

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
École Normale Supérieure -Kouba- Alger

Département des Sciences Naturelles

N° d'ordre : MAG/ /2016



MÉMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

EN PHYSIOLOGIE ANIMALE

Option : **Biologie cellulaire et moléculaire**

Par

Sofiane GUETTAF

**RECHERCHE D'ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES PLANTES
ENDÉMIQUES DU SAHARA ALGÉRIEN; *GENISTA SAHARAE*
Coss. & Dur. ET *ONONIS ANGUSTISSIMA* Lam. (*FABACEAE*)**

Soutenue publiquement le **15 /03/2016**

Devant le jury d'examen composé de :

M^{me} BAHA Mounia	Professeur	Ecole Normale Supérieure de <i>Kouba</i>	Présidente
M^{me} ABIDLI Nacira	Professeur	Ecole Normale Supérieure de <i>Kouba</i>	Directrice
M^{me} DAHAMNA Saliha	Professeur	Université <i>Ferhat Abbas</i> de <i>Sétif-1-</i>	Examinatrice
M^r RAMDANI Messaoud	Professeur	Université <i>Ferhat Abbas</i> de <i>Sétif-1-</i>	Examinateur

Année Universitaire : 2015 - 2016

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. PLANTES ET MEDECINE	4
1.1. Historique	4
1.2 Les produits naturels des plantes et leurs activités biologiques	4
2. FABACEES	8
2.1. Aspect botanique des Fabacées	8
2.2. Position systématique des Fabacées	9
2.3. Distribution géographique des Fabacées	9
2.4. Etudes chimiques antérieures sur les Fabacées	9
2.5. Utilisation des Fabacées	9
2.6. Toxicité des Fabacées	10
3. PRESENTATION DU GENRE GENISTA.....	10
3.1. Métabolites isolés du genre Génista	10
3.2. L'espèce Génista Saharæ Coss. Et Dur. (Pomel).....	10
3.2.1. Aspect botanique et classification systématique	10
3.2.2. Usage traditionnel.....	11
3.2.3 Etude phytochimique.....	11
3.2.4. Propriétés biologiques reconnues	12
4. PRESENTATION DU GENRE ONONIS.....	13
4.1. Métabolites isolés du genre Ononis	13
4.2. L'espèce Ononis Angustissima Lam. (Sirdj).....	14
4.2.1. Aspect botanique et classification systématique	14
4.2.2. Usage traditionnel.....	15
4.2.3. Etude phytochimique.....	15
4.2.4. Propriétés biologiques reconnues	15
5. STRESS OXYDANT	17
5.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	17
5. 2. Conséquences biologiques du stress oxydant	19
5. 3. Implications pathologiques du stress oxydant	21
5. 4. Antioxydants	21

6. INFLAMMATION	23
6.1. Inflammation aiguë.....	23
6.2. Inflammation chronique	24
6.3. Signes cardinaux de l'inflammation	25
6.4. Cellules inflammatoires.....	27
6.5. Médiateurs inflammatoires.....	27
6.6. Anti-inflammatoires	28
7. TOXICITÉ	31
7.1. Substances toxiques	32
7.2. Effet toxique	32
7.3. Formes d'intoxication.....	33

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL	36
1.1. Matériel végétal.....	36
1.2. Animaux	36
1.3. Réactifs chimiques et équipements	37
2. METHODES	37
2.1. Étude phytochimique	37
2.1.2. Préparation des extraits végétaux aqueux bruts.....	37
2.1.3. Screening phytochimique	38
2.2. Étude de l'activité biologique	44
2.2.1. Évaluation de l'activité antioxydante in vitro.....	44
2.2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro	46
2.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	47
2.2.4. Évaluation de l'activité analgésique	49
2.2.5. Étude toxicologique	51
2.3. Analyses statistiques	52

