

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



THESE

Présenté à

L'ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE KOUBA, ALGER

DÉPARTEMENT DES SCIENCES NATURELLES

LABORATOIRE D'ETHNOBOTANIQUE ET SUBSTANCES NATURELLES

POUR OBTENIR LE DIPLÔME DE

Docteur en sciences

SPECIALITE: BIOLOGIE

OPTION: BIOCHIMIE

par

LAKACHE Zineb

**Investigation d'activités biologiques de différents extraits
de deux plantes médicinales Algériennes:**

Olea europaea et Crataegus azarolus.

Soutenu le :

Devant la commission d'examen composée de:

M. TOUMI Mohamed	Professeur	ENS Kouba-Alger	Président
M. KAMELI Abdelkrim	Professeur	ENS Kouba-Alger	Directeur de thèse
Mme. TIGRINE-KORDJANI Nacéra	Professeur	USTHB Bab-Ezzouar	Co-directrice de thèse
Mme. BELKEBIR Aicha	Professeur	USTHB Bab-Ezzouar	Examinatrice
M. YOUSFI Mohamed	Professeur	Université de Laghouat	Examineur

Année universitaire 2015/201

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AGP : Acides Gras Polyinsaturés
AINS : Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens
AIS : Anti-inflammatoires Stéroïdiens
ANOVA : Analyse de la variance
ARN : Acide ribonucléique
BHT : Hydroxytoluène butylé
CMI : Concentration minimale inhibitrice
COX : Cyclo-oxygénase
DZI : Diamètre de zone d'inhibition
EM : Extrait méthanolique
ERO : Espèces Réactives De L'oxygène
FAD : Fraction d'acétate d'éthyle
FCH : Fraction de chloroforme
FED : Fraction d'éther diéthylique
GPx : Glutathion Peroxydase
GSH : Glutathion
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule
IL-1 : Interleukine-1
LOX : Lipo-oxygénase
NF-κB : Nuclear factor-kappa B
NIST : National Institute of Standards and Technology
NOS : Nitric Oxyde Synthase
ONAB : Office National des Aliments du Bétail
p38 MAPK : p38 MAP Kinase
T+ : Témoin positif

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Généralités sur <i>Olea europaea</i>	3
I.1. Distribution géographique et habitat.....	3
I.2. Description botanique.....	3
I.3. Classification botanique.....	4
I.4. Composition des feuilles	5
I.4.1. Composition chimique globale	5
I.4.2. Composition chimique en composés bioactifs.....	6
I.5. Effet thérapeutique des feuilles	7
II. Généralités sur <i>Crataegus azarolus</i>	8
II.1. Distribution géographique et habitat.....	8
II.2. Description botanique.....	9
II.3. Classification botanique.....	10
II.4. Composition chimique.....	10
II.5. Effet thérapeutique	12
III. Principales substances actives végétales.....	13
III.1. Définition et fonctions des métabolites secondaires.....	13
III.2. Classification des métabolites secondaires.....	13
III.2.1. Composés phénoliques.....	13
III.2.1.1. Acides phénoliques.....	14
III.2.1.2. Coumarines	14

	5
III.2.1.3. Tanins.....	1
	5
III.2.1.4. Flavonoïdes.....	1
	6
III.2.2. Huiles essentielles.....	1
	8
III.2.2.1. Composition chimique.....	1
	8
III.2.2.1.1. Terpènes.....	1
	9
III.2.2.1.2. Composés aromatiques.....	1
	9
III.2.3. Alcaloïdes.....	1
	9
IV. Activités biologiques.....	2
	1
IV.1. Activité antioxydant.....	2
	1
IV.1. 1. Définition d'un radical libre.....	2
	1
IV.2. Stress oxydant.....	2
	1
IV.3. Sources radicaux libres.....	2
	2
IV.4. Effet des radicaux libres.....	2
	2
IV.4. Antioxydants.....	2
	3
IV.4. 1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	2
	4
IV.4. 1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	2
	4
IV.4. 1.2. Catalase.....	2
	5

