical Garden, 479-535 p.
- Botineau M. (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Edi Tec et Doc, France. p : 1222-1224.
- Boubekri, C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Université Mohamed Khider – Biskra.
- Boulanouar, B., Abdelaziz, S Aazza, C., Gago, M. et Graça, M. (2013).** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind. Crops Prod*, 46, 85-96.
- Boulebdia, N., Belkheri, A., Belfadel, F.Z., Benseguni, A. et Bahri, L. (2009).** Dermal wound healing effect of *Pistacialentiscus* fruit's fatty oil, *Pharmacognosy Research* 1(2), 66-71.
- Bouzid, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M. C. et Ayachi, A. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *L'Aubepine Monogyne*. *Lebanese Science Journal*, 12 (1), 59-69.
- Bozin, B., Mimica-Dukic N., Simin, N. et Anackov, G. (2006).** Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1822-1828.
- Brand-Williams, M., Cuvelier, M. et Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*. 28: 25-30.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2éd, Paris : médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*. p 1120.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc - Lavoisier, Paris.

Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J. et Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, **127**, 1821-1827.

C

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A. et Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 215-220.

Celiktas, O.Y., Kocabas, EEH., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T. et Baser, KHC. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. **100**: 553-559.

Clark, R. A. F. (1985). Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol*, **13** (5), 701-725.

Clos, J. (2012). L'immunité chez les animaux et les végétaux. Lavoisier, pp : 186.

Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, F. et Loggia, R.L. (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J Ethnopharmacol*, **116**, 144-151.

Cook, N.C. et Samman, S. (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J.Nutr Biochem*, **7**(2): 66-76.

Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 564-582.

Crozier, A., Del, R. D. et Clifford, M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds: *Molecular Aspects of Medicine*, (31), 446-467.

Cushine, T. P. et Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agent*, **26**, 343-356.

D

D'abrosca, D., Pacifico, S., Cefarelli, G., Mastellone, C. et Fiorentino, A. (2007). 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, **104**, 1333-1337.

Dhaouadi, K., Raboudi, F., Estevan, C., Barrajon, E., Vilanova, E., Hamdaoui, M. et Fattouch, S. (2010). Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial

Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 59: 402-406.

- Dally, L. I., Coulibaly, S., Angnimel, L.H. et Bamba, M. (2007).** Formulation, contrôle galénique, toxicologique et essai biogalénique d'une crème à activité cicatrisante à base de feuilles fraîches de *Baphia nitida* (Papilionacées). 8(1), 33-40.
- Das, H. C., Wang, J. H. et Lien, E. (1994).** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoides: a structure system-activity relationship analysis. *Journal of Food Engineering*, 69, 133-136.
- Debray, M., Jacquemin, H. et Razafindrambo, R. (1971).** Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8).
- Delamarck, M. et Decandolle, M. (1992).** Flore Française, ou description Succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France. 3^{éd.} Paris. P. 501-503.
- De Witt, H. (1963).** Les plantes du monde. Ed Hachette, Paris, pp. 308-323.
- Djahra, A.B. (2013).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de doctorat, option biologie végétale. Univ. Badji Mokhtar, Annaba. 54p.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Najemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. et Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* 97: 654-660.
- Djerrou, Z., Maameri, Z., Hamdi-Pacha, Y., M. Serakta, M., Riachi, F., Djaalab, H. et 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
- Djerrou, Z. (2011).** Etude des effets pharmacotoxicologique de plantes médicinales d'Algérie : Activité cicatrisante et innocuité de l'huile végétale de *Pistacia lentiscus* L. Thèse de doctorat : pharmacologie Toxicologie .Constantine : université Mentouri. 156 p.
- Diallo, D., Marston, A., Terreaux, C., Touré, Y., Paulsen, B.S. et Hostettmann, K. (2001).** Screening of Malian medicinal plants for antifungal larvicidal, molluscicidal, antioxidant and Radical Scavenging activities. *Phytotherapy Research* 15, 401- 406.
- Di Carlon, G., Mascolo, N., Izzo, A. A. et Capasso, F. (1999).** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 65(4): 337–353.

Doillon, C. J., Dunn, M. G., Berg, R. A. et Silver, F. H. (1985). *Collagen deposition during wound repair.* Scanning Elect Microsc. (11), 897-903.

Dorman, H.J.D. et Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* 88(3): 308-316.

Dweck, A.C. (2002). Herbal medicine for the skin. Their chemistry and effects on skin and mucous membranes. *Personal Care Magazine* 3(2): 19-21.

E

Essawi, T. et Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 70: 343-349.

F

Fall, A.B.K., Moliva, B. A.J., Thioune, S.y., O.Y. J. et Faye, B.Lo. I. (2013) .Formulation et essais de pommades dermiques cicatrisantes à base d'extrait lyophilisé de racines de *Cassia sieberiana* DC(Cesalpiniaceae). 5(131002), 1-14.

Favier, A. (2006). Oxidative stress in human diseases. *Annales Pharmaceutiques Françaises.*64 (6) : 390-396.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie*, 108-115.

Fawcett Don, W. et Jensch, R. P. (2002). L'essentiel de l'Histologie. ed. Maloine. p.268.

Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J. A. et Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371-380.

Fournier, N. et Mordon, S. (2005). Nonablative remodeling with a 1,540 nm erbium: glass laser, *Dermatologic Surgery* (31), 1227-35.

Formica, J. V. et Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33(12), 1061 - 1080.

Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. et Mantecón, A. (2004). Review: Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (2), 191-202.

G

Garnier, G., Bezanger-Beauquesne, L. et Debraux, G. (1961). *Resources Medicinales de la Flore Française, Tome II.* Ed Vigot Freres, Paris.