RESULTATS

1. Étude phytochimique	53
1.1. Rendement d'extraction.....	53

1.2. Mise en évidence des composés phytochimiques	53
1.3. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins	54
1.4. Dosage des caroténoïdes	54
2. Étude de l'activité biologique	55
2.1. Évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	55
2.1.1. Effet piègeur du radical libre DPPH*	55
2.1.2. Pouvoir réducteur	57
2.1.3. Test de blanchissement du β carotène	59
2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	60
2.2.1. Test d'inhibition de la dénaturation des protéines.....	60
2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	61
2.3.1. Administration des extraits par gavage : (Xylene-induced ear edema).....	61
2.3.2. Administration des extraits par voie topique : (Xylene-induced topical edema)	64
2.4. Évaluation de l'activité analgésique.....	67
2.4.1. Test de contorsions dorsoabdominales : (Writhing test)	67
2.5. Étude toxicologique	72
2.5.1. Étude de la toxicité aiguë par l'essai limite	72
DISCUSSION	
1. Préparation des extraits et rendement de l'extraction.....	74
2. Mise en évidence des composés chimiques.....	75
3. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins caroténoïdes	77
4. Activité antioxydante.....	80
5. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	85
6. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	86
7. Activité analgésique	90
8. Etude toxicologique	92
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	96
ANNEXES	115

Liste des figures

- Figure 1.** Effets biologiques des polyphénols
- Figure 2.** Photographie montrant l'aspect morphologique de la plante *Génista Saharæ*
- Figure 3.** Photographie montrant l'aspect morphologique de la plante *Ononis Angustissima*
- Figure 4.** Principales circonstances pathologiques accompagnant le stress oxydant
- Figure 5.** Etapes de l'inflammation aigue
- Figure 6.** Médiateurs cellulaires et biochimiques de l'inflammation
- Figure 7.** Cascade de l'acide arachidonique et sites d'action des anti-inflammatoires
- Figure 8.** Mécanisme d'action des glucocorticoïdes
- Figure 9.** Cheminement d'un toxique
- Figure10.** Protocole de préparation de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Génista Saharæ* et *Ononis Angustissima* par décoction
- Figure11.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique(A), de la quercétine(B) et de l'acide tannique(C)
- Figure 12.** La forme radicalaire et la forme réduite de DPPH
- Figure 13.** Photographies des différentes étapes du test analgésique
- Figure 14.** Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux de *Génista Saharæ* et d'*Ononis Angustissima* et de l'antioxydant de référence (BHT) vis-à-vis du radical DPPH
- Figure 15.** Pouvoir réducteur des extraits aqueux de *Génista Saharæ* et d'*Ononis Angustissima* et du BHT
- Figure 16.** Cinétique de blanchissement du β -carotène à 470 nm en présence et en absence des extraits aqueux de *Génista Saharæ*, d'*Ononis Angustissima*, du BHT et du BHA
- Figure 17.** Activité antioxydante des extraits aqueux de *Génista Saharæ*, d'*Ononis Angustissima*, de BHT et de BHA dans le système β -carotène/acide linoléique
- Figure 18.** Effet des extraits aqueux de *Génista Saharæ* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris (Administration orale)
- Figure 19.** Effet des extraits aqueux d'*Ononis Angustissima* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris (Administration orale)
- Figure 20.** Effet des extraits aqueux de *Génista Saharæ* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris (Administration topique)
- Figure 21.** Effet des extraits aqueux d'*Ononis Angustissima* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris (Administration topique)

Figure 21. Effet des extraits aqueux d'*Ononis Angustissima* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris

Figure 22. Cinétique de contorsions dorso-abdominales en présence et en absence d'extrait aqueux de *Génista Saharæ* et d'ASA durant 30 minutes de temps

Figure 23. Effet analgésique de l'extrait aqueux de *Génista Saharæ* induit chez la souris

Figure 24. Cinétique de contorsions dorso-abdominales en présence et en absence d'extrait aqueux d'*Ononis Angustissima* et d'ASA durant 30 minutes de temps

Figure 25. Effet analgésique de l'extrait aqueux d'*Ononis Angustissima* induit chez la souris

Figure 26. Principaux éléments de l'activité antioxydante des flavonoïdes

Liste des tableaux

Tableau 1. Quelques exemples des principaux médicaments d'origine végétale de produits naturels

Tableau 2. Espèces réactives de l'oxygène

Tableau 3. Formes d'intoxication

Tableau 4. Classes de toxicité selon l'échelle de Diezi chez les souris de laboratoire

Tableau 5. Analyse phytochimique préliminaire des extraits aqueux de *Génista Saharæ* et d'*Ononis Angustissima*