IV.4.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)	2
	5
IV.5. Systèmes antioxydants non enzymatique.....	2
	5
IV.5.1. Vitamine C.....	2
	5
IV.5.2. Vitamine E.....	2
	6
IV.5.3. Glutathion.....	2
	7
IV.5.4. Caroténoïdes.....	2
	7
IV.2 Activité antimicrobienne.....	2
	8
IV.2.1. Définition d'un antibiotique.....	2
	8
IV.2.2. Classification des antibiotiques	2
	8
IV.2.3. Mode d'action des antibiotiques.....	2
	8
IV.2.3.1. Action sur la paroi bactérienne	2
	8
IV.2.3.2. Action sur la membrane cytoplasmique.....	2
	8
IV.2.3.3. Action sur la réplication de l'ADN et ARN.....	2
	9
IV.3. Activité anti-inflammatoire.....	3
	1
IV.3.1. Définition de l'inflammation	3
	1
IV.3.2. Anti-inflammatoires.....	3
	1
IV.3.2.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	3
	1
IV.3.2.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).....	3
	1

ETUDE EXPERIMENTALE

I. Matériel.....	3
	3
I.1. Matériel végétal.....	3
	3
I.2. Matériel animal.....	3
	3
II. Extraction des huiles essentielles.....	3
	3
II.1. Extraction par Hydrodistillation (HD).....	3
	4
II.2. Extraction par l'hydrodistillation assistée par micro-onde (HD-MO).....	3
	4
II.3. Rendement en huile essentielle.....	3
	6
III. Extraction des composés phénoliques.....	3
	6
III.1. Extraction par macération.....	3
	6
III.2. Extraction de type liquide/liquide.....	3
	6
III.3. Détermination du rendement.....	3
	6
IV. Criblage phytochimique	3
	8
IV.1. Recherche des alcaloïdes	3
	8
IV.2. Recherche des tanins	3
	8
IV.3. Recherche des saponosides.....	3
	8
IV.4. Recherche des Stérols et stéroïdes.....	3
	8
IV.5. Recherche des anthraquinones.....	3
	9

V. Dosage colorimétrique.....	3
	9
V.1. Dosage des polyphénols totaux.....	3
	9
V.1.1. Principe	3
	9
V.2. Dosage des flavonoïdes.....	3
	9
V.2.1. Principe	3
	9
VI. Etude analytique des huiles essentielles	4
	0
VI.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID).....	4
	0
VI.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....	4
	0
VI.3. Identification des composants	4
	1
VII. Etude analytique des extraits phénoliques.....	4
	1
VII.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	4
	1
VIII. Etude des activités biologiques.....	4
	2
VIII.1. Etude de l'activité antioxydant.....	4
	2
VIII.1.1. Test de piégeage du radical DPPH.....	4
	2
VIII.1.2. Test de blanchiment de β -carotène.....	4
	3
VIII.1.3. Test de pouvoir réducteur (FRAP).....	4
	3
VIII.2. Etude de l'activité antimicrobienne.....	4
	4

VIII.2.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme).....	4
	5
VIII.2.2. Méthode de macro-dilution en milieu solide.....	4
	6
VIII.3. Etude de la toxicité des plantes	4
	6
VIII.4. Etude de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	4
	6
VIII.4.1. Etude de l'activité anti-inflammatoire aigue.....	4
	6
VIII.4.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire topique.....	4
	7
VIII.5. Etude de l'activité antalgique (test de torsion).....	4
	8
VIII.6. Etude de l'activité cytotoxique par le test de « Brine shrimp ».....	4
	9
IX. Etude statistique.....	5
	0
RESULTATS	
I. Détermination du rendement des extraits.....	5
	1
II. Criblage phytochimique.....	5
	1
III. Dosage colorimétrique des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	5
	3
IV. Composition chimique.....	5
	5
IV.1. Rendement des huiles essentielles.....	5
	5
IV.2. Composition chimique des huiles essentielles par GC-MS.....	5
	6
IV.2. 2. Composition chimique des huiles essentielles de <i>Crataegus azarolus</i>	5
	6
IV.3. Composition chimique des extraits phénoliques.....	6
	0

