

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTRE DE

L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI. CONSTANTINE 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Ecologie Végétale



N° d'ordre : 15/DS/2018

N° de série : 01/BIO/2018

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Option

Biotechnologie Végétale

Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques de *Cleome arabica*

Soutenue publiquement

Par

MADI AICHA

Devant le jury :

Président : KHELIFI DOUADI	Prof	Université Des Frères Mentouri. Constantine1
Encadreur : BELKHIRI ABDELMALIK	Prof	Université Salah Boubnider. Constantine 3
Examineurs :		
AKKAL SALAH	Prof	Université Des Frères Mentouri. Constantine1
YAHIA AABDELOUAHEB	Prof	Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf. Mila
ZELLAGUI AMAR	Prof	Université Larbi Ben M'hidi. Oum El Bouaghi
MOUAS TOUMA NAJDJES	MCA	Université Des Frères Mentouri. Constantine1

Année universitaire 2017 /2018

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes vifs remerciements et ma reconnaissance à Mr. BELKHIRI ABDELMALIK, Professeur à l'université 3 de Constantine, qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique. La qualité de ses conseils et son soutien m'ont permis de réaliser la présente étude dans les meilleures conditions.

Ma gratitude et mes sincères remerciements à mon maitre Mr. KHELIFI DOUADI Professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine1, d'être toujours disponible par ses conseils importants et par ses aides précieuses depuis le magistère, et d'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse qu'il trouve ici mes expressions de reconnaissance les plus sincères et profondes.

Je souhaite également remercier Professeur AKKAL SALAH, Professeur YAHIA ABDELOUAHAB et Professeur ZELLAGUI AMAR d'avoir aimablement accepté de faire partie du jury et d'examiner cette thèse.

Un grand merci à Madame MOUAS TOUMA NARDJES, Maitre de Conférence à l'Université des Frères Mentouri Constantine1, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.

Ma vive reconnaissance et gratitude à Madame DR. MARIA TERESA, DR. MONTSERRAT et DR. JULIAN C. RIVAS GONZALO de m'avoir accueillis dans leur laboratoire.

Je n'oublie pas de remercier tous les chercheurs et le directeur du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, institut des sciences vétérinaires. Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

Dédicace

Ma gratitude et ma vive reconnaissance à mes parents que dieu protège, pour leurs soutiens, présences et encouragements durant toutes les longues années d'étude. Merci d'être toujours à mes cotés, ce qui m'a permis de surmonter beaucoup d'obstacles dans ma vie professionnelle et personnelle.

Un grand amour pour toi mon ange MED IYAD que Dieu te protège pour moi, ta présence dans ma vie m'a donné beaucoup de bonheur, courage et volonté, je t'aime mon fils.

Un grand merci à mes frères Med amine & Med cherif, mes sœurs Zahra, Meriem, & Samssouma, mes belles sœurs Rokia & Nesrine, sans oublier mon cher ISLEM, et toute ma famille pour leurs gentilleses et soutiens.

Un grand merci plein d'amour s'adresse également à toutes mes chères amies pour leurs soutiens, encouragements et amours, sans oublier mes collègues.

Je voudrais en fin exprimer ma sincère reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin tout au long de cette période pour leurs aides précieuses, encouragements, et sympathies.

Sommaire

Remerciements	I
Dédicace	II
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	IX

Introduction	1
---------------------------	---

Partie Revue bibliographique

Chapitre 1 : Présentation de la plante <i>Cleome arabica</i>	3
1- Description.....	3
2- Classification systématique.....	4
3- Usage ethnobotanique	5
4- Travaux antérieurs sur le genre <i>Cleome</i>	5
4-1 Constituants chimiques.....	5
4-2 Activités biologiques.....	8
Chapitre 2 : Généralités sur les composés phénoliques	9
1- Définition.....	9
2- Structure et catégories des composés phénoliques	10
2- 1 Acides phénols.....	11
2- 2 Flavonoïdes.....	13
2- 3 Tanins.....	15
3- Biosynthèse des composés phénoliques.....	17
3-1 Biosynthèse des acides phénols.....	17
3-2 Biosynthèse des flavonoïdes	18
4- Polyphénols dans les plantes : Localisation et intérêt.....	20
5- Polyphénols et activités biologiques.....	21
5- 1 Activite antioxydante.....	21
5- 2 Polyphénols et cancer.....	26
5- 3 Polyphénols et maladies cardiovasculaires.....	27
5- 4 Polyphénols et inflammation.....	28
6- Méthodes d'analyse des composés phénoliques.....	29

Chapitre 3 : Activités biologiques, généralités et évaluation	31
1- Méthodes d'évaluation du pouvoir antiradicalaire et antioxydant.....	31
2- Généralités sur la toxicité.....	33
3- L'évaluation de l'effet antalgique.....	35
4- Généralités et méthode d'évaluation de la cicatrisation des plaies.....	36
4-1 Définition.....	36
4-2 Les différentes phases de la cicatrisation.....	36
4-3 Méthodes d'étude de la cicatrisation.....	41
Partie Matériel & Méthodes	
I- Matériel végétal.....	44
II- Méthodes.....	44
Chapitre 1 : Caractérisation phytochimique	44
1- Rendement de l'extraction hydroalcoolique.....	44
2- Méthode d'extraction.....	44
3- Screening et réactions chimiques.....	45
4- Dosage spectrophotométrique.....	47
5- Analyse par chromatographie liquide a haute performance (HPLC/DAD/MS).....	48
Chapitre 2 : Activités biologiques	50
1- Activités antioxydantes.....	50
2- Activités Pharmacologiques et Toxicologique.....	54
2- 1 Toxicité aigue.....	54
2- 2 Toxicité larvicide sur les larves <i>Artemia salina</i>	57
2- 3 Etude de l'effet hémolytique des extraits de <i>Cleome arabica</i>	60
2- 4 Détermination de l'activité antalgique.....	61
2- 5 Effet de la cicatrisation chez le lapin.....	64
Analyse statistique	65
Partie Résultats & Discussion	
1- Rendement de l'extraction par l'éthanol.....	66
2- Screening phytochimique.....	66
3- Dosage spectrophotométrique.....	67
4- Analyse HPLC/DAD/MS.....	70
5- Activités antioxydantes.....	79

5-1	Activité antioxydante par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH).....	79
5-2	Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	81
5-3	Evaluation de l'activité antioxydante par le phosphomolybdate.....	82
5-4	Corrélation entre les contenus en Phénols et flavnoïdes vis-à-vis l'activité antioxydante.....	83
6-	Toxicité aigue.....	85
6-1	Toxicité par voie orale.....	85
6-2	Toxicité aigue par voie Intra-péritonéale (IP).....	88
7-	Toxicité larvicide sur les larves <i>Artemia salina</i>	91
8-	Cytotoxicité hémolytique.....	94
9-	Activité antalgique.....	98
9-1	Test tail-flick.....	98
9-2	Test de la plaque chauffante.....	100
9-3	Test de torsion (acide acétique).....	103
10-	Effet cicatrisant de <i>C. arabica</i>	107
10-1	Plaies de brûlures thermiques.....	107
10-2	Effet cicatrisant sur les plaies d'excision.....	111
	Conclusion générale	116
	Références bibliographiques	120

Liste des tableaux

Tab 1: Classification systématique de <i>Cleome arabica</i>	4
Tab 2: Usage ethnobotanique du genre <i>Cleome</i>	5
Tab 3: Travaux antérieurs sur les composés identifiés du genre <i>Cleome</i>	6
Tab 4: Les activités biologiques du genre <i>Cleome</i>	8
Tab 5: Les principales classes des composés phénoliques.....	10
Tab 6: Structures des différentes classes de flavonoïdes	14
Tab 7: Méthodes d'analyse, avantages et inconvénients	29
Tab 8: Tests antioxydants <i>in vitro</i>	32
Tab 9: Les standards et leurs courbes d'étalonnage.....	50
Tab 10: Estimation de la toxicité.....	60
Tab 11: Rendement de l'extraction hydroalcoolique	66
Tab 12: profil phytochimiques des différents extraits de <i>C. arabica</i>	66
Tab 13: Quantification des phénols totaux, flavonoïdes, et proanthocyanidines.	69
Tab 14: Résultats analyse HPLC/DAD/MS de l'extrait des feuilles de <i>C.arabica</i>	72
Tab 15: Résultats HPLC/DAD/MS de l'extrait des graines de <i>C. arabica</i>	74
Tab 16: Résultats HPLC/DAD/MS de l'extrait des racines de <i>C. arabica</i>	77
Tab 17: Les valeurs d'IC50 des différents extraits.	80
Tab 18: Les valeurs d'IC50 des différents extraits.	82
Tab 19: Taux des antioxydants par le phosphomolybdate.	83
Tab 20: Corrélation entre les phénols totaux, les flavonoïdes et les activités antioxydantes. .	84
Tab 21: Evolution du poids corporel des animaux en Kg.	86
Tab 22: Gain du poids par lot, exprimé en Kg et en pourcentage.	87
Tab 23: Evolution du poids corporel des animaux en Kg.....	89
Tab 24: Gain du poids par lot.....	90
Tab 25: Evolution de la mortalité après 24 heures	91
Tab 26: Valeurs des CL50 après 24H.....	93
Tab 27: Taux d'hémolyse par concentration.	94
Tab 28: Les valeurs des IC50 correspondent à 50% d'hémolyse.....	96
Tab 29: Temps de réaction et le pourcentage d'inhibition de l'extrait.....	99
Tab 30: Temps de réaction et le pourcentage d'inhibition de l'extrait.....	101
Tab 31: Nombre de torsion et le pourcentage d'inhibition de l'extrait.	103
Tab 32: Pourcentage d'évolution de contraction des plaies.....	107
Tab 33 : Présentation des résultats des plaies Brûlures thermiques.	108
Tab 34: Evolution des plaies d'excision exprimée en pourcentage de contraction.	111
Tab 35: Description des résultats des plaies d'excision.	111