Tableau 6. Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins des extraits aqueux de *Génista Saharæ* et d'*Ononis Angustissima*

Tableau 7. Teneur en β carotène et en lycopène des extraits aqueux de *Génista Saharæ* et d'*Ononis Angustissima*

Tableau 8. Valeurs des IC₅₀, EC₅₀ et PAR des extraits aqueux de *Génista Saharæ* et d'*Ononis Angustissima* et du BHT

Tableau 9. Les EC₅₀ des extraits de *Génista Saharæ* et d'*Ononis Angustissima* et du BHT

Tableau 10. Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à la concentration de 250 μ g/ml

Tableau 11. Effet analgésique de l'EAG et de l'ASA sur le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique chez la souris

Tableau 12. Effet analgésique de l'EAO et de l'ASA sur le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique chez la souris

Tableau 13. Taux de mortalité de souris traités exprimé en nombre d'individu/5 animaux traités

Liste des Abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS : Anti-inflammatoires stéroïdien
ALS : Sclérose latéral amyotrophique
ARDS : Syndrome de détresse respiratoire aigue
ARN : Acide Ribo Nucléique
ATCC : American Type Culture Collection
CAT : Catalase
CBP : Cyclic AMP Response Element Binding Protein
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide
CMC : Carboxy méthyl cellulose
COX : Cyclooxygenase
DL50 : Dose létale de 50% de la population
DPPH : Diphényl Picryl Hydrazyle
EAG : Extrait aqueux de Génista Saharæ
EAO : Extrait aqueux d'Ononis Angustissima
ERA : Espèces réactives azotées
ERO : Espèces réactives oxygénées
GPX : Glutathion peroxydase
GR : Glucocorticoid Receptor
GRE : Glucocorticoid Response Element
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
HAT : Histone Acetyltransferase
HNE : 4- hydroxy nonenal
HPLC-MS : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance-Spectrométrie de Masse
IL : Interleukine
LDL : Light Density Lipoprotein
LO : Lipooxygénases
LTB4 : Leucotriène B4
MDA : Malondialdéhyde
NADH : Nicotinamide adénine
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NGF : Nerve Growth Factor
NO : Oxyde Nitrique
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PGE : Prostaglandine E
PGH2 : Prostaglandine H2
PKC : Protéine Kinase C
PMNs : Polymorphonucléaires neutrophiles
Rx : Rayons X
SH : Sulf-Hydrile
Sida : Syndrome d'immunodéficience acquise
SOD : Superoxyde dismutase
SP : substance P
TGF : Transforming Growth Factor
TNF- α : Facteur de nécrose tumorale
TPA : 12-O-tetradecanoyl phorbol acetate
UV : Ultra-Violet
XO : Xanthine Oxydase

ملخص

بهدف اكتشاف مكونات جديدة من مصادر طبيعية، قمنا بدراسة المستخلص المائي للنبتين مستوطنتين في الصحراء الجزائرية وهما *Ononis Angustissima Lam.* و *Génista Saharæ Coss. Et Dur.* .
اولا، قمنا بالاستخلاص بواسطة الإغلاء، ثم قمنا بالكشف النوعي والكمي عن وجود مختلف المركبات البيوكيماوية النشطة. كشف التحليل النوعي عن وجود الفينولات، الفلافونويدات، الدباغ، التريانويدات، الستيرويدات، المركبات المرجعة والصابونينات في كلي المستخلصين، في حين أن المركبات شبه قلوية توجد فقط في المستخلص المائي لـ *Génista Saharæ* .
من جهة أخرى، بين التحليل الكمي للمركبات الثانوية، غنى كلي المستخلصين *G Saharæ* و *O. Angustissima* .
بالمركبات الفينولية، حيث يقدر المحتوى بـ 130 و 118 مغ معادل لحمض الغاليك/غ من المستخلص على التوالي.
ثانيا، قمنا بتقييم القدرة المضادة للأوكسدة. أظهرت النتائج أن كلي المستخلصين يمتلكان قدرة معتبرة على تبييض البيتا كاروتين ، حيث تقدر بـ 77 و 54% على التوالي. هذه النتائج مشابهة لتلك المتحصل عليها مع مضادات الأوكسدة المرجعية .
ثالثا، أظهرت دراسة النشاط المضاد للإلتهاب مخبريا، أن المستخلص المائي لـ *G.Saharæ* له قدرة معتبرة على تثبيط تخريب البروتينات بنسبة 63 % ، هذه النسبة قريبة لتلك المتحصل عليها مع مضادات الالتهاب المرجعية. من ناحية أخرى، اتضح أن المعالجة عن طريق الفم بالمستخلص المائي لـ *G.Saharæ* بجرعة 400 مغ/كلغ تثبط الوذمة المسببة بواسطة *Xylène* عند الفأر بنسبة 61 % ، في حين أن المعالجة الموضعية بالمستخلص المائي لـ *O.Angustissima* بجرعة 20 مغ/أذن تثبط الوذمة بنسبة 53 % . لا يوجد فرق ذات دلالة إحصائية بين هذه القيم والقيم المتحصل عليها مع مضادات الالتهاب المرجعية .