IV.3.1. Composition chimique des extraits d' <i>O.europaea</i>	6
	3
IV.3.2. Composition chimique des extraits de <i>C.azarolus</i>	6
	7
V. Etude des activités biologiques.....	7
	0
V.1. Etude de l'activité antioxydante des extraits.....	7
	0
VI.1.1. Piégeage du radical DPPH.....	7
	0
IV.1.2. Blanchiment de β -carotène/acide linoléique.....	7
	4
IV.1.3. Pouvoir réducteur (FRAP).....	7
	6
V.2. Etude de l'activité antimicrobienne.....	7
	9
V.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	8
	3
V.3. Etude de la toxicité des plantes.....	8
	4
V.4. Etude de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	8
	4
V.4.1. Etude de l'activité anti-inflammatoire aigue.....	8
	4
V.4.1. Etude de l'activité anti-inflammatoire topique.....	8
	6
V.5. Etude de l'activité antalgique <i>in vivo</i>	8
	8
V.6. Etude de l'activité cytotoxique.....	9
	0
DISCUSSION	
I. Criblage phytochimique et dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	9
	1
II. Etude des activités biologiques.....	9
	0

II.1. Etude de l'activité antioxydante des extraits	9 0
II.2. Etude de l'activité antimicrobienne.....	1 0 3
II.3. Etude de l'activité anti-inflammatoire	1 0 6
II.4. Etude de l'activité antalgique.....	1 0 9
II.5. Etude de l'activité cytotoxique	1 1 0
CONCLUSION	1 1 2
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	1 1 4

INTRODUCTION

RESUME

Olea europaea et *Crataegus azarolus* sont deux plantes médicinales largement utilisées en médecine traditionnelle algérienne. Dans la présente étude, les activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et cytotoxique des différents extraits (EM, FAD, FED, FCH), de ces deux plantes sont évaluées. De même, une étude phytochimique a été réalisée pour identifier les différentes familles des composés chimiques contenus dans ces extraits. Les résultats obtenus montrent que l'analyse qualitative des extraits et des huiles essentielles par GC et par HPLC a permis de mettre en exergue des composés majoritaires et des composés minoritaires. Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des alcaloïdes, anthraquinone, tanins, stérols et triterpènes dans tous les extraits. Les triterpènes et anthraquinone sont très abondants dans les extraits EAF et DEF. Les saponosides sont absents dans les extraits de *C.azarolus*. Les dosages des polyphénols et des flavonoïdes révèlent leur existante dans tous les extraits dont l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d'*Olea europaea* est le plus riche en composés phénoliques avec un taux de 276.76 ± 10.25 mg EAG/g, par rapport l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles et fleurs de *Crataegus azarolus* (111.96 ± 1.66 mg EAG/g).

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée grâce à trois méthodes; le piégeage du radical libre DPPH, le blanchiment de β -carotène et le pouvoir réducteur. L'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode du piégeage des radicaux libres (DPPH) a montré que les extraits étudiés ont une excellente activité antioxydante, surtout pour l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d'*O.europaea* ayant présenté une IC_{50} de $4.9 \mu\text{g/mL}$. Selon le test de β -carotène/acide linoléique, l'oxydation du β -carotène a été effectivement inhibée par les différents extraits d'*O. europaea* et de *C.azarolus* notamment pour les extraits de chloroforme (FCH) avec un pourcentage d'inhibition respectivement de 67.86 et 65.45%. En outre, la méthode du pouvoir réducteur a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d'*O.europaea* a le meilleur pouvoir réducteur (EC_{50} $14.18 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$) par rapport à ceux des autres extraits.

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur les différents extraits des feuilles d'*Olea europaea* et des feuilles et fleurs de *Crataegus azarolus* par la méthode de diffusion en milieu solide sur 5 souches bactériennes et 7 souches fongiques. Les différents extraits des feuilles d'*O.europaea* sont très actifs sur les souches de références des bactéries de Gram+. En effet, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* sont les germes les plus sensibles, avec des diamètres de zone d'inhibition de l'ordre de 20 et 25 mm respectivement pour l'extrait de méthanol. Les extraits des feuilles et fleurs de *C.azarolus* ont exercé une activité antibactérienne modérée contre l'ensemble des souches testées.