Liste des figures

Fig 1: <i>Cleome arabica ssp arabica</i>	4
Fig 2: Structure d'acides hydroxybenzoïques communs.....	11
Fig 3: Structure d'acides hydroxycinnamiques communs.....	12
Fig 4: Structure générale des flavonoïdes.....	13
Fig 5: Exemple tannins hydrolysables.....	16
Fig 6: Exemple tannins condensés.....	16
Fig 7: Biosynthèse des flavonoïdes.....	19
Fig 8: les flavonoïdes et leurs sites de chélation des ions métalliques (Mn+).....	25
Fig 9: Ordre séquentiel des phases de la cicatrisation	37
Fig 10: Lors d'une blessure	37
Fig 11: Phase vasculaire	38
Fig 12: Phase inflammatoire	39
Fig 13: Phase de remodelage	41
Fig 14: La formule du DPPH.....	51
Fig 15: Réaction du radical DPPH avec un phénol.....	51
Fig 16: Administration de l'extrait par la sonde.....	55
Fig 17: Administration de l'extrait par voie intrapéritonéale (IP).....	56
Fig 18: Culture des larves d' <i>Artemia salina</i>	58
Fig 19: Plaque de 24 puits contenant les larves et des différents extraits.....	59
Fig 20: Les larves sous microscope.....	59
Fig 21: Courbe d'étalonnage des acides phénols totaux.....	68
Fig 22: Courbe d'étalonnage des Flavonoïdes.....	68
Fig 23: Chromatogramme de l'extrait des feuilles à 280 nm.....	71
Fig 24: Chromatogramme de l'extrait des feuilles à 370 nm.....	71
Fig 25: Chromatogramme d'extrait des graines à 280nm.....	73
Fig 26: Chromatogramme d'extrait des graines à 370 nm.....	73
Fig 27: Chromatogramme d'extrait des racines à 280 nm.....	76
Fig 28: Chromatogramme d'extrait des racines à 370 nm.....	76
Fig 29: Le pourcentage d'inhibition de DPPH	80
Fig 30: Pouvoir réducteur FRAP des feuille, graine, et racine.....	81
Fig 31: Evolution du poids corporel.....	87
Fig 32: les organes pesés après sacrifice des rats.....	88

Fig 33: Evolution du poids corporel des animaux.	89
Fig 34: Evolution de la mortalité après 24H.	92
Fig 35: Courbes des CL50 après 24 heures.	92
Fig 36: Evolution du taux d'hémolyse.	95
Fig 37: Courbes des IC50 de l'hémolyse.	95
Fig 38: Gavage de l'extrait.	98
Fig 39: Immersion de la queue à 55°C.	98
Fig 40: Relation dose-dépendante de test tail-flick.	100
Fig 41: Gavage de l'extrait	101
Fig 42: Rat sur la plaque chauffante à 55°C.	101
Fig 43: Relation dose-effet par le test plaque chauffante.	102
Fig 44: Injection IP de l'acide acétique.	103
Fig 45: La crampe.	103
Fig 46: Relation dose-effet par le test de torsion.	104
Fig 47: Progression de la cicatrisation des plaies de brûlures thermiques	109
Fig 48: Evolution de la contraction des plaies des brûlures thermiques.	110
Fig 49: Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision chez le model lapin. ..	112
Fig 50: Evolution de la contraction (%) des plaies d'excisions.	113

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

Abs : Absorbance.

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ANOVA : Analysis of variance.

CCM : Chromatographie couche mince.

CL : Concentration létale.

CRL : Groupe control.

DO : Densité optique.

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl.

EAG : Equivalent d'acide gallique.

EC50 : Concentration effective à 50%.

ED : Dose effective.

EQ : Equivalents de quercétine.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

ETH : Ethanolique.

EXT : Extrait.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power.

GC : Chromatographie phase gazeuse.

HPLC : High performance liquid chromatography.

HPLC/DAD : High-Performance Liquid Chromatography / Diode-Array Detection.

I.A.S.P : International Association for the Study of Pain.

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%.

LC-MS : Chromatographie liquide – Spectrométrie de masse.

LDL : Lipoprotéines de faible densité.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity.

PC : Poids Corporel.

PBS : Phosphate Buffer Saline.

RL : Radicaux libres.

TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity.

TPTZ : 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine.

Tr : Temps de rétentions.

UV : Ultra-violet

Introduction

Actuellement, un grand intérêt est porté à l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales dans le cadre des soins de santé. Toutefois, cette utilisation demeure informelle en Algérie pour deux raisons. La première a trait à l'absence d'un cadre juridico-réglementaire encadrant utilisation des plantes médicinales traditionnelle et la phytothérapie. La seconde raison est l'absence d'éléments scientifiques validant l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales traditionnelles.

Le thème de recherche abordé est en relation avec le second aspect. L'espèce désertique *Cleome arabica* connue sous l'appellation de « Natten » est couramment utilisée dans le traitement de l'inflammation, et les douleurs abdominales et rhumatismales, et comme cicatrisant (Boulos., 1983, Ahmad *et al.*, 1990, Tschritzis *et al.*, 1993, Baba Aissa., 2011). Peu d'études scientifiques ont été réalisées sur cette espèce, seules les feuilles ont fait l'objet d'exploration, où la présence de flavonoïdes à diverses génines a été signalée.

Sur le volet pharmacologique, des activités antioxydante, anticancéreuse et insecticide (El-Mougy *et al.*, 1991, Ladhari *et al.*, 2013, Tigrine *et al.*, 2013) ont été reportées .

Le but ultime de cette étude est d'approfondir les connaissances chimiques et pharmacologiques sur cette plante importante. Deux objectifs spécifiques sont fixés :

- Caractérisation quantitative du contenu en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes, tanins) dont les différentes parties de la plante (feuilles, graines, et racines), complétée par une analyse HPLC/DAD/MS.
- Evaluation *in vivo* et/ou *in vitro* des activités biologiques (antioxydante, analgésique, cicatrisante) et du potentiel toxique (toxicité aigue, cytotoxicités).

Le manuscrit est organisé en trois grandes parties :

La première partie comprend 03 chapitres, traitant de l'état de connaissances de la littérature sur *C. arabica* (phytochimie, bio-activités, usages traditionnels), des

aspects biochimiques et structuraux des composés phénoliques, ainsi que leurs propriétés biologiques. Cette partie est complétée par une description sommaire des méthodes d'analyses spectrophotométriques et chromatographiques utilisées dans la caractérisation et le dosage de ce type de produits naturels, ainsi qu'une revue des principales techniques expérimentales utilisées dans l'évaluation des activités biologiques abordées dans cette étude.

La deuxième partie décrit le matériel et l'ensemble des méthodes utilisées dans la partie pratique de cette étude.

La troisième et dernière partie est consacrée aux résultats obtenus, leur discussion et interprétation.

Une conclusion générale suivie des références bibliographiques sont situées en fin du manuscrit.

Chapitre 1 : Présentation de la plante *Cleome arabica*

1- Description

La plante *C. arabica* est une herbe verte, brièvement poilue, glanduleuse, visqueuse, et annuelle de 30 à 50 cm de hauteur, à tiges dressées et ramifiées, feuilles trifoliolées, fruit allongé en silique s'ouvrant par 2 valves, graines revêtues de poils aussi longs que le diamètre de la graine (Ozenda., 1991).

La fleur possède un calice à 4 sépales, 4 pétales (brun pourpre ou jaunes bordés de brun-pourpre), 6 étamines (ou 4 ovaires à 1 loge, portés par un pied court ou nul) (podogyne), la capsule est de plus de 20 mm de long stipitée, siliquiforme, à 2 valves se séparant des placentas.

Cette plante appartient à la famille des Capparidacées, son nom *Cléome* vient du grec 'kleio' qui signifie entourer. Localement, Elle est dénommée « **Netten** » et « **Netteina** » en référence à l'odeur nauséabonde que dégage la plante (Quezel & Santa., 1963, Baba Aissa., 2000).

Cette espèce septentrionale pousse au Maghreb et dans les régions sahariennes, commune dans la Hodna (M'sila) et dans quelques régions du Sahara algérien : *C. arabica ozenda* (Beniston., 1984, Ozenda., 1991, Tigrine., 2013). Le genre de *Cleome* contient environ 250 espèces (Wollenweber & Dorr., 1992).

La figure 1 présente des images réelles de l'espèce de cette étude *C. arabica*.

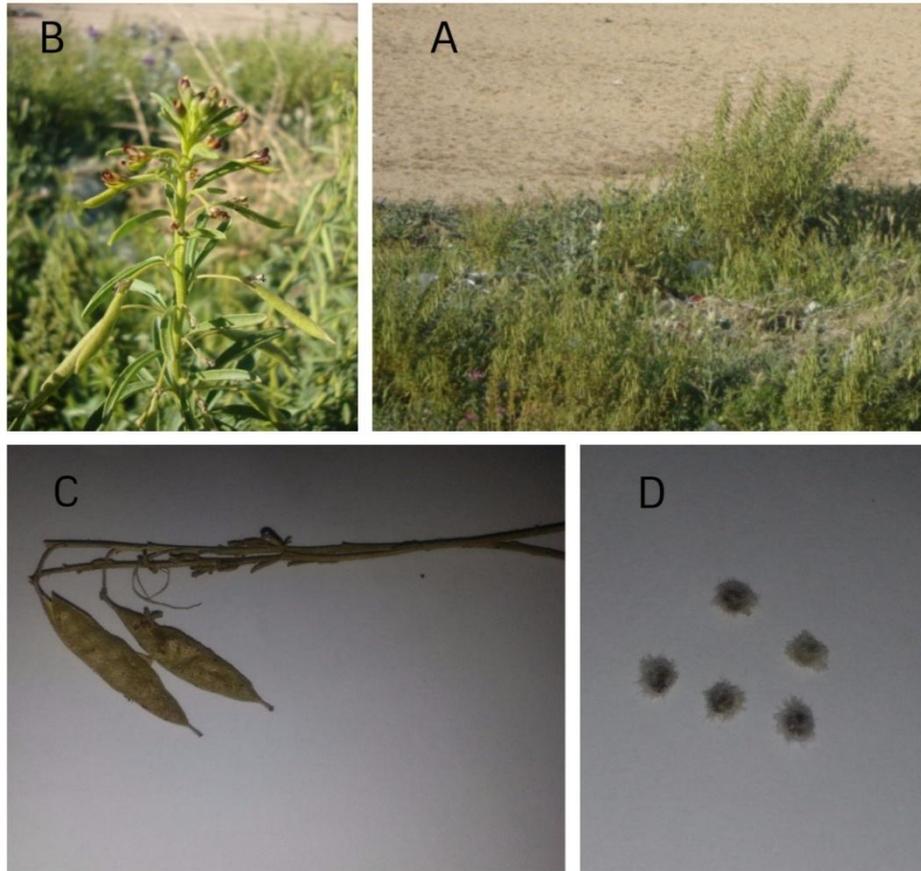


Fig 1: *Cleome arabica ssp arabica*

A : Plante entière ; B : Partie aérienne ; C : Gousse ; D : Graines

2- Classification systématique

La classification de la plante présentée dans le tableau 1 est faite selon Quezel & santa., (1963).