- Garcia-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A.J., Pueyo, E., Martín-Alvarez, P.J. et Moreno-Arribas, M.V. (2008).** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. 19: 835–841.
- Gartner, L. P. et Hiatt, J. L. (1992),** *Atlas d'histologie*. 2 ed. Bruxelles: De Boeck-Wesmael, 320 p.
- Gauche, E. et Hausswirth, C. (2006).** Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*, 58 : 43-66.
- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini Ana, E.C.S. et Fonseca Maria, J.V. (2003).** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS Pharm Sci*, 5 (2) : 1-5.
- Gião, M.S., González-Sunjosé, M.L., Rivero-Pérez, M.D., Pereira, C.I., Pintado, M.E. et Malcata, F.X. (2007).** *J. Sci. Food Agric*, 87(14), 2638-47.
- Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz, F.J. (2007).** Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*. 111: 476-482.
- Gmez-Caravaca, A. M., Gmez-Romero, M., ArrÉez-RomÉn, D., Segura-Carretero, A. et FernÉndez-GutiÑrrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 41: 1220-1234
- González, N., Ribeiro, D., Fernandes, E., Nogueira, DR., Conde, E., Moure, A., Vinardell, MP., Mitjans, M.H., Dominguez, J. et Photochem, J. (2013).** *Photobiol. B:Biol*. 125, 83-89.
- Gopal Rao, G. (1999).** Risk Factors for the Spread of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Drugs*.55: 323-330.
- Gravot, A. (2008).** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
- Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J. et Tiemersma, E. (2006).** Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *The Lancet*.368: 874–885.
- Guignard, J.L ., Cosson, L . et Henry, M. (1985).** Abrégé de Phytochimie, Masson, Paris. p 155

Gulcin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A. et Elias, R. (2003). Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Med.* 70: 561-563.

Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas, M. et Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.

Gutteridge, J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun*, 19:141-158.

H

Hagerman, A.E., Riedl, K.H., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T. et Hartz, P.W. (1998). led, *J. Agr. Food Chem*, 46,1887-1892.

Halliwell, B. et Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK.

Hamdi Pacha, Y., Belkhiri, A., Benazzouz, M., Benhamza, L. et Bensegueni, L.(2002). Evaluation de l'activité cicatrisante suite à des brûlures expérimentales de quelques plantes algériennes, *Revue Méd. Pharm. Afri*, (16), p.1-7.

Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, J., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H. et Poutanen, H. (2010). Impact of Dietary Polyphenols On Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci*, (11), 1365-1402.

Harborne, J.B. (1998). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).

Hardman, R. et Sofowora, E.A. (1972). Antimony trichloride as a test reagent for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. *Stain technology* 47, 205-208.

Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, *Review. Phytochemistry* 68 2831–2846

Hayashi, K., Huang, H., Hiraoka, N. et Ikeshiro, Y. (1997). Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication in vitro. *Planta Med.* 63(2), 102-105.

Hébuterne, X., Alix, A., Raynaud- Simon, A. et Vellas, B. (2009). Traité de nutrition de la personne âgée : Nourrir l'homme malade. Springer Science & Business Media. pp: 8.

Heller, W. et Forkmann, G. (1993). The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 399-425.

Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.

Herbert, R.B. (1989). The Biosynthesis of secondary metabolites. 2^{ème} edition. Chapman and Halle p 2, 11-115.

Hunt, T. K., Hopf, H. et Hussain, Z. (2000). Physiology of wound healing. Adv Skin Wound Care. 13 (2), 6-11.

Husain, S. R., Cillard, J. et Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, 26, 2489-2492.

I

Inouye, S., Takazawa, T. et Yamaguchi, H. (2001). Antimicrobial activity of the essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antibacterial Chemotherapy*. 47: 565-573.

Iserin, P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales : Identification, Préparations, soins. 2^{éd} .Londres : *Dorling Kindersiey Limited*, p.9.

J

Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M. et Yusuf, S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern Med*, 123: 860.

Jones, W. P. et Kinghorn, A. D. (2005). Extraction of plant secondary metabolites. *In*: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 323-411.

K

Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 12 (4) ,390-401.

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

Kaufmann, SHE. (1997). Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin, p. 345.

- Kelly, E. Heim., Anthony, R., Tagliaferro., Dennis, J. et Bobilya, G .(2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- Kempf, S. et Zeitouni. (2009).** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie : *article in press*.
- Kerwin, S. M. (2004),** Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. *Current Medicinal Chemistry - Anti-cancer agents*, 4, 263-272.
- Kheyer, N., Meridja, D. et Belhamel, K. (2014).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products*. 2(1): 18-26.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W. et kong, S. S. (2004).** Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanism. *J Pharmacol .Sci*, 96, 229-254.
- Kolesnikov, M.P. et Gins, V.K. (2001).** Phenolic substances in medicinal plants. *Appl. Biochem. Micro*, 37 (4): 392-399.
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. et Vladimir-Knezevic, S. (2004).** Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from *northern Croatia*. *Acta. Pharm.* 54: 65-72.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C. et Abdelly, C. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2083-2091.
- Kuzuhara, H., Nishiyama, S., Minowa, N., Sasaki, K. et Omoto, S. (2000),** Protective effects of soyasapogenol A on liver injury mediated by immune response in a concanavalin A-induced hepatitis model. *Eur J Pharmacol*, 391(1- 2), 175-181.
- L**
- Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleih, B., Loirand, G., Pinet, F. et Samuel, J.L. (2007).** Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext, Paris.pp. 310-325.
- Landis, G.N. et Tower, J. (2005).** Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126: 365–379.
- Le, K., Chiu, F. et Ng, K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353-363.