L'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques d'*O.europaea* et de *C.azarolus* a été explorée *in vivo* par l'induction de l'œdème de la patte et de l'oreille chez la souris en utilisant respectivement le λ -carraghénine et l'huile de croton. Les résultats obtenus indiquent que tous les extraits ont plus ou moins donné une inhibition de l'œdème par rapport au témoin. L'administration de l'extrait méthanolique (400 mg/kg) des feuilles d'*Olea europaea* et des feuilles et fleurs de *Crataegus azarolus* aux souris par voie orale a induit une forte inhibition de l'inflammation de la patte avec des pourcentages de 96% et 42.28% respectivement. Cette activité anti-inflammatoire a été confirmée par voie topique avec le test de l'œdème de l'oreille. Ainsi, le lot traité avec une application cutanée de l'extrait méthanolique de *C.azarolus* (0.5 mg/oreille) a présenté un important taux de réduction de l'œdème (63.63 %). De même, les résultats obtenus indiquent que les deux extraits méthanoliques de *C.azarolus* et *O.europaea* inhibent la douleur provoquée par l'acide acétique chez la souris avec des pourcentages de 84.59 et 77.49 % respectivement pour la dose 600 mg/kg. Le test de « Brine shrimp » de deux extraits méthanolique deces deux plantes ne présente aucune cytotoxicité contre les larves d'*Artemia salina* avec des valeurs de LC_{50} de l'ordre de 9800 et 10043 $\mu\text{g/mL}$ respectivement pour l'*O.europaea* et *C.azarolus*.

Mots clés : *Olea europaea*, *Crataegus azarolus*, activités biologiques, métabolites secondaires.

ABSTRACT

Olea europaea and *Crataegus azarolus* are two medicinal plants widely used in traditional medicine in Algeria. In this study, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of different extracts, of these two plants were evaluated (EM, FAD, FED, FCH). Similarly, a phytochemical study was conducted to identify the different families of chemical compounds present in these extracts. The qualitative analysis of extracts and oil by GC and HPLC showed the major and minor compounds. The phytochemical screening showed the presence of alkaloids, anthraquinone, tannins, sterols and triterpenes in all extracts. Triterpenes and anthraquinone are very abundant in FAD and FED extracts. The saponins are absent in all extracts of *C.azarolus*. The quantitative estimation of total polyphenols and flavonoids showed their existence in all extracts, where FAD of *O.europaea* is the richest in phenolic compounds (276.76±10.25 mg equivalent of gallic acid/g of extract) compared to the FAD of *C. azarolus* (111.96 ± 1.66 mg equivalent of gallic acid/g of extract).

The antioxidant activity of different extracts was assessed using: DPPH· free radical, reducing power and β-carotene bleaching methods. The evaluation of the antioxidant activity by DPPH· showed that the extracts have a very good antioxidant activity, especially the FAD of *O.europaea* with an IC₅₀ of 4.9 μg/mL. In β-carotene bleaching test, the oxidation of β-carotene was effectively inhibited by different extracts of both plants, especially the chloroform extract with inhibition percentage of 67.86 % for *O.europaea* and 65.45% for *C.azarolus*. On the other hand, the method of reducing power found that FAD of *O.europaea* has the best reducing power (EC₅₀ 14.18 ± 0.08μg/mL) versus those of other extracts.

The antimicrobial activity was evaluated by the solid medium diffusion method using six bacterial strains and six fungi strains. The various extracts of *O.europaea* showed significant antibacterial activities on all reference gram+ strains. The WEC and FCH extracts were the most active with inhibition zone diameters ranging between 16 and 26 mm against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *E. coli*. However, *C. azarolus* extracts exerted a moderate antibacterial activity against all tested strains.

The *in vivo* anti-inflammatory activity of methanolic extracts of both plants was evaluated by induction of paw and ear edema in mice using the λ-carrageenan and croton oil respectively. The results indicated that all samples exerted an inhibition, more or less effective, of the edema compared to the control. Thus, the oral administration of 400 mg/kg of methanolic extract of *O. europaea* and *C. azarolus* to mice induced a strong inhibition of paw edema with percentages of 96% and 42.28% respectively. This anti-inflammatory activity was confirmed topically by ear edema test. Therefore, the group treated with topical application of the methanolic extract of *C. azarolus* (0.5mg/ear) presented a significant rate reduction of edema (63.63%). Similarly, the obtained results also indicated that both methanolic extracts (600 mg/kg) of *C.azarolus* and *O.europaea* inhibited the pain caused by acetic acid in mice with percentages of 84.59 and 77.49% respectively. Finally, the cytotoxicity test against *Artemia salina* larvae (Brine shrimp test) showed that the methanolic extracts of both plants had no cytotoxicity against these larvae with LC₅₀ values of 9800 and 10043 μg/mL for *O. europaea* and *C. azarolus* respectively.

Keywords: *Olea europaea*, *Crataegus azarolus*, biological activities, secondary metabolites.