Tab 1: Classification systématique de *Cleome arabica*.

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Pariétales
Famille	Capparidacées
Genre	<i>Cleome</i>
Espèce	<i>Cleome arabica</i> L
Sous espèce	<i>Arabica</i>

3- Usage ethnobotanique

Le tableau 2 ci-dessus récapitule toutes les utilisations traditionnelles de différentes espèces du genre *Cleome* citées dans plusieurs travaux.

Tab 2: Usage ethnobotanique du genre *Cleome*.

Utilisation traditionnelle du genre <i>Cleome</i>	Référence
Agent Sédatif ; analgésique ; traitement gastrique ; anticolique ; anti-grippe ; anti-vomissement ; agent diurétique ; contre les douleurs névralgiques ; contre les douleurs rhumatismales ; agent hallucinogène ; anti-inflammation ; anti-gale ; contre la fièvre rhumatismale ; traitement des maladies du foie ; contre la diarrhée ; cicatrisant.	Unicer., 2005 ; Burkill., 1985 ; Djeridane., <i>et al</i> 2010 ; Baba Aissa., 2011; Tsichritzis <i>et al.</i> , 1993 ; Ahmad <i>et al.</i> , 1990; Boulos., 1983 ; Harraz <i>et al.</i> , 1995 ; Nagaya <i>et al.</i> , 1997 ; Parimaladevi.,2002 ; Narendhirakannan., 2007 ; Farjam <i>et al.</i> , 2014 ; Parimaladevi <i>et al.</i> , 2003 ; Asolkar <i>et al.</i> , 1981 ; Kirtikar & Basu., 1975.

4- Travaux antérieurs sur le genre *Cleome*

4-1 Constituants chimiques

La famille des capparidacées est connue par sa richesse en métabolites secondaires.

Divers groupes de ces métabolites secondaires ont été identifiés dans la plante. Les triterpènes, les anthraquinones, les flavonoïdes, les saponines, les stéroïdes, les résines, les lectines, les glycosides, les tannins, les alcaloïdes et les autres composés phénoliques ont été isolés des différentes espèces du genre *Cleome*.

Le tableau 3 passe en revue les métabolites isolés dans divers espèces.

Tab 3: Travaux antérieurs sur les composés identifiés du genre *Cleome*.

Espèce	Métabolites	Référence
<i>Cleome paradoxa</i>	Alcaloïdes : paradoxonine ; paradoxenoline Diterpène : acide paradoxenoïque	Azza., 2012
<i>Cleome paradoxa</i>	Trièrènes et phytostérols : Alpha – amyrin ; stigmastérol ; stigmastérol-3-O- β-D-glucopyranoside Flavonoïdes : quercétine ; isoquercétine	Abdel-Sattar <i>et al.</i> , 2009
<i>Cleome iberica</i> DC	Terpénoïdes : glutinol ; lupeol ; β- sitostérol ; cabraleadiol monoacétate ; cabraleadiol ; daucostérol. Flavonoïdes : calycoptérine	Farimani <i>et al.</i> , 2016
<i>Cleome amblyocarpa</i>	Les flavones : 5,4'-Dihydroxy-3,6,7,3'- tétraméthoxyflavone ; 5,3'-Dihydroxy- 3,6,7,4',5'-pentaméthoxyflavone ; 5- Hydroxy-3,6,7,3',4',5' ; hexaméthoxyflavone Les flavonols : Kaempferol 3,7-diRhamnoside ; Kaempferol 3-G-7-Rhamnoside ; Kaempferol 3-Rha-7-Glycoside ; Quercétine 7-Rhamnoside ; Quercétine 3,7-diRhamnoside ; Isorhamnétine 3- Rutinoside ; Isorhamnétine 3,7 diRhamnoside ; Apigénine 6,8-di-C- Glycoside	Sharaf <i>et al.</i> , 1997.
<i>Cleome hassleriana</i>	Anthocyanes : cyanidine ; pelargonidine	Jordheim <i>et al.</i> , 2009
<i>Cleome viscosa</i>	Cleomeiscoscins ; Diterpène cleomaldic acid ; Glycoflavanones ; Lipoflavanones ; Glucosinolates.	Sharma <i>et al.</i> , 2012 ; Bawankule <i>et al.</i> , 2008 ; CSIR., 2001 ; Chauhan., 1979 ; Srivastava., 1979 ; Songsak., 2002
<i>Cleome monophylla</i> L.	Les huiles essentielles : carvacrol, 2- dodécane ; 1-a-terpénool ; 3- undécane ; 2-Dodécane ; 1-a- terpénool.	Ndungu <i>et al.</i> , 1995 ; Bissinger & Michael Roe., 2010

<i>Cleome rutidosperma</i>	Terpenes Flavonoides (flavones)	Arya <i>et al.</i> , 2014
<i>Cleome gynandra</i>	Composés phénoliques ; flavonoides ; tannins galliques ; proanthocyanidines ; saponines ; triterpenes ; anthroquinones ; steroides ; alcaloides.	Moyo <i>et al.</i> , 2013 ; Narendhirakannan <i>et al.</i> , 2007
<i>Cleome arabica</i>	Les flavonoides : Calycoptérine ; Quercétine glucoside ; Quercétine 3,7-diglucoside ; Kaempferol 3-G-7-Rhamnoside ; Quercétine 7- Rhamnoside ; Apigénine 6,8-di-C- Glycoside ; Kaempferol 3,7- diRhamnoside ; Quercétine 3- G-7- rhamnoside ; Keampferol 3' methoxy- 3,7 diRhamnoside ; Keampferol 7- Rhamnoside ; Isohamnetine. Les triterpenes : 11- α -acetylbrachy-carpone-22(23)-ene ; Amblyone ; 17- α -hydroxycabraleactone Les stéroïdes (17-(4-hydroxy-1,5-dimethylhexyl)-2,3,7- (acetyloxy) gona-1,3,5(10)-trien-15-ol) ; β -sitosterol Cleomine	Touil & Rhouati., 1998; Selloum <i>et al.</i> , 2001 ; Selloum <i>et al.</i> , 2003 ; Khalafallah <i>et al.</i> , 2009 ; Djeridane <i>et al.</i> , 2010 ; Ladhari <i>et al.</i> , 2013 ; Intan S.Ismail <i>et al.</i> , 2005
<i>Cleome rosea</i>	Les anthocyanes acylated cyanidins ; peonidins ; cyanidin 3-(pcoumaroyl) diglucoside-5-glucoside ; cyanidin 3-(feruloyl) diglucoside-5- glucoside.	Simoès <i>et al.</i> , 2009
<i>Cleome brachycarpa</i>	Flavonol glycoside ; Megastigmane glucoside ; Flavonoids méthylés ; Sesquiterpenes	Afifi., 2014
<i>Cleome droserifolia</i>	Les triterpènes Drosericarpone ; Buchariol ; Stigmasterol glucoside	El-Askary., 2005

4-2 Activités biologiques

Plusieurs recherches scientifiques s'intéressaient à étudier les propriétés biologiques et pharmacologiques des espèces du genre *Cleome*, le tableau 4 récapitule la majorité des activités liées aux différentes espèces de *Cleome* y compris la *Cleome arabica*.

Tab 4: Les activités biologiques du genre *Cleome*.

Espèce	Activités biologiques	Référence
<i>Cleome rutidosperma</i>	Activité antalgique ; Activité anti-inflammatoire ; Activité antipyrétique.	Bose <i>et al.</i> , 2007
<i>Cleome paradoxa</i>	Activity Antidiabetique	Abdel-Sattar <i>et al.</i> , 2009
<i>Cleome iberica</i>	Activité Antimicrobienne ; Activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses du col de l'utérus ; Activité antioxydante (DPPH).	Farimani <i>et al.</i> , 2016
<i>Cleome viscosa</i>	Activité antalgique ; Activité antipyrétique ; Activité antimicrobienne ; Anti-diarrhée ; Effet antiémétique Effet hépato-protecteur.	Parimala Devi <i>et al.</i> , 2003 ; Sudhakar <i>et al.</i> , 2006 ; Parimala Devi., 2002 ; Gupta & Dixit., 2009 ; Ahmed <i>et al.</i> , 2011
<i>Cleome rosea</i>	Inhibition de la production d'oxyde nitrique (NO) ; Effet antioxydant en protégeant le DNA plasmide.	Simoès <i>et al.</i> , 2006
<i>Cleome droserifolia</i>	Effet hypoglycémiant ; Activité anti-athérogène ; Activité anti-microbienne ; Effet diurétique ; Effet hépato-protecteur ; Effet relaxant ; Effet antihistaminique.	Wang & Ng., 1999 ; Khafagi & Dewedar., 2000 ; Fushiya <i>et al.</i> , 1999 ; Abdel-Kawy <i>et al.</i> , 2000 ; El-Shenawy., 2006 ; Abdel-Kader., 2009
<i>Cleome arabica</i>	Activité antagoniste ; Activité antifongique ; Effet allélopathique ; Activité anti-inflammatoire ; Anti-	Goudjala <i>et al.</i> , 2014 Ladhari <i>et al a & b.</i> , 2013 Bouriche <i>et al.</i> , 2005

	alimentation ; Effet insecticide ; Effet anti-hyper cholestérolémique ; Activité anticancéreuse	Samout <i>et al.</i> , 2015 Tigrine <i>et al.</i> , 2013
<i>Cleome gynandra</i>	Inhibition de la production des ROS (sous condition de stress) ; Activité anticancéreuse ; Activité antioxydante (piégeage des radicaux libres) ; Activité anti-inflammatoire.	Uzilday <i>et al.</i> , 2012 ; Bala <i>et al.</i> , 2012 ; Moyo <i>et al.</i> , 2013 ; Narendhirakannan <i>et al.</i> , 2007
<i>Cleome africana</i>	Activité antioxydante (piégeage du radical libre ABTS)	Tawaha <i>et al.</i> , 2007
<i>Cleome Turkmena</i>	Activité antioxydante ; Activité antibactérienne ; Activité antifongique	Farjam <i>et al.</i> , 2014
<i>Cleome felina</i>	Activité anticancéreuse	Joseph <i>et al.</i> , 2014

Chapitre 2 : Généralités sur les composés phénoliques

1- Définition

Le règne végétal y compris les fruits et les légumes constituent une source importante de polyphénols. Ces derniers sont présents dans toutes les parties de la plante mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents organes et tissus.