Lebham, A. (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Lee, J., Koo, N. et Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1), 21-33.

Li H B, Cheng K W, Wong C C, Fan K W, Chen F. et Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771-776.

Loden, M. et Andersson, AC. (1996). Effect of topically applied lipids on surfactant-irritated skin. *British Journal of Dermatology*. 134(2): 215-220(6).

Lopez, V., Akerreta, S., Casanova, E., Garca-Mina, J .M., Cavero, R. Y. et Calvo, M. I. (2008). *Pharmaceutical Biology*, 46, 602-609.

Luis, A., Domingues, F., Gilad, C. et Duarte, A.P. (2009). *J. Med. Plant Res.*, 3(11), 886-893.

M

Maamri, S. (2008). Etude de Pistacia atlantica de deux régions de sud algérien : Dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire en vue de l'obtention de diplôme de Magister en biochimie et microbiologie appliqués, p 26.

Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, p. 4-5.

Mahmoud, N., Pizza, C., Aquino, R., De Tommasi, N., Piacente, S., Colman, S., Burke, A. et Hay A.J. (1993). Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir.Res.* 46(7): 1257-71.

Males, Z. et Medic-Saric, M. (2001). Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of Helleborus atrorubens, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24: 253- 359.

Marco, G.L. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, 45 :594-8.

Marieb, E.N. (1993). Anatomie et physiologie humaines. *Québec : Renouveau Pédagogique Inc*, 192p.

Marie, E. N. (2008). La peau et les membranes de l'organisme . 8éd. paris : renouveau pédagogique Inc, p.115- 119.

Marston, A. et Hotsmann, K. (2006). Separation and Quantification of Flavonoids. In "Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. *Taylor and Francis*:1-36.

Martin, P. (1997). Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science.* (276) ,75-81.

Martin, S. et Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie* ,(51) , 304-315.

Maurice, N. (1997).L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. éd. Paris : Lavoisier, p. 12-14.

Medic-Saric , M., Jasprica, I., Smolic, B., ubalo, A., et Momar, A. (2004). Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids.*CroaticaChemicaActa* .77 (1-2):361-366.

Mensor, L.I., Menezes, F.S., Leitao, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T., Coube, C.S. et Leitao, S.G. (2001). Screening of Brazillian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical me hod.*Phytother. Res*, 15, 127-130.

Moussard, M. (2006). Biochimie structurale et métabolique. De Boeck Supérieur. pp : 336.

Muchuweti, M., Ndhlala. et Kasiamhuru, A. (2006). Analysis of phenolic compounds including tannins, gallotannins and flavanols of Uapaca kirkiana fruit. *Food Chemistry* .94; 415-419.

N

Nergård, C. S. (2005). Immunomodulating pectic polymers, Thesis for the degree of Doctor Scientiarum, Departement of Pharmacognosy, School of Pharmacy, University of Oslo, Norway. Unipub AS, 80p.

Ngameni, B., Kuete, V., Simo, I.K., Mbaveng, A. T., Awoussong, P.K., Patnam, R., Roy, R. et Ngadjui, B.T. (2009). Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *S. Afr. J. Bot.* 75: 256–261.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67(4): 593-656.

Novelli, G. P. (1997). Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.*; 48: 517-527.

O

Ong, K.C. et Khoo, H.E. (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life. Sci.* 67: 1695-1705.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.* 44: 307-315.

Ozen, T. (2009). Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (Watercress) leaf extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 66 (2), 187-193.

P

Paris, R. et Moyse, H. (1969). Précis de matière médicale. Paris: Masson.

Pereira, O.R., Macias, R.I.R., Perez, M.J., Marin, J.J.C. et Cardoso, S.M. (2013). *J. Funct. Foods.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.03.014>

Perez, M.B., Banek, S.A. et Croci, C.A. (2011). Retention of antioxidant activity in gamma irradiated argentinian. *Food Chemistry* 126: 121-126.

Plan directeur d'aménagement urbain ; PDAU. (2015). APC Collo Willaya de Skikda.

Pincemail, J. et Defraigne, J.D. (2004). Les antioxydants un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire, Pro biox SA. Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.

Prakash, D., Upadhyay, G., Brahma, N. et Singh, H.B. (2007). Singh antioxidant and freeradicalscavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycinemax*). *Food Chemistry.* (104) : 783-790.

Pu, Z.B., Wang, C.C., Liu, H.B., Zhou, L.G., Chao, C.R., Sang, Z.X., Dong, F. et Ge, J.I. (1999), Experimental study on the effect of Moist Exposed Burn Therapy/Moist. Exposed Burn Ointment on burn wound water evaporation. *The Chinese Journal of Burns Wounds and Surface Ulcers.* 11(1),1-3.

Q

Queiroz, M. K.S., Costa, G.E.A., DaSilva, N., Reis, S.M.P.M. et De Oliveira, A.C. (2005). Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*, (21), 602-609.

Quzel, P. et Santa, S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In: CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.

R

- Rahman, I. (2002).** Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1(3) : 291-315.
- Revuz, J. (2009).** Traité EMC : Cosmétologie et dermatologie esthétique. Elsevier Masson. pp: 2.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Bolwer, P.G., Bramley, P.M. et Ridham, J.B. (1995).**The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.* (22),375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. et Paganga, G. (1996).** Structure–antioxidant activity Relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*, 20: 933–956.
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R. et Mata, R. (1992).** Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 35: 275-283.