ملخص

تعتبر *Olea europaea* و *Crataegus azarolus* من بين النباتات الطبية المستخدمة للتداوي الشعبي في الجزائر. تهدف هذه الدراسة الى تقدير النشاط المضاد للأكسدة, للميكروبات, للالتهاب, الالام و السمية الخلوية لمختلف مستخلصات نبات الزيتون و الزعرور. اظهر التحليل الكروماتوغرافي للمستخلصات النباتية باستعمال تقنية HPLC و GC عن وجود مركبات فينولية مهمة. بالإضافة الى الجانب الكيميائي الذي يهدف الى تحديد مختلف المسقلبات الثانوية, التقدير الكلي, للبوليفينيات و الفلافونيدات و التحليل الكيميائي للزيوت العطرية. بينت نتائج الفحص الكيميائي عن وجود القلويدات, تانينات, ستيروولات و تريبينات في مختلف المستخلصات النباتية. اما الصابونيات فهي غائبة كليا في مستخلصات نبات الزعرور. كما اظهرت النتائج المتحصل عليها أن مستخلص FAD لنبات الزيتون (276.76 ± 10.25 mg EAG/g) يعتبر الأكثر غنا بالمكونات الفينولية مقارنة بمستخلص FAD لنبات الزعرور (111.96 ± 1.66 mg EAG/g).

كما تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات النباتية بواسطة ثلاثة طرق مختلفة DPPH, FRAP, B-carotene. أظهر النشاط المضاد للأكسدة بواسطة DPPH ان جميع المستخلصات المدروسة تملك قدرة تثبيط عالية للجذور الحرة خاصة مستخلص FAD لنبات الزيتون ($IC_{50} = 4.9 \mu\text{g/ml}$) كما أن مقارنة مختلف مستخلصات نبات الزعرور بينت أن المستخلص FAD هو الأكثر فعالية يليه FED. اما نتائج B-carotene أظهرت نشاط مثبط للأكسدة حمض لبولينك بالنسبة لمختلف المستخلصات خاصة مستخلص FCH (76%). من جهة اخرى اظهرت كذلك طريقة FRAP ان مستخلص نبات الزيتون FAD يملك قدرة ارجاعية كبيرة مقارنة مع باقي المستخلصات.

النشاط المضاد للميكروبات تم تقديره و ذلك باستعمال 6 سلالات بكتيرية و 6 سلالات فطرية. فبينت النتائج ان مختلف مستخلصات اوراق الزيتون تملك فعالية كبيرة لتثبيط نمو الميكروبات حيث ان مستخلصات EM و FCH تعتبر جد فعالة خاصة ضد *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E.coli* حيث يتراوح قطر المنطقة المثبطة حوالي 16 و 26 مم. اما مستخلصات نبات الزعرور فتملك فعالية متوسطة مع معظم السلالات البيكتيرية المدروسة.

اما النشاط المضاد للالتهاب فقد اجري على فئران مخبرية و ذلك لمعرفة فعالية المستخلصات الميثانولية لكل من نبات الزيتون و الزعرور. فقد بينت النتائج ان مستخلصات *Olea europaea* و *Crataegus azarolus* من بين النباتات التي تملك خصائص علاجية بالأخص ضد الالتهاب القدي (400 mg/kg) و ذلك بنسبة 96% و 4% على التوالي. اما نبات الزعرور فيملك قدرة عالية لتثبيط الالتهاب الموضعي و ذلك بنسبة قدرت ب 63.63% عند اقل تركيز. كذلك فقد تم التأكد من فعالية هذه المستخلصات ضد الالام و التشنجات البطنية لدى الحيوانات المخبرية (77.49 و 59% بالنسبة ل *Olea europaea* و *Crataegus azarolus*).

و اخيرا فقد اشارت دراسة السمية الخلوية ضد يرقات *Artemia salina* ان المستخلصات الايثانولية للنبتين المدروستين لا تملك أي سمية ضد هذه اليرقات حيث قدرت LC_{50} ب 10043 et $9800 \mu\text{g/ml}$ بالنسبة لكل من

O. eurpaea et *C. azarolus* على التوالي.

الكلمات المفتاحية: *Olea europaea*, *Crataegus azarolus*, النشاط المضاد للأكسدة, النشاط المضاد للميكروبات النشاط المضاد للالتهاب الالام, السمية الخلوية.