Plus de 8000 molécules produites dans les plantes sont identifiées et qui constituent trois grandes classes : les composés phénoliques, les terpénoïdes, et les alcaloïdes (Wink., 2003, Aharoni & Galili., 2011).

Ces molécules sont pourvues de différents rôles dans la plante, notant les agressions climatiques ; stress biotique (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Ils contribuent aussi à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (Visioli *et al.*, 2000).

Ils représentent une large gamme potentielle d'agents thérapeutiques, largement exploitée par l'homme dans différents domaines comme la santé et l'alimentation (Croteau *et al.*, 2000, Cragg & Newman., 2010, Ncube *et al.*, 2012).

2- Structure et catégories des composés phénoliques

Structuralement, les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède un ou plusieurs substituants hydroxylés. Ces derniers permettent aux composés phénoliques simples de se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés.

La plupart des composés phénoliques sont conjugués avec un mono ou poly saccharides, où associés à des esters et des méthyles esters en raison de leur réactivité et toxicité en vue de la plante elle-même. Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes (Nagendran., 2006) ; comme le montre le tableau 5 (Nkhili., 2009).

Tab 5: Les principales classes des composés phénoliques.

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes, Coumarines, Isocoumarines, Chromones	Acide caféique, acide férulique, Myristicin, eugénol, Scopolétine, Myristicine, eugénol, Eugenine	Pomme de terre, Pomme, citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine	Noix
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiférine	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes, Anthraquinones	Resvératrol, Anthraquinones	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daidzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes, Neolignanes	Pinorésinol, Eusiderine	Pin
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoïdes	Amentoflavone	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés		

Les acides phénols, les flavonoïdes, et les tanins font l'objet d'une description plus détaillée.

2- 1 Acides phénols

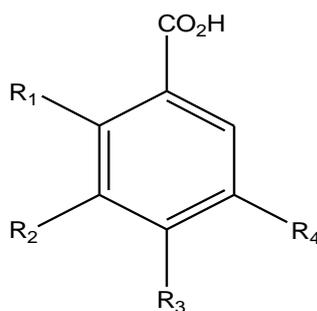
Ces molécules sont caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Bruneton., 1999). Les acides phénols comprennent deux sous classes :

A – Acide hydroxybenzoïques

Cette classe se caractérise par un squelette de C6-C1 en commun. Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline ou enzymatique. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides (Macheix., 2005).

Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides phydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et salicylique (Chanforan., 2010).

La figure 2 illustre la structure de quelques exemples de ce groupe.



$R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
$R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$	Acide protocatéchique
$R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$	Acide vanillique
$R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$	Acide gallique
$R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$	Acide salicylique

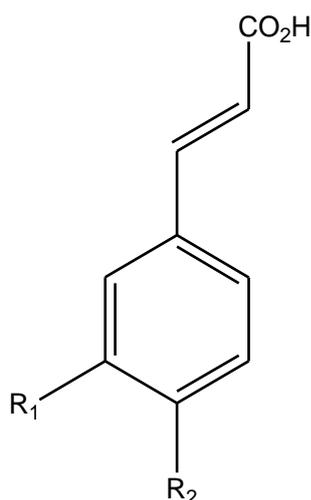
Fig 2: Structure d'acides hydroxybenzoïques communs.

B- Acide hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent un groupe très important dont la structure possède un cycle aromatique associé à trois carbones C6- C3 (figure 3) ; par

exemple : l'acide caféique, l'acide férulique, p-coumarique, et l'acide sinapique (Nagendran., 2006).

Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (Z et E) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. (Macheix., 2005).



$R_1=R_2=H$	Acide cinnamique (non phénolique)
$R_1=H, R_2=OH$	Acide <i>p</i> -coumarique
$R_1=R_2=OH$	Acide caféique
$R_1=OCH_3, R_2=OH$	Acide férulique

Fig 3: Structure d'acides hydroxycinnamiques communs (Chanforan., 2010).

2- 2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette de 15 atomes de carbones C6-C3-C6. Correspondant à la structure des phénylbenzo-pyrones (phénylchromones) (Santos-buelga & Scalbert., 2000). Ces molécules comprennent deux noyaux aromatiques, A et B, liés par un hétérocycle oxygéné C (figure 4) (Heim *et al.*, 2002).

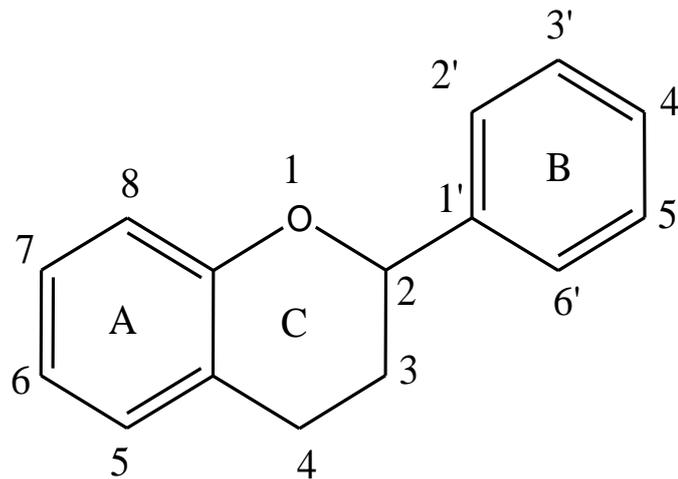


Fig 4: Structure générale des flavonoïdes

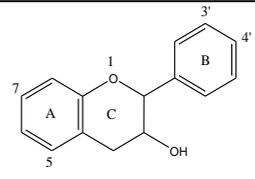
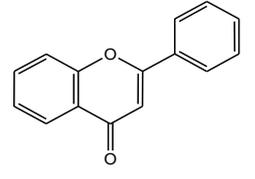
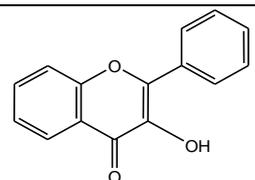
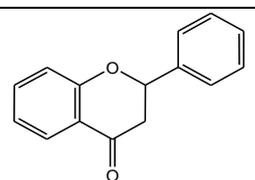
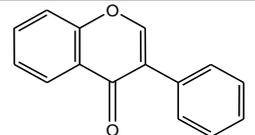
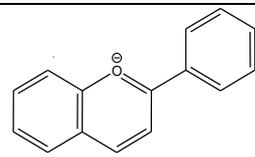
Leur cycle A est synthétisé par la condensation de 3 molécules du malonyl-coenzyme A, issue du métabolisme du glucose. Les cycles B et C ont comme précurseur immédiat l'acide cinnamique qui est formé par la voie de l'acide shikimique. Ce dernier, lui-même, dérivé du métabolisme du glucose (Markham., 1982, Formica & Regelson., 1995).

Plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés (Harborne & Williams., 2000, Boumendjel *et al.*, 2002). Ils sont quasiment universels chez les plantes vasculaires, où ils jouent un rôle très important comme pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (Ghedira., 2005).

Structurellement, les flavonoïdes se répartissent en quinze groupes, dont les plus importants sont illustrés dans le tableau 6 (Heim *et al.*, 2002) ; les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavannonols, les isoflavones, les isoflavannones, les chalcones et les anthocyanes (Formica & Regelson., 1995, Bruneton., 2009).

Dans la plupart des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosidique dans les vacuoles des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Les flavonoïdes aglycones polyméthylés, sont plutôt présents sous forme de cires dans les feuilles, les écorces, et les bourgeons floraux (Laouini., 2014).

Tab 6: Structures des différentes classes de flavonoïdes

Structure générale	Flavonoïde	Substitution	Sources alimentaires
	(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate	Thé (<i>Camelliasinisensis</i>)
	chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 7-glucose	Peau de fruit Persil, céleri Vin rouge, sarrasin Agrumes, peau de tomate Poivron rouge
	Kaempferol quercetin myricetin tamarixetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe	Poireau, brocoli, endives Pamplemousse, thé noir Oignon, laitue, brocoli Tomate, thé, vin rouge Baies, huile d'olive, peau de pomme Raisins de canneberge.
	naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe,7-rutinoses.	Agrumes, pamplemousse Citron, Orange
	genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH,7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH,7glucose 7,4'-OH	Soja
	Apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe	Fruits colorés Cerise, framboise, fraise

2-3 Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones (Konig *et al.*, 1994). Ils ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités, ce qui leur procure la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. (Dangles *et al.*, 1992 ; Hemingway & Karchesy., 2012).

L'accumulation de ces molécules dans le végétal s'effectue essentiellement dans les vacuoles, les fruits et les tissus âgés ou d'origine pathologique.

Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tanins sont le vin et le thé (Pénicaud., 2009). De même l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tanins) (Horn *et al.*, 2002, Del Bubba *et al.*, 2009).

Comme les autres types de polyphénols, les tanins sont aussi répandus pour leurs nombreuses activités thérapeutiques notamment ; anti-infectieuses (Latte & Kolodziej., 2000, Leitao *et al.*, 2005), cardiovasculaires (Yamanaka *et al.*, 1996, Cheruvanky., 2004), hormonodépendantes et anticancéreuses (Notomo *et al.*, 2004, Gosse *et al.*, 2005).

Selon la structure, on distingue : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Roux & Catier., 2007).

A- Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables ou acides tanniques (figure 5) sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation ; l'acide ellagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Ils peuvent diminuer la dégradation des parois dans le rumen et être hydrolysés dans l'intestin en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein (Jarrige & Ruckebusch., 1995).

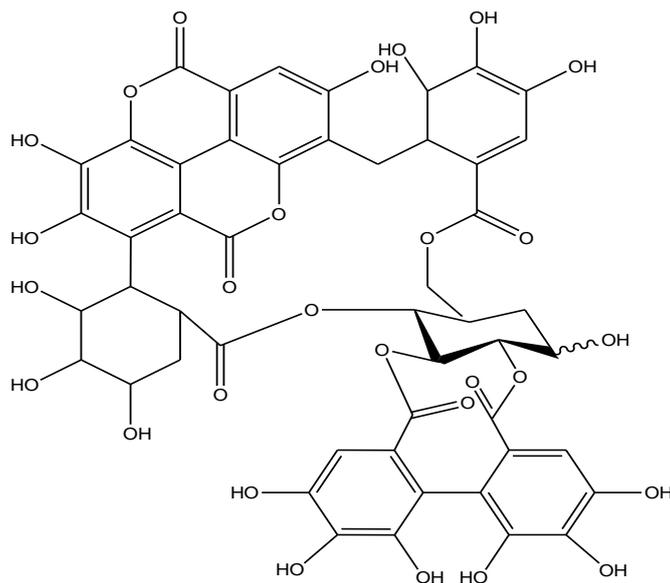


Fig 5: Exemple tannins hydrolisables.