رابعا، قمنا بدراسة النشاط المسكن للألم بواسطة اختبار التشنجات المسببة بواسطة حمض الخل. أظهرت النتائج أن العلاج عن طريق الفم بالمستخلص المائي لـ *G.Saharæ* بجرعة 400 مغ/كلغ تثبط معنويا التشنجات البطنية ، حيث أن قيمة التثبيط تكون أعلى من تلك المتحصل عليها مع مسكن الألم المرجعي (92 و 73% على التوالي). من ناحية أخرى، وجد أن المستخلص المائي لـ *O.Angustissima* أيضا يمارس نشاط مسكن للألم متعلق بالجرعة.
في الأخير، تمت دراسة السمية الحادة لمدة 14 يوماً، حيث تبين أن معالجة الفئران عن طريق الفم بكلا المستخلصين بجرعة 5000 مغ/كلغ تظهر فقط بعض أعراض السمية الضعيفة جداً . الجرعة القاتلة لـ 50 % من الفئران لكلتي النبتتين تفوق 5 غ/كلغ ($DL_{50} > 5000 \text{ mg/kg}$)، هذه المعطيات تسمح بتصنيف النبتتين في خانة النباتات غير السامة. كشفت مجمل النتائج تأثيرات دوائية جديدة لم يتم ذكرها في أدبيات الطب الجزائري التقليدي.

في الختام، المستخلص المائي لـ *Ononis Angustissima* و *Génista Saharæ* يتميز بخصائص علاجية هامة، ما يدعم استعمالهما في الطب التقليدي، حيث لا تزال هناك حاجة أن إجراء المزيد من الدراسات.

الكلمات المفاتيح : *Génista Saharæ, Ononis Angustissima* ، نشاط مضاد للأوكسدة ، نشاط مضاد للإلتهاب ، نشاط مسكن للألم ، السمية الحادة .