S

- Sahreen, S., Khan, M .R. et Khan, R. A. (2010).** Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122, 1205-1211.
- Sarker, S .D., Lati, Z. et Gray, A. I. (2005).** Natural Product Isolation. *In:* Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), pp: 1-23.
- Sarni-Manchado, P. et Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. P 2- 10.
- Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- Seidel, V. (2005).** Initial and Bulk Extraction. *In:* Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), pp: 27-37.
- Seigler, D.S. (1998).** Plant secondary metabolism. Ed. Kluwer Academic, Boston, p. 193-205.
- Singer, A.J. et Clark, R.A.(1999).** Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.*341 (10), 738-746.

- Skandamis, P.N. et Nycha, G.J.E. (2001).** Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J. Applied Microbiol.* 91: 1011-1022.
- Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F. et al. (1996).** Oxidative damage in Alzheimer's [letter]. *Nature*, 382: 120.
- Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H. et Hagen, T.M. (2004).** Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem*, 11: 1135– 1146.
- Sofowora, A. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition Karthala : 22.
- Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. et Jeanmonod, D. (2004).** Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes. 413p.
- Srivastava, P. et Durgaprasad, S. (2008).** Burn wound healing properties of *Cocos Nucifera* –An appraisal. *Indian J Pharmacol*, (40), 144-146.
- Sundararajan, R., Haja, N.A., Kumar, V., Mukherjee, K., Saha, B. P., Bandyopadhyay, A. et Mukherjee, P.K. (2006).** *BMC.Complementary and Alternative Med.*, 6(8), 1-7.
- Svoboda, K.P. et Hampson, J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

I

- Tamer Fouad, M.D. (2003).** Free radicals, Types, sources and damaging reactions, Internal Medicine Articles. (<http://www.doctorslounge.com/primary/articles/>)
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad M. et El-Elimat T. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem*; 104: 1372-1378.
- Tchin, D. (2014).** Effet topique de l'extrait hydro ethanolique de L'Acacia Nilotica sur la cicatrisation cutanée des brulures de second degré. 10(30), 212-221.
- Teixeira da Silva, J. A. (2004).** Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *Afr. J. Biotechnol.*3: 706-720.

Tim C.T.P. et Andrew J. L. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 26:343–356.

Tortora, G. J., Grabowski, S. R. et Parent, J. (1994). Principes d'anatomie et de physiologie. Anjou: Centre Éducatif et Culturel Inc, 1203 p.

Trease, E. et Evans, W.C. (1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62. In Karumi, Y., Onyeyili, P.A et Ogugduaja, V .O. (2004). Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pomme). *Journal of Medicine and scientific.* 4(3), 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.

U

Urquiaga, I. N. E. S. et Leighton, F. E. D. E. (2000). "Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.* 33: 55-64.

V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M .T. D., Mazur, M. et Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. et Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160: 1–40

Van Vuuren, S. F., Suliman, S. et Viljoen, A. M.(2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 440–446.

Virost, S. (2004). Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de cristalline. *Thèse de doctorat*, Université Claude Bernard-Lyon 1.

Vuorela, S. (2005). Analysis, isolation and bioactivities of rapeseed phenolics. Ed. University of Helsinki, Helsinki, p. 76.

W

Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G. et Fu, Y.J. (2012). Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. *Food chemistry.* 108 (3): 1019-1022.

Wong, S. P., Leong, L. P. et William Koh, J .H. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99, 775-783.

X

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J. et Li, H .B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 622-646.

Xu, R.X. et Xiao, M. (2003), The mechanism of Burn Regenerative Therapy and wound healing. *The Chinese Journal of Burns Wounds and Surface Ulcers* (4), 262-271.

Y

Yamada, H. et Kiyohara, H. (1999). Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. In *Immunomodulatory agents from plants*. H. Wagner, Birkhäuser, Basel.p. 161-202.

Yildirim, A., Mavi, A. et Kara, A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4083-4089.

Yochum, L ., Kusli, L., Meyer, K . et Folsom. A. (1999) . Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epiderma*,149, 943 949.

Yan, J., Guo, J. et Yuan, J. (2008). In vitro antioxyadnt properties of rutin, *LWT*, 41: 1060-1066.

Yzydorczyk, C. (2011). Rôle du stress oxydant en période néonatale dans l’hypertension artérielle et la dysfonction vasculaire et métabolique de l’adulte. Thèse en vue de l’obtention du grade de PhD en Sciences Biomédicales. Université de la Montréal.

Z

Zou, Y. P., Lu, Y. H. et Wei, D. Z. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5032-5039.

Original Research Paper

Evaluation of the *Cytisus Triflorus* (Lam.) Polyphenols Cicatrizing Activity on Experimental Thermal Burns in New Zealand Rabbits

¹Sihem Khadri, ¹Nafissa Boutefnouchet, ²Youcef HadeF and ^{3,4}Zouhir Djerrou

¹Laboratory of Applied Microbiology and Biochemistry,

Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

²Chemistry Analytical Laboratory, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine,

Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

³Pharmacotoxicology Laboratory, Institute of Veterinary Sciences, Mentouri Constantine University, Algeria

⁴Department of Nature and Life Sciences, Faculty of Sciences, University of August 20th, 1955 Skikda, Algeria

Article history

Received: 25-01-2018

Revised: 01-04-2018

Accepted: 11-05-2018

Corresponding Author:

Zouhir Djerrou

Department of Nature and Life

Sciences, Faculty of Sciences,

University of August 20th,

1955 Skikda, Algeria

Email: zouhir21265@yahoo.fr

Abstract: The present study aimed to evaluate the healing properties of the medicinal plant *Cytisus triflorus* widely used in the traditional treatment of wound healing. The principle of study is the application of the polyphenol extract of this plant prepared with vaseline in the form of a dermal ointment on thermal burns of second deep degree (circular of 379.94mm² in diameter) previously caused experimentally by a hot cylindrical metal on the backs of new Zealand rabbits. Each rabbit receives four burns two dorsal and two lumbar which were treated immediately after burning with a quantity of 0.5 g of vaseline (positive control), 0.5 g of commercial ointment skin MEBO (reference), 0.5 g of poly phenolic extract and untreated burn served as a negative control. The treatments were done daily until the complete epithelialization of the wound. The evaluation of the healing process was based on the healing time and the burn contraction percentage calculated every two days. According to the obtained results, the vaseline shows a better percentage of burn contraction during the inflammatory phase (2nd-6th day) with a significant effect (p<0.05) as compared to the reference drug MEBO and the Polyphenol extract that stimulated burn contraction from the 8th day (end of the inflammatory phase) significantly compared with vaseline and untreated burns. However, poly phenolic extract significantly appears to be more effective than the reference drug by shortening the epithelialization period (19 days) as compared to other products; MEBO drug (20 days), pure vaseline (24 days) and untreated burns (25 days). The study concludes that *Cytisus triflorus* polyphenols promote burn wound healing in rabbit's model.

Keywords: *Cytisus triflorus*, Skin Burns, Polyphenols, New Zealand Rabbits

Introduction

The empirical use of medicinal plants in the treatment of wounds and burns is well recognized in most countries. These plants constitute an immense reservoir of new potential medicinal compounds with a great diversity of chemical structure and biological activities (Guilbaud *et al.*, 1993). Indeed, polyphenols are natural compounds widely used in the plant kingdom; they represent one of the groups of secondary metabolites which have an increasing importance thanks to their beneficial effects on health (Koechlin-Ramonatxo, 2006). In recent

years these compounds have aroused great interest because of their composition of flavonoids which are compounds with strong antioxidant properties (Rice-Evans *et al.*, 1995) and phenolic acids which have interesting biological properties: anti-inflammatory, antibacterial, antiseptic, anti-radical, immunostimulant (Bruneton, 1993).

Cytisus triflorus (Lam) plant, locally known as "Ilougui" belongs to the Fabaceae family; it is the most widespread species among the 8 species growing naturally throughout the north of Algeria (Ait-KaciAourahoun *et al.*, 2015). Preliminary phytochemical screening of the plant shows the presence of a wide variety of chemical structures

including terpenes, tannins, flavonoids, phenolic acids, alkaloids and coumarins (Ait-KaciAourahoun *et al.*, 2015). However, it constitutes an immense reservoir of biological activities of which it traditionally represents a remedy of several affections. It is used to treat abdominal pain, wound healing, antifungal, hypotensive and antidiabetic (Sundararajan *et al.*, 2014; Ait-kaciAourahoun *et al.*, 2015).

The main aim of study is to provide a scientific justification of the traditional use of *C. triflorus* in the healing of burns; we have tested the healing activity of polyphenols extracted from this plant on thermal burns experimentally induced on the skin of New Zealand rabbit's model.

Materials and Methods

Products

Total polyphenols extracted from dry leaves of the medicinal plant *Cytisus triflorus* Lam., harvested from Collo region of Skikda province, by maceration in an 80% hydro-methanolic solution in three successive days with renewal of solvent every 24 h. The solvent/plant material ratio was (10/1: mL/g) (Marston and Hotsmann, 2006).

Pure Vaseline (100%) and MEBO commercial ointments were purchased from a private pharmacy. Vaseline was used as an excipient in the preparation of a dermal ointment based on our polyphenolic extract. MEBO (lot: 020101, expiration date: 15 Feb. 2020) was served as a reference drug. Each 100 g of MEBO contains: 0.25 g of B-sitosterol (active substance), sesame oil and beeswax (excipients).

Laboratory Animals

The study was conducted on eight New Zealand healthy males rabbits, weighing $1.62 \text{ Kg} \pm 0.21$ at the start of the experiment, purchased from a private farm located in El Harrouch, Skikda. The animals were kept in individual cages and acclimatized for three weeks before the test; they were kept under normal conditions of humidity, temperature and lighting with free access to water and food (*ad libitum*).

Experimental Protocol

Our work was carried out according to the technique described by Hamdi-Pacha *et al.* (2002).

Application of Burns

Rabbits were tagged in the head in order to identify them. The back of each rabbit was shaved with a depilatory cream five days before the application of burns. Each rabbit received on its back four circular burns (Fig. 1 and 2) distributed on both sides of the thoracolumbar spine, 2 dorsal (left and right) and 2 lumbar (left and right). The application of thermal burns of 22 mm diameter was made after local anesthesia of areas to be burned with UNICAINE at 2%.



Fig. 1: Location of burns on the back of each rabbit



Fig. 2: Circular burn on the back of a rabbit

Burn's Treatment

The tested products were applied immediately after performing burns topically at a dose of $0.5 \text{ g}/379.94 \text{ mm}^2$. The treatments were repeated once daily until complete epithelialization takes place:

- Wound 1: Received polyphenolic extract mixed with vaseline
- Wound 2: Treated with MEBO ointment and served as a reference wound
- Wound 3: Treated with vaseline gel and served as a positive control
- Wound 4: Received no treatment and served as a negative control

Evaluation of the Healing Process

Our study was based on two evaluation criteria: healing time and evolution of the wound surface. We proceeded to

measure the percentage of the contraction of the wounds every 2 days according to the following equation:

$$\text{Percentage of burn contraction} = (\text{initial area of burn} - \text{area of burn of day } n) \times 100 / \text{initial area of burn} \text{ (Srivastava and Durgaprasad, 2008)}$$

Statistical Analysis

The results obtained are analyzed statistically using the Minitab program16, the data were expressed as mean±standard deviation. The student's test is used to compare the effectiveness of our tested products whose significance threshold was set at p<0.05.