B- Tanins condensés

Les tanins condensés (proanthocyanidines ou procyanidines) sont des polyphénols de masse molaire élevée (figure 6). Ils résultent de la polymérisation auto oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 ou C4-C6 des unités adjacentes, ou bien des liaisons C4-C8 avec une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7 (Wollgast & Anklam., 2000, Dykes & Rooney., 2006).

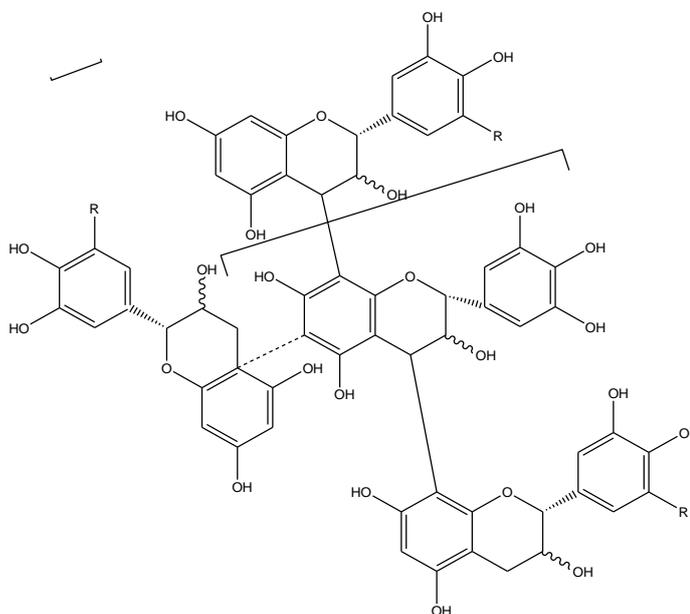


Fig 6: Exemple tannins condensés.

3- Biosynthèse des composés phénoliques

3-1 Biosynthèse des acides phénols

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues. Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux (Sarmi & Cheymer., 2006). Ces composés sont issus par deux grandes voies métaboliques :

3-1-1 voie de l'acide shikimique

Elle conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques.

Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques citant quelques transformations :

- Vers les acides de la série benzoïque (acides gallique, protocatéchique...) par Béta-oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tannins hydrolysables (tannins galliques et ellagiques).
- Vers les esters de type chlorogénique par estérification avec un acide alcool (acide quinique, tartrique, shikimique...) (Sarmi & Cheymer., 2006).
- Vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosilations, prénylations...).
- Vers les lignines par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases. (Bruneton., 1999).

3-1-2 Voie d'acétate malonate

Elle conduit par condensations répétées à des systèmes aromatiques ex : les chromones, les isocoumarines, et les quinones. La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration des composés mixtes comme les flavonoïdes, les stilbènes et les xanthones (Bruneton., 1999).

3-2 Biosynthèse des flavonoïdes

La formation de ces molécules flavonoïques s'effectue par un intermédiaire connu : tétrahydroxychalcone à partir de la quelle se différencient plusieurs types des flavonoïdes (Bruneton., 1999).

Le squelette moléculaire de base a une double origine : 3 molécules d'acétyl CoA (CoA = coenzyme A) pour le cycle A qui dérive de la voie acétate malonate, une molécule de p-coumaryl pour le cycle B qui dérive de la voie shikimate et aussi pour l'hétérocycle C. C'est alors à partir de la chalcone ainsi formée par cette condensation chimique que vont être mis en place les flavonoïdes appartenant aux diverses classes, en particuliers des pigments comme les anthocyanes et les flavonols, ou encore certains monomères de type flavonols dont la polymérisation conduira aux tannins condensés.

La biosynthèse des différents groupes de flavonoïdes (figure 7) implique un ensemble complexe de réactions comprenant des hydroxylations, méthylations, oxydations, réductions, glycosilations... (Sarmi & Cheymer., 2006).

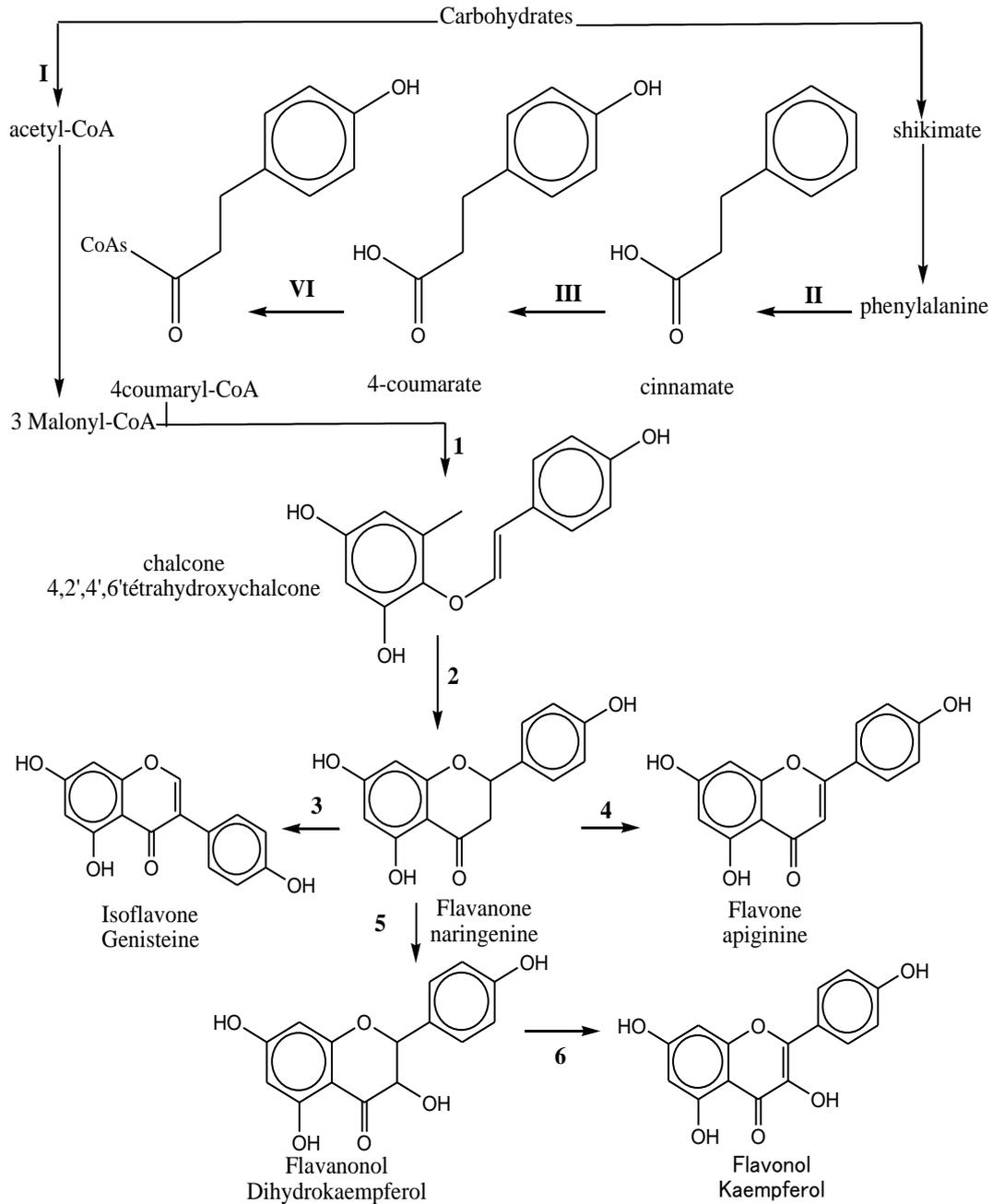


Fig 7: Biosynthèse des flavonoides.

Les enzymes :

I- Acetyl CoA carboxylase ; II- Phenylalanine ammonia lyase ; III- Coumarate 4-hydroxylase ; IV- 4-coumarate CoA ligase ; 1- Chalcone synthase ; 2- Chalcone isomérase ; 3- Hydroxy-2 isoflavone synthase ; 4- Flavone synthase ; 5- Flavanone-3 hydroxylase ; 6- Flavonol synthase.

4- Polyphénols dans les plantes : Localisation et intérêt

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule.

Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (Bénard., 2009).

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme.

Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence (Bénard., 2009).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais aussi peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance (Dicko *et al.*, 2006).

Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux, entre végétaux et animaux (Robert & Catesson., 2000).

5- Polyphénols et activités biologiques

5- 1 Activite antioxydante

5- 1- 1 Introduction

Par définition, les radicaux libres (RL) sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés) sur leur couche externe. Ces radicaux jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire ; la phagocytose et la communication cellulaire (Peynet *et al.*, 2005).

Ces molécules (RL) se caractérisent par leur instabilité et leur réaction rapide avec d'autres composants, afin de capturer l'électron nécessaire pour acquérir leur stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical attaque la molécule stable la plus proche, en lui arrachant son électron et la molécule attaquée devient alors elle-même une molécule instable.

Fosting (2004) rapporte que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou un oxydant, cependant il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres.

Les radicaux libres ou bien les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont souvent produites dans l'organisme mais cette production est toujours contrôlée par les antioxydants afin de maintenir l'équilibre de la balance oxydative oxydant/antioxydant. Le stress oxydatif survient lorsque cet équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toute fois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer cette balance (Christophe & Christophe., 2011, Papazian & Roch., 2008).

Poirier (2004), et Médart (2009) rapportent que ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que :

- Les radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle),
- la pollution,
- le contact avec certains pesticides et solvants,

- la consommation de tabac et d'alcool,
- la consommation de certains médicaments,
- la pratique du sport intensif,
- tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante.

5-1- 2 Pathologies liées au stress oxydatif

Des lésions majeures sur les différentes molécules comme l'ADN, les lipides, et les glucides ainsi que d'autres lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides peuvent être provoquées par la production excessive des radicaux libres dans l'organisme.

L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par la production des anticorps, qui peuvent aussi être des auto-anticorps créant une 3^{ème} vague d'attaque chimique (Favier., 2003).