Résumé

Dans le cadre de la découverte de nouveaux principes actifs à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de la fraction aqueuse de deux plantes endémique du Sahara Algérien ; *Génista Saharae* Coss. & Dur. Et *Ononis Angustissima* Lam. La première partie de cette étude concerne l'extraction par décoction, la mise en évidence des différents composés chimiques et la quantification des phénols totaux, flavonoïdes, tannins et caroténoïdes. L'examen phytochimique qualitatif a montré la présence des phénols, flavonoïdes, tannins, terpénoïdes, stéroïdes, composés réducteurs et saponines dans l'extrait aqueux de *Génista Saharae* (EAG) et celui d'*Ononis Angustissima* (EAO). Cependant, les alcaloïdes étaient présents uniquement dans l'EAG. Le dosage des métabolites secondaires a montré la richesse de l'EAG et de l'EAO en composés phénoliques avec une teneur de 130 et 118 mg équivalent d'acide gallique /gramme extrait, respectivement. La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'activité antioxydante. Les résultats montrent que l'EAG et l'EAO ont inhibé la peroxydation couplée de l'acide linoléique/ β -carotène à 77 et 54%, respectivement. Ces valeurs sont proches de celles des antioxydants standards utilisés. La troisième partie consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*. Les résultats d'inhibition de la dénaturation des protéines par l'EAG montrent un pourcentage de 63 %. Cette valeur est proche de celle obtenue par l'anti-inflammatoire de référence. Le prétraitement oral par 400 mg/Kg de l'EAG a inhibé l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris avec 61 %. D'autre part, le prétraitement topique par 20 mg/oreille de l'EAO a inhibé l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris avec 53 %. La différence entre ces deux dernières valeurs et le taux d'inhibition exercé par les anti-inflammatoires de référence est statistiquement non significative. La quatrième partie est destinée à l'évaluation de l'activité analgésique *in vivo* par le test de contorsions. Les résultats montrent que l'administration orale de l'EAG à 400 mg/Kg inhibe significativement les crampes dorsoabdominales induites par l'acide acétique. Cette inhibition est supérieure de celle exercée par l'antalgique de référence (92 et 73%, respectivement). En outre, l'EAO a exercé à son tour une activité analgésique concentration-dépendante, mais inférieure à celle de l'EAG. En fin, l'évaluation de la toxicité aiguë est réalisée sur des souris en suivant les signes de toxicité pendant 14 jours. L'administration orale de 5000 mg/ Kg de l'EAG et de l'EAO a montré la présence de quelques symptômes reflétant une très faible toxicité. La DL₅₀ déterminée par l'essai limite était supérieure à 5 g/Kg (DL₅₀ > 5000 mg/kg). Ces données permettent de classer ces deux plantes dans la catégorie des plantes non toxiques dont l'administration orale est sûre. L'ensemble des résultats a mis en évidence des nouveaux effets pharmacologiques qui n'ont pas été évoqués par la littérature de la médecine traditionnelle Algérienne. En conclusion, l'EAG et l'EAO montrent des effets pharmacologiques intéressants qui justifient leur utilisation dans la médecine traditionnelle algérienne et que des études complémentaires restent nécessaires.

Mots clés : *Génista Saharae*, *Ononis Angustissima*, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité analgésique, toxicité aiguë.

Abstract

As part of the discovery of new active ingredients from natural sources, we were interested in this work to the study of the aqueous fraction of two endemic plants of the Algerian Sahara ; *Genista Saharae* Coss. & Dur. and *Ononis Angustissima* Lam. The first part of this study concerns the extraction by decoction, highlighting different components and quantification of total phenols, flavonoids, tannins and carotenoids. The qualitative phytochemical assays showed the presence of phenols, flavonoids, tannins, terpenoids, steroids, saponins and glycosides in aqueous extract of *Genista saharae* (AEG) and that of *Ononis angustissima* (AEO). However, the alkaloids were present only in the AEG. The dosage of secondary metabolites showed the richness of the EAG and EAO in phenolics with a content of 130 and 118 mg of gallic acid equivalent / gram of extract, respectively. The second part is devoted to the study of the antioxidant activity. The results show that both extracts inhibited coupled peroxidation of linoleic acid / β -carotene with 77% and 54% respectively. These values are close to those of standard antioxidants used. The third part is to assess the anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*. The results of inhibition of protein denaturation by AEG show a percentage of 63%. This value is close to that obtained by the referencial anti-inflammatory. Oral pretreatment with 400 mg / Kg of AEG inhibited ear edema induced by xylene in mice with 61%. On the other hand, the topical pretreatment with 20 mg / ear AEO inhibited ear edema induced by xylene in mice with 53%. The difference between these last two values and the degree of inhibition exerted by the referencial anti-inflammatory is statistically insignificant. The fourth part is intended for evaluating the analgesic activity *in vivo* by Writhing test. The results show that oral administration of 400 mg / kg of AEG, suppresses significantly dorsoabdominales cramps induced by acetic acid. This inhibition is greater than that exerted by the referencial analgesic (92% vs 73%, respectively). In addition, AEO exercised to his turn analgesic concentration-dependent activity, but lower than that of the AEG. In the end, the evaluation of acute toxicity is performed on mice following signs of toxicity for 14 days. Oral administration of 5000 mg / Kg of the EAG and the EAO has shown the presence of some symptoms reflecting a very low toxicity. The LD50 determined by the limit test was greater than 5 g / kg (LD50 > 5000 mg / kg). The overall results revealed new pharmacological effects that have not been mentioned in the literature of traditional Algerian medicine. In conclusion, the EAG and the EAO show interesting pharmacological effects that justify their use in Algerian traditional medicine and that further studies are still needed.

Keywords : *Génista Saharae*, *Ononis Angustissima*, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, analgesic activity, acute toxicity.