Results

The rabbits survived throughout the experimental period. All animals were in good health, no mortality or clinical signs are noted. The different products tested did not significantly modify the body evolution of the rabbits.

On day zero, all burns had the same diameter and the same signs of inflammation. The observation of the evolution of the burns treated with the different products

has shown a decrease of their surfaces over time, this reduction is in variable chronology according to each type of treatment. The results obtained are shown in Table 1 and Fig. 3-5 as a percentage of wound contraction calculated every 2 days.

During the inflammatory phase from day 2 to day 6 (Fig. 1 and Table 1), the percentage of contraction in wounds treated with vaseline is better (with a significant effect) than those recorded during treatment with the polyphenol extract and the commercial drug MEBO, the lowest rate of contraction is noted in untreated wounds.

From the 12th day to the 18th day, the result shows that both MEBO product and the polyphenolic extract stimulate the contraction of the wound significantly (p<0.05) as compared with Vaseline and untreated wounds. However, polyphenolic extract seems to be more efficient than MEBO. The epithelialization period (Fig. 4) was significantly shorter in burns treated with polyphenol extract compared to vaseline and untreated wounds. Finally, the longest healing time was obtained in untreated burns.

Table 1: Percentages of wound contraction at different intervals in burns treated and untreated burns

(n = 8)	Wound contraction (%) Mean±SD									
	2 nd day	4 th day	6 th day	8 th day	10 th day	12 th day	14 th day	16 th day	18 th day	
VAS	22,488±13,699	30,384±10,847	33,345±15,735	40,385±8,963	45,32±9,394	51,571±10,985	55,19±13,961	61,573±17,720	83,331±10,408	
CRL	3,866±5,377	5,972±8,180	8,67±12,193	16,632±14,773	22,093±5,598	50,519±4,397	54,401±8,057	59,994±13,736	70,522±16,093	
MEB	11,631±7,5	16,368±5,5	18,606±11,295	24,922±12,580	34,398±11,676	57,296±9,323	68,942±5,715	80,063±13,647	86,84±15,620	
POLY	12,289±12,764	21,567±8,042	23,87±12,038	44,465±8,485	55,519±11,776	64,994±11,165	81,576±5,099	90,985±16,213	93,771±9,866	

POLY: Burns treated with polyphenols, **VAS:** Burns treated with pure vaseline, **MEB:** Burns treated with MEBO ointment and **CRL:** Untreated burns (control)

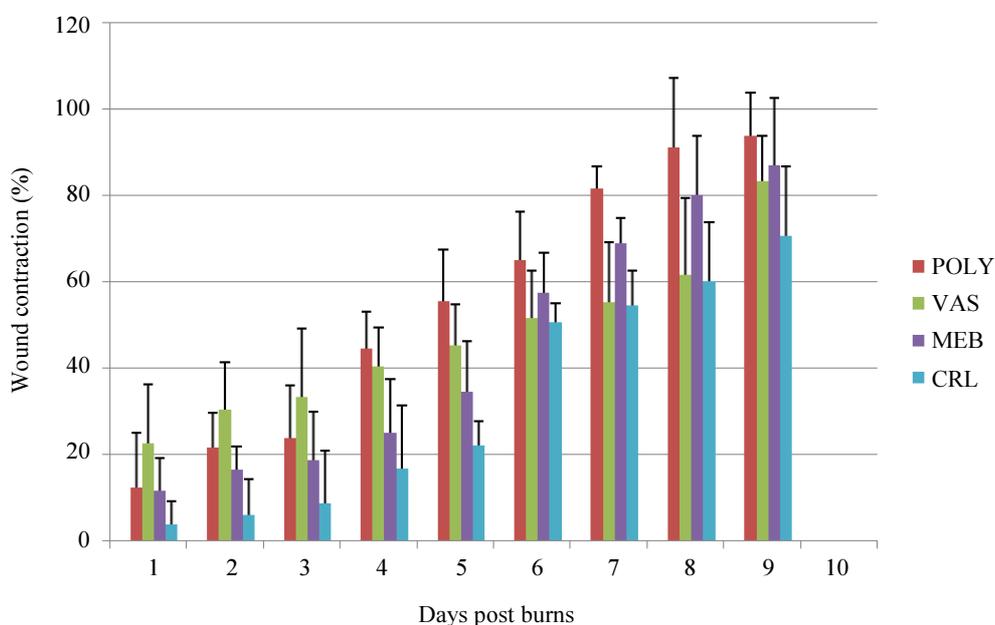


Fig. 3: Contraction percentages of wounds in treated burns and untreated burns; POLY: Burns treated with polyphenols, VAS: Burns treated with pure vaseline, MEB: Burns treated with MEBO ointment and CRL: Untreated burns (control)