En général, le stress oxydatif est la conséquence de plusieurs processus et phénomènes. Il peut toucher un tissu ou un type de cellules particulières, et par conséquent, les pathologies du stress oxydant sont donc aussi nombreuses que variées. (Sohal *et al.*, 2002).

Sohal et ses collaborateurs (2002) affirment que l'âge est le seul facteur commun qui favorise le stress oxydatif, dans la mesure où le vieillissement affaiblit les réponses antioxydantes et perturbe la respiration mitochondriale.

Il faut distinguer les maladies dont le stress oxydant est la cause principale, et celles dont l'expression implique celui-ci (toute maladie implique une inflammation, donc un stress oxydant) :

- Le premier groupe inclut les rhumatismes, l'arthrite, l'arthrose, la cataracte, le syndrome de détresse respiratoire aigue (SDRA), l'œdème pulmonaire ...etc, et de façon générale, le vieillissement accéléré des tissus comme la peau.
- Le deuxième groupe inclut le diabète, la maladie d'Alzheimer, les cancers et les maladies cardiovasculaires selon Montagnier et son équipe (1998).

5-1- 3 Polyphénols sont des antioxydants

D'après Halliwell en 1994, les principaux mécanismes de l'activité antioxydante dont les composés phénoliques peuvent appliquer sont :

- Le piégeage direct des EOR ;
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR;
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

A- Inhibition enzymatique

Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement, le cas des flavonoïdes dont l'inhibition d'une grande variété d'enzymes ainsi que le processus de transcription de certains gènes (par interaction du cytosol avec les facteurs de transcription ou certains précurseurs) (Bruneton., 1999).

Bruneton en 1999 rapporte que les acides hydroxycinnamiques sont des inhibiteurs de protéines de coagulation, et jouent ainsi un rôle d'anticoagulants.

Nombreuses études confirment que l'inhibition de la production des EOR par les composés phénoliques, principalement les flavonoïdes, peut s'effectuer directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EOR (Dangles & Dufour., 2006, Dangles & Dufour., 2008, Woff & Liu., 2008).

Le cas de la xanthine oxydase, qui est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde confirme cette double action. D'autre part, Hansaki et ses collaborateurs en 1994 ainsi que Cos et son équipe en 1998, en effectuant une étude sur la maladie de la goutte, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent prévenir cette maladie en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et celle du radical superoxyde dans les tissus humains. Ces travaux ont confirmé que :

- Les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols (cycle C non plan) ne sont pas inhibiteurs de la xanthine oxydase, alors que les flavonols et les flavones (cycle C plan et conjugué avec les cycles A et B) ont la capacité d'inhiber l'enzyme.
- L'absence du groupe hydroxyle en C3 augmente légèrement l'activité inhibitrice. Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles

des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine.

- Les flavonoïdes présentant un cycle B de type catéchol (*ortho*-diphénol ou 1,2- dihydroxybenzène) sont de bons pièges à superoxyde en raison de la stabilité des radicaux semiquinones formés lors de la capture.

B- Chélation des ions métalliques

Les ions du fer ou du cuivre possèdent une grande importance dans plusieurs fonctions physiologiques, ils entrent également dans la composition des hémoprotéines et des cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, les ions du fer pour la catalase, et ceux du cuivre pour le superoxyde dismutase). Cependant, ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton :



En outre, l'autoxydation des ions Fe^{+2} et Cu^+ est une source de superoxyde et peroxyde d'hydrogène, et l'un des mécanismes de l'action antioxydante est bien la formation du complexe entre les ions du fer et le cuivre sous une forme qui inhibe leur pouvoir redox.

Plusieurs études telle que celle de Morris et ses collaborateurs en 1995 et Hider et son équipe en 2001 affirment que divers composés phénoliques abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques.

Les recherches réalisées par Van Acker et ses collaborateurs en 1996 sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques (figure 8).

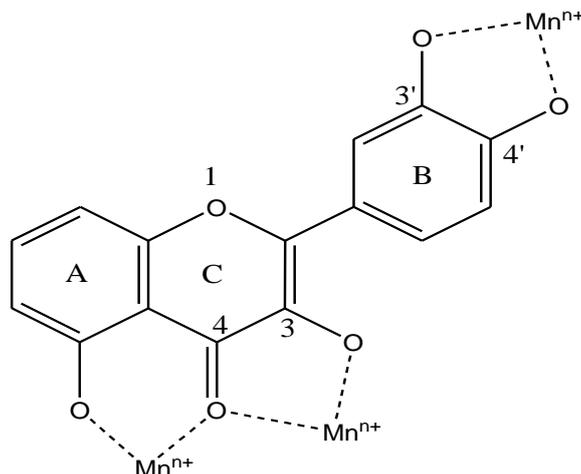
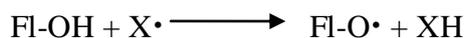


Fig 8: les flavonoïdes et leurs sites de chélation des ions métalliques (Mn²⁺).

C- Piégeage des radicaux libres

Le piégeage de divers radicaux par les composés phénoliques a été beaucoup étudié afin de clarifier et identifier les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Jovanovic et ses collaborateurs en 1994 notent que grâce au faible potentiel redox des polyphénols, plus particulièrement des flavonoïdes (Fl-OH), ils sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO·), alkoxydes (RO·) et hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Dont :

X· représente l'un des EOR mentionnés ci-dessus.

Le radical aryloxyle (Fl-O·) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable.

Eventuellement, le radical aryloxyle peut réduire le dioxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant des flavonoïdes. Ainsi, la capacité antioxydante des polyphénols dépend non seulement du potentiel redox du couple Fl-O·/Fl-OOH mais aussi de la réactivité du radical Fl-O·.

Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres (Pietta., 2000, Cuvelier., 1992, Farkas., 2004).

Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux libres bon-mauvais, comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (Akroum., 2010).

L'activité antioxydante des polyphénols peut s'exercer sur les transporteurs des lipides du sang et tout particulièrement sur le «mauvais» transporteur du cholestérol (les LDL ou les lipoprotéines de faible densité).

Les polyphénols empêchent ainsi la formation des LDL oxydés, formation qui rend place lors d'états pathologiques variés caractérisés par un stress oxydatif (Descheemaeker., 2003).

Ils aident à combattre l'inflammation et réduisent la fragilité des capillaires, ils réduisent les effets du diabète et protègent la peau contre les rayons ultraviolets en diminuant les dommages causés par les rayons solaires (Spiller & Spiller., 2007).

De nombreuses études épidémiologiques montrent qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque des maladies chroniques (Nève., 2002).

5- 2 Polyphénols et cancer

Parmi les propriétés biologiques intéressantes des polyphénols, la prévention du cancer. En effet, un certain nombre de recherches menées *in-vitro* et *in- vivo* ont montré que les polyphénols pourraient être utilisés comme des agents de prévention des différentes maladies cancéreuses (Stagos *et al.*, 2012).

De nombreuses études ont montré que trois types de cancers (sein, prostate et digestif) peuvent être fortement influencés par l'alimentation notamment l'apport en lipides et en antioxydants et que l'huile d'argan pourrait grâce à sa teneur en polyphénols, contribuer à la prévention de certains cancers tels que le cancer de la prostate (Bennani *et al.*, 2009).

Des recherches plus récentes ont décrit les activités anti-cancérogènes de la curcumine, le resvératrol et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) pour le traitement du cancer du col (Di Domenico *et al.*, 2012).

Les effets inhibiteurs du thé vert et noir dans le traitement du cancer ont largement été étudiés. Les polyphénols du thé de type flavan-3-ol sont des composés bioactifs puissants qui interfèrent avec l'initiation, le développement et la progression du cancer par des processus critiques (Lambert & Elias., 2010, Yang *et al.*, 2013).

Ils ont la capacité d'interrompre ou inverser le processus de cancérogenèse en agissant sur les molécules de réseau de signalisation intracellulaires impliquées dans l'initiation et / ou la promotion d'un cancer pour arrêter ou inverser la phase de progression du cancer (Link *et al.*, 2010).

Les polyphénols peuvent également déclencher l'apoptose dans les cellules cancéreuses à travers la modulation d'un certain nombre d'éléments principaux en signal cellulaire (Link *et al.*, 2010).

5- 3 Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Diverses études épidémiologiques ont montré qu'il existe une corrélation inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement des maladies cardiovasculaires (Visioli *et al.*, 2000, Arts & Hollman., 2005).

Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués).

Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (Akroum., 2010).

Selon des études épidémiologiques, un plus grand apport de flavonoïdes tirés des fruits et des légumes s'associe à une diminution du risque d'apparition de maladie cardiovasculaire. Les mécanismes expliquant cette observation ne sont pas clairs, mais d'après les données probantes, les flavonoïdes exerceraient leurs effets par la diminution des facteurs de risque cardiovasculaire.

D'après de récentes données probantes, certains polyphénols sous forme purifiée, y compris le resvératrol, la berbérine et la naringénine, ont des effets bénéfiques sur la dyslipidémie chez les modèles humains ou animaux. Un traitement à la naringénine atténuait l'athérosclérose en corrigeant la dyslipidémie (Mulvihill & Huff., 2010).

5- 4 Polyphénols et inflammation

L'inflammation est la réponse principale de l'organisme à une agression et qui est précisément régulée afin de limiter les atteintes possibles des structures de l'organisme. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique (Bengmark., 2004).

La plupart des pathologies chroniques possèdent une composante inflammatoire. C'est le cas de l'obésité, du diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et du cancer (Hotamisligil., 2006)

Différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols ont montré que composés diminuaient les marqueurs de l'inflammation et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2010), comme il a été démontré, qu'ils agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation (Santangelo *et al.*, 2007).

D'autres études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma, et que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines circulantes (Lenoir., 2011).

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir de la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2010).

6- Méthodes d'analyse des composés phénoliques

La séparation, la détection, l'identification et la quantification des molécules s'effectuent par plusieurs méthodes analytiques et spécialement chromatographiques.

De nos jours, les méthodes chromatographiques couplées à divers détecteurs occupent la plus importante place dans le screening moléculaire car elles permettent de caractériser simultanément un éventail très large de molécules avec une meilleure spécificité et une plus grande sensibilité comparées aux méthodes anciennes.

Elles sont applicables à tous les milieux biologiques, quelle qu'en soit la nature, après une étape d'extraction rendue nécessaire du fait de la complexité de ces matrices.

Les propriétés physico-chimiques des analytes conditionnent la détection par chromatographie, ce qui explique qu'il n'y a aucune méthode chromatographique qui permette la détection de toutes les substances et qu'une bonne stratégie impose la disposition de plusieurs méthodes colorimétriques, spectrophotométriques, et chromatographiques complémentaires.

Le tableau7 présente les différentes méthodes spectrométriques et chromatographiques, en mentionnant les avantages et les limites de chaque méthode (Ben sakhria., 2016).

Tab 7: Méthodes d'analyse, avantages et inconvénients

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Colorimétriques	simple ; rapide ; disponible ; directe.	Manque de spécificité et e sensibilité ; subjectivité de l'interprétation ; nécessite un blanc et un positif à chaque test
Spectro-photométrique	Quantification et/ou identification spectrale simple et rapide de certains composés.	Manque de spécificité et de sensibilité ; séparation préalable nécessaire

CCM	Matériel simple, disponible, peu coûteux ; méthode séparative robuste non destructive, permet l'identification de centaines de molécules et leurs métabolites ; facilite les tests spécifiques d'identification et permet la collection des fractions après séparation ; les nouvelles méthodes sont semi- quantitatives, automatisables et donnent une meilleure identification	Relativement longue à réaliser ; extraction préalable des analytes nécessaire ; manque de sensibilité et de résolution ; influence des conditions locales sur les résultats ; interprétation difficile et délicate en présence de beaucoup de métabolites.
LC-MS	Identification et quantification rapide d'un très large nombre de composés même polaires et thermolabiles ; grande sensibilité et spécificité ; faible volume d'échantillon et plus simple	Coût élevé ; manque de standardisation des bibliothèques de spectres de masse.

La chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes (HPLC-DAD) fut la première technique chromatographique en phase liquide à être utilisée pour un screening moléculaire large. Elle permet l'analyse simultanée d'un grand nombre de molécules dotées de propriétés physico-chimiques très variables, surtout en terme de polarité, de poids moléculaire et de stabilité thermiques. C'est une méthode de séparation robuste, facile d'emploi, avec des principes de séparation bien connus, et qui permet l'analyse d'un grand nombre de molécules avec une bonne sensibilité et sélectivité ajustable. Elle est additive et complémentaire à la CG/MS et avec un coût abordable (Ben sakhria., 2016).

Le couplage de l'HPLC/DAD avec la spectrométrie de masse donne plus de précision et de caractérisation au profilé établis par l'HPLC seule.

La spectrométrie de masse repose sur deux éléments essentiels (Alkhatib., 2010)

- La possibilité, par différentes méthodes, de fragmenter une molécule en différents ions, positifs ou négatifs, de rapports m/z (masse/nombre de charges élémentaires) différents.
- La détection de ces fragments. Là encore, différentes techniques existent (déflexion par champ magnétique, filtre de masse quadripolaire, trappe ionique, temps de vol) mais leur nature influe essentiellement sur la précision des résultats.

Chaque molécule peut être caractérisée par un profil de fragmentation pour une technique de fragmentation donnée. De plus, la formation d'un ion moléculaire (M^+) ou pseudomoléculaire $[M+H]^+$, informe sur la masse de la molécule étudiée, ce qui permet son identification.

Chapitre 3 : Activités biologiques, généralités et évaluation

1- Méthodes d'évaluation du pouvoir antiradicalaire et antioxydant

L'évaluation du pouvoir antioxydant et antiradicalaire peut se faire par de nombreuses méthodes *in vitro* et *in vivo*. Ces techniques sont différentes les unes des autres par les réactifs utilisés, les conditions d'application, leurs protocoles ainsi le mécanisme d'action par le quel l'extrait ou la molécule testée se manifeste dans le milieu.

Le tableau 8 présente les méthodes les plus utilisées, en particulier pour les tests *in vitro* chimiques, en mentionnant les mécanismes réactionnels, les avantages et inconvénients de chaque méthode.

Les techniques citées témoignent l'aptitude d'une molécule ou d'un extrait naturel à neutraliser les radicaux libres par transfert d'électron et/ou de proton issus de phénomènes d'oxydations (Prior *et al.*, 2005).

Les résultats des activités antioxydantes sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante (trolox, quercétine, rutine...).

Tab 8: Tests antioxydants *in vitro*

Tests	DPPH	ABTS ou TEAC	FRAP	ORAC
Mécanismes réactionnels	<ul style="list-style-type: none"> transfert d'électron majoritaire 	<ul style="list-style-type: none"> transfert d'électron et de proton 	<ul style="list-style-type: none"> transfert d'électron 	<ul style="list-style-type: none"> transfert de proton
Nature des molécules testées	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles et lipophiles 	<ul style="list-style-type: none"> hydrophile et lipophiles 	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles 	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	<ul style="list-style-type: none"> CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent d'une molécule de référence 	<ul style="list-style-type: none"> CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent d'une molécule de référence 	<ul style="list-style-type: none"> en mg ou μmol équivalent Fe^{2+} 	<ul style="list-style-type: none"> CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent d'une molécule de référence
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> très facile à mettre en œuvre peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> très facile à mettre en œuvre cinétique de réaction très rapide peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> très facile à mettre en œuvre peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> facile à mettre en œuvre couteux (nécessité d'un fluorimètre) Utilisation d'un générateur de radicaux ($\text{ROO}\cdot$)
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires interférences possibles à 515 nm forte dépendance au pH et au solvant radical inexistant <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> produits de dégradation antioxydants radical inexistant <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> pH utilisé non physiologique interférences possibles à 595 nm interférences avec composés possédant $E^\circ < 0,77\text{V}$ 	<ul style="list-style-type: none"> mécanismes de génération des $\text{ROO}\cdot$ non physiologique interférences possibles des protéines

2- Généralités sur la toxicité

Toute substance biologiquement active est susceptible, à fortes ou à faibles doses et pour une administration prolongée de produire des effets indésirables, voire nocifs. C'est le cas particulier des produits végétaux riches en métabolites secondaires. Leurs propriétés principales sont antifongiques et antimycosiques, anti-inflammatoires.

Les composés chimiques peuvent conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses par voie générale, il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir toxique pour une adaptation rationnelle de la thérapie traditionnelle surtout pour les modes d'administration et les précautions à observer en cas de non intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.). De même l'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait est primordiale pour situer les limites de tolérance de la plante pour toutes les expérimentations (Ouedraogo *et al.*, 2001).

Une substance toxique est qualifiée comme un composé qui peut nuire à la santé des organismes vivants, en particulier à celle des êtres humains (Glomot., 1986, Reichel *et al.*, 2004). L'effet d'un toxique dépend toujours de l'espèce et de la dose, selon leur origine, on distingue les toxiques synthétiques et les toxiques naturels (toxine) provenant des microorganismes, des animaux ou des plantes (Reichel *et al.*, 2004).

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives (non mesurables) ou quantitatives (mesurables). Il existe plusieurs types d'études permettant d'évaluer les effets d'un toxique :

- Les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus,
- Les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux (ex. : lapin, rat et souris) ; Certains organismes de réglementation préconisent l'utilisation d'au moins deux espèces animales, dont l'une appartenant aux rongeurs,
- Les études expérimentales *in vitro*, biochimiques ou cellulaires, les études théoriques par modélisation (exemple : structure-activité) (Lapointe *et al.*, 2004).

Concernant ces différentes méthodes d'évaluation, l'OMS rappelle que les données *in vivo* sur les animaux sont plus indicatives de la toxicité et peuvent être considérées comme des marqueurs d'innocuité.

La toxicité des plantes peut être directe (composés de la plante-organe) ou indirecte via la genèse d'interactions avec les médicaments allopathiques ou de phytothérapie (composés de plante-métabolisme d'autres médicaments/ xénobiotiques).

Les tests de la toxicité *in vivo* comprennent plusieurs formes :

- La toxicité aiguë permet de connaître la plus petite dose qui, administrée en une seule prise entraîne la mort de 50% des animaux dans les 24 à 48 heures après le traitement, la durée maximale d'observation étant de 15 jours (Dubick *et al.*, 1993). Elle permet de déterminer la dose létale 50 (DL50).
- la toxicité subaiguë ou subchronique, qui permet de déceler les troubles de croissance, d'alimentation, les troubles biochimiques et histologiques secondaires à l'administration continue d'une substance (Diezi., 1992).
- la toxicité chronique, qui permet d'avoir des renseignements sur le degré de toxicité des médicaments qui habituellement sont utilisés de façon répétée par des patients (Cheftel *et al.*, 1989).

Dans le cas de l'évaluation de la toxicité subaiguë et chronique, la durée d'administration de la substance expérimentale dépendra de la durée d'utilisation clinique prévue. La durée dans le cadre de l'étude de toxicité variera d'un pays à l'autre, selon la réglementation en vigueur (OMS., 2000).

Concernant la dose, il est recommandé de prévoir des groupes pour au moins trois niveaux de dose différents : une dose n'engendrant aucun effet toxicologique (dose sans effet) et une dose entraînant des effets toxicologiques. Dans cette fourchette, l'adjonction d'au moins un autre niveau de dose augmente la possibilité d'observer une relation dose-réaction. Toutes les études doivent inclure un groupe témoin d'animaux d'expérience chez lequel on n'administre que le véhicule (OMS., 2000).

L'évaluation *in vitro* de la toxicité peut être réalisée par d'autres tests toxicologiques sur des cellules animales. Ces techniques ont comme avantage principal de diminuer fortement le nombre des animaux utilisés lors des expériences et des études de la toxicologie *in vivo*, citant :

- L'effet hémolytique dont la lyse des globules rouges est un phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent l'hémoglobine.

- L'effet larvicide appliqué sur les larves d'*Artemia salina*.

3- L'évaluation de l'effet antalgique

L'I.A.S.P. (International Association for the Study of Pain) définit officiellement la douleur comme suit : « la douleur est l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en terme d'une telle lésion ». Selon Le bars et ses collaborateurs (2001), la douleur est un processus physiologique dont le but est d'avertir la personne d'une menace de son intégrité physique d'où le terme nociception. Son intensité et sa durée, elle peut devenir, un véritable syndrome, retentissant sur les grandes fonctions organiques et capable à lui seul d'aggraver l'état du malade (Bounihi., 2015).

La durée d'évolution permet de distinguer deux sortes de douleurs, à savoir aigue qui est considérée comme un « signal d'alarme » et chronique qui est une « douleur maladie ».