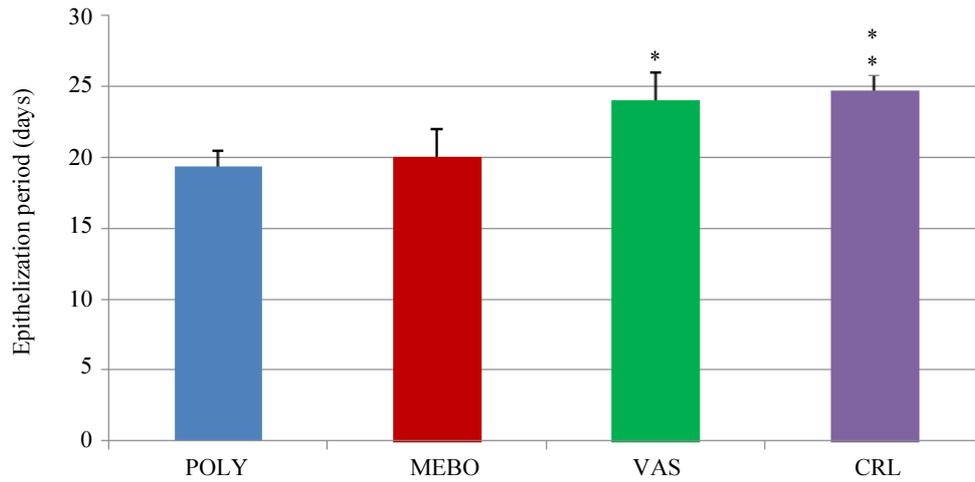


Fig. 4: Duration of wound healing (days); POLY: Burns treated with polyphenols, VAS: Burns treated with pure vaseline, MEB: Burns treated with MEBO ointment and CRL: Untreated burns (control)

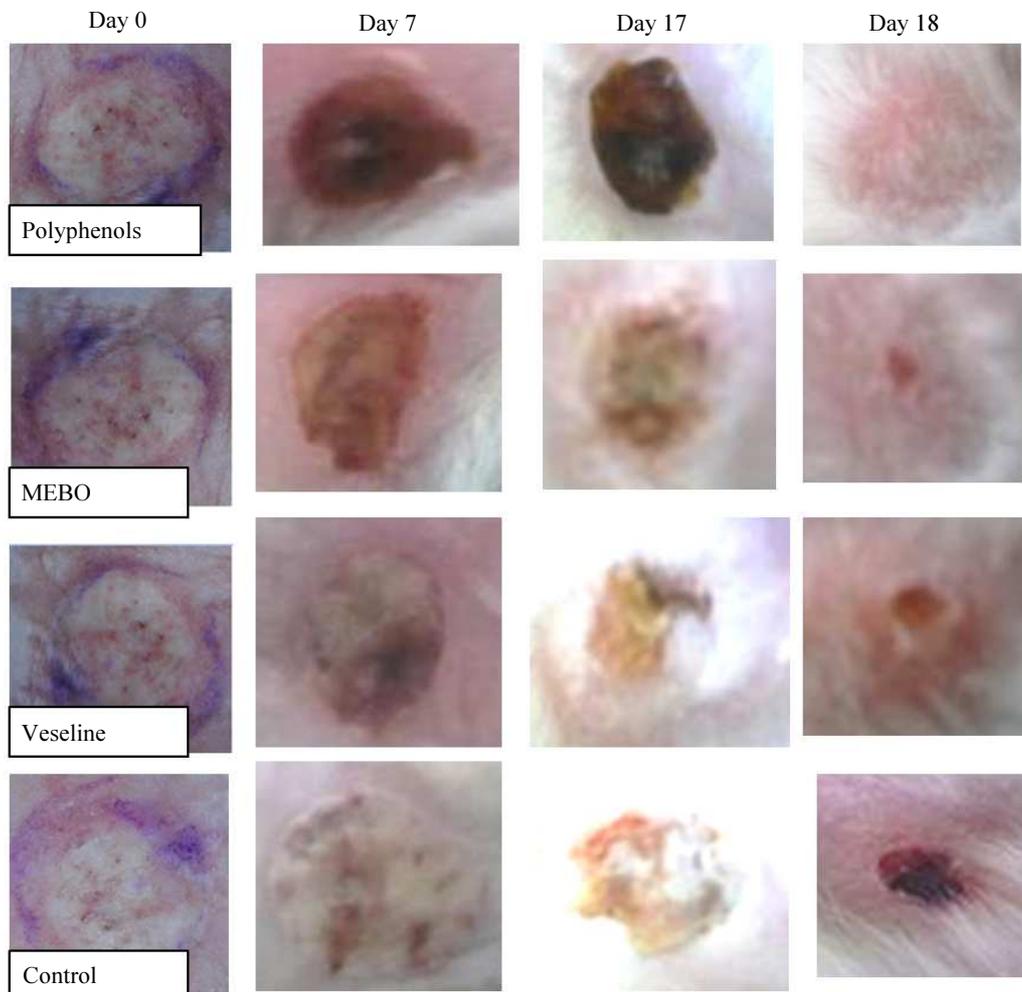


Fig. 5: Chronology of burn healing; Polyphenols: Burns treated with polyphenols, Vaseline: Burns treated with pure vaseline, MEBO: Burns treated with MEBO ointment and control: Untreated burns

Discussion

In the early stages of the healing process, vaseline is able to inhibit the evaporation of wound water, so it is known that a moist physiological environment must be formed in the wound for skin repair and regeneration of damaged tissue. However, prolonged therapy can lead to tissue alteration and maceration (Xu and Xiao, 2003). Contrary to the results obtained by Djerrou *et al.* (2010) and Maameri *et al.* (2012) who mention that *Pistacia lentiscus* fatty oil improves the healing effect from the 4th day, wounds treated with our polyphenol extract show the greatest contraction percentages at the end of the inflammatory phase (8th day), from the planimetric point of view, this extract promotes the inflammatory phase gradually, which is essential to the smooth running of the scar process.

Ait-KaciAourahoun *et al.* (2016) showed that; the leaves of the plant *Cytisus triflorus* are rich in unsaturated fatty acids (72.51%), of which alpha linoleic acid and linolenic acid constitute the dominant components of this fraction with a percentage of 13.73 and 48.24% respectively and saturated fatty acids (27.43%) including palmitic acid (22.29%). Fatty acids are able to reduce trans-epidermal water loss and thereby increase skin hydration (Dweck, 2007). Alpha linoleic acid and linolenic acid are known for their anti-inflammatory effect and their ability to provide lipids necessary for cell repair and respiration (Loden and Andersson, 1996).

Ait-KaciAourahoun *et al.* (2015) have also demonstrated that polyphenols in the leaves of the medicinal plant *Cytisus triflorus* are rich in flavonoids (52.13±1.69 mg equivalent of Quercetine/g of extract) revealed a considerable antioxidant activity with a half maximal inhibitory concentration of 19.17 µg/mL and promote 50% inhibition of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) with antioxidant activity index of 1.04. However, many studies have shown that plants traditionally used as healing agent have immune activation properties, this activation would be the mechanism of healing wounds (Yamada and Kiyohara, 1999; Nergård *et al.*, 2005), as well as the various antioxidants are able to reduce free radicals, preventing the depreciation at the cellular level. They inhibit inflammation, which leads to collagen depletion and offer protection against photon damage and skin cancer (Djerrou *et al.*, 2010).

Conclusion

In the present study, the dermal burn healing properties of *Cytisus triflorus* were investigated. In light of the obtained results, it appears that polyphenols of this medicinal plant are more effective than the reference drug "MEBO" and vaseline by shortening the epithelialization period. The study concludes that

Cytisus triflorus polyphenols promote burn wound healing in rabbit's model.

Acknowledgement

The authors would like to thank all persons who helped to carry out this study, particularly Hadjer Boukria and Imene Gueddah.

Author's Contributions

Siham Khadri: Performed the experiments, analyzed and interpreted the study findings, drew conclusions and prepare the manuscript.

Nafissa Boutefnouchet: Designed the research plan, coordinated the implementation of research work and contributed to result analysis.

Youcef Hadeef: Participated in experiment's design, coordinated the implementation of research work.

Zouhir Djerrou: Gave suggestions and contributed to the scientific writing and revision of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ait-KaciAourahoun, K., F. Fazouane and S. Benayache, 2015. Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. Extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent. *Der Pharm. Lett.*, 7: 104-110.
- Ait-kaciAourahoun, K., F. Fazouane, S. Benayache and F. Souici, 2016. Fatty acid Profiles of soxhlet and Ultrasonic obtained oils from the promising medicinal legume *Cytisus triflorus* L'Hérit. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.*, 5: 05-09.
- Bruneton, J., 1993. *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales*. 2nd Edn., Technique et documentation-Lavoisier, Paris, ISBN-10: 2852069113, pp: 915.
- Djerrou, Z., Z. Maamari, Y. Hamdi-Pacha, M. Serakta and F. Riachi *et al.*, 2010. Effect of virgin fatty oil of *Pistacia lentiscus* on experimental burn wound's healing in rabbits. *Afr. J. Trad. CAM*, 7: 258-263. DOI: 10.4314/ajtcam.v7i3.54788
- Dweck, A.C., 2007. Herbal medicine for the skin. Their chemistry and effects on skin and mucous membranes. *Personal Care Magazine*, 3: 19-21.
- Guilbaud, J.L., H. Carsin and Y. LeGulluche, 1993. *Brûlures*. Encyclo Medchi, Paris.
- Hamdi-Pacha, Y., A. Belkhiri, M. Benazzouz, L. Benhamza and L. Bensegueni, 2002. Evaluation de l'activité cicatrisante suite à des brûlures expérimentales de quelques plantes algériennes. *Revue Méd. Pharm. Afri.*, 16: 1-7.

- Koechlin-Ramonatxo, C., 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrit. Clin. Métabol.*, 20: 165-177.
DOI: 10.1016/j.nupar.2006.10.178
- Loden, M. and A.C. Andersson, 1996. Effect of topically applied lipids on surfactant-irritated skin. *Br. J. Dermatol.*, 134: 215-220.
DOI: 10.1046/j.1365-2133.1996.978714.x
- Maameri, Z., K. Beroual, Z. Djerrou, S. Habibatni and B. Benlaksira *et al.*, 2012. Preliminary study to assess cicatrizing activity of honey and *Pistacialentiscus* fatty oil mixture on experimental burns in rabbits. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2: 476-480.
- Marston, A. and K. Hosttmann, 2006. Separation and Quantification of Flavonoids. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* andersen, O.M. and K.R. Markham (Eds.), Taylors and Francis, ISBN-10: 0849320216, pp: 1-36.
- Nergård, C.S., 2005. Immunomodulating pectic polymers. PhD Thesis of Scientiarum, Departement of Pharmacognosy, School of Pharmacy, University of Oslo, Norway.
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley and J.B. Pridham, 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.*, 22: 375-383.
DOI: 10.3109/10715769509145649
- Srivastava, P. and S. Durgaprasad, 2008. Burn wound healing property of *Cocos nucifera*: An appraisal. *Ind. J. Pharmacol.*, 40: 144-146.
- Sundararajan, R., A. Bharampuram and R. Koduru, 2014. A review on phytoconstituents for nephroprotective activity. *Pharmacophore*, 5: 160-182.
- Xu, RX. and M. Xiao, 2003. The mechanism of burn regenerative therapy and wound healing. *Chinese J. Burns Wounds Surface Ulcers*, 4: 262-271.
- Yamada, H. and H. Kiyohara, 1999. Complement-Activating Polysaccharides from Medicinal Herbs. In: *Immunomodulatory Agents from Plants*, Wagner, H. (Ed.), Birkhäuser, Basel, pp: 161-202.