- La douleur aigue est un symptôme qui aide au diagnostic et qui généralement décroît et disparaît lorsqu'un traitement est institué. Ce type de douleur doit être traité dès l'aperçu du signal d'alarme.
- La douleur chronique est une douleur qui évolue et qui peut durer de 3 à 6 mois.

L'OMS a classé le traitement de la douleur selon l'intensité et en associant des principes thérapeutiques en 3 classes :

- Traitement avec les antalgiques non morphiniques (paracétamol, acide acétylsalicylique, et kétoprofène) pour les douleurs faibles.
- Traitement avec les antalgiques dérivés de la morphine (associé au paracétamol, tramadol, et nefopam) pour les douleurs modérées.
- Traitement avec la morphine et l'oxycodone pour les douleurs intenses.

Plus de 50% de médicaments utilisés aujourd'hui sont d'origine naturelle. Dans le domaine des antalgiques, citant la morphine qui est extraite du pavot, dans le nom a donné naissance à toute une classe d'analgésiques (Badiaga., 2012). Les plantes restent une source très importante pour la recherche de nouvelles molécules analgésiques.

L'évaluation de l'activité antalgique peut être réalisée par plusieurs méthodes (Colot., 1972), en plus du test de la plaque chauffante, test tail flick et le test de torsion, on cite :

➤ **Test de Randall et Selitto**

Il consiste à soumettre à une pression mesurée la patte du rat qui réagit par un cri, l'animal analgésié ne réagit pas.

➤ **Test d'Amour et Smith**

Il s'agit de focaliser un rayon lumineux calorifique sur la queue de la souris, en moins de 6 secondes la souris déplace la queue. L'animal est considéré analgésié s'il n'y a pas de réponse au bout de 12 secondes.

➤ **Test de Charpentier**

La base de la queue du rat est stimulée électriquement, l'animal présente une réaction de fuite avec cris. Le seuil d'intensité de courant électrique déterminant le cri et sa variation après analgésie sont évalués.

4- Généralités et méthode d'évaluation de la cicatrisation des plaies

4-1 Définition

La cicatrisation est l'ensemble des phénomènes physiologiques naturels aboutissant à partir d'une plaie à la restauration de la structure cutanée. De cette manière les tissus humains et animaux sont capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leurs sont propres.

La réparation des lésions est un alignement complexe de différents processus dynamiques, qui ne sont pas encore complètement compris. Ce phénomène naturel inclut plusieurs aspects et événements moléculaire et cellulaire (Ferraq., 2007).

4-2 Les différentes phases de la cicatrisation

La cicatrisation est un phénomène continu comportant trois phases : phase inflammatoire, suivie des phases de réparation (phase proliférative) et de maturation (phase de remodelage). Toutes les phases sont interdépendantes et se chevauchent sans séparation stricte dans le temps (Figure 9). Les caractéristiques de durée et d'intensité pour chaque phase, varient en fonction de la plaie et du mode de cicatrisation (Kumar *et al.*, 2007, Guo & DiPietro., 2010).

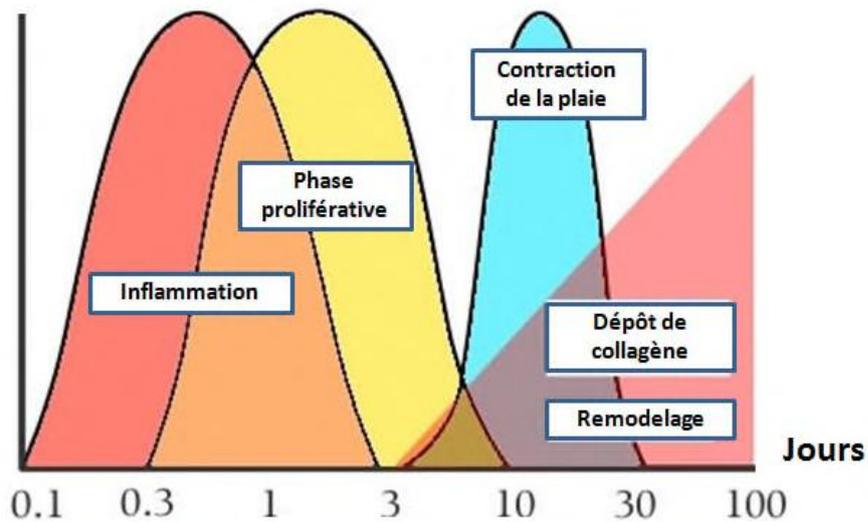


Fig 9: Ordre séquentiel des phases de la cicatrisation (Kumar *et al.*, 2007).

4-2-1 Phase exsudative

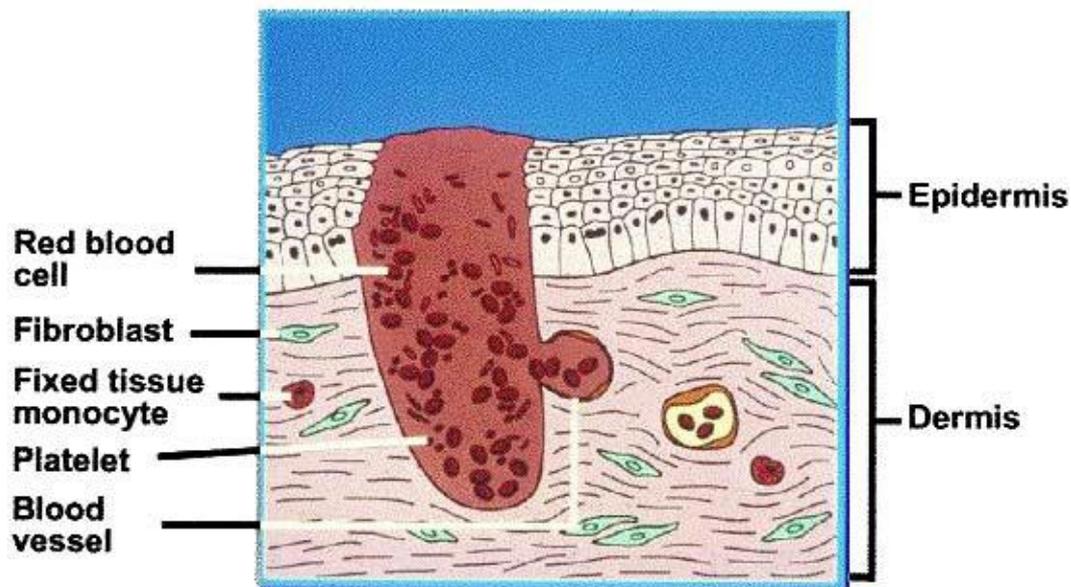


Fig 10: Lors d'une blessure

Au moment de la blessure (figure 10), le tissu est lysé et les plaquettes adhèrent au collagène et libèrent des facteurs de coagulation, le PDGF et le TGF- β pour initier le processus de réparation (Diegelmann., 2004).

A- Réaction vasculaire

Au moment de la blessure, la rupture de vaisseaux sanguins entraîne l'épanchement des constituants du sang (figure 11). La coagulation traduit la réaction cellulaire immédiate à l'agression du tégument (Boykin., 1996). Cette réaction est amorcée par l'activation de

l'agrégation des plaquettes et par la libération de substances vasoconstrictrices qui oblitèrent les vaisseaux sanguins par la formation d'un caillot stable. Le caillot rétablit l'hémostase et forme une matrice extracellulaire dans le lit de la plaie, c'est-à-dire une structure pour la migration des cellules (Singer & Clarck., 1999). Les plaquettes libèrent également plusieurs médiateurs « cytokines » ou facteurs de croissances : facteurs de croissance d'origine plaquettaire (*platelet derived growth factor* ou PDGF); facteur de croissance transformant alpha (*transforming growth factor alpha* ou TGF α) ; facteur de croissance transformant bêta (TGF β). Ces facteurs attirent et activent les macrophages et les fibroblastes (Singer & Clarck., 1999).

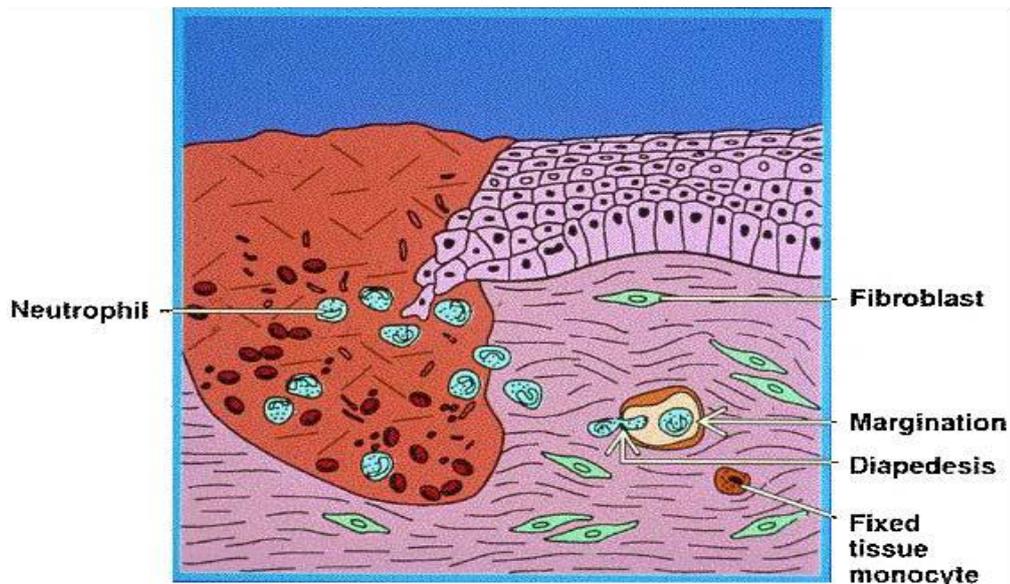


Fig 11: Phase vasculaire

Dès le premier jour après une blessure, les neutrophiles se fixent aux cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux autour de la plaie, puis elles changent de forme pour passer à travers les jonctions cellulaires (diapédèse) et migrent vers le site de la plaie (chimiotactisme). C'est le début de la phase inflammatoire (Diegelmann., 2004).

B- Réaction inflammatoire

L'inflammation commence, en général, dès l'agression initiale et dure jusqu'au quatrième jour de la cicatrisation, environ. Les signes cardinaux de l'inflammation aiguë sont bien connus : chaleur, rougeur, œdème et douleur. La perte de fonction constitue un autre signe de cette phase (Calvin., 1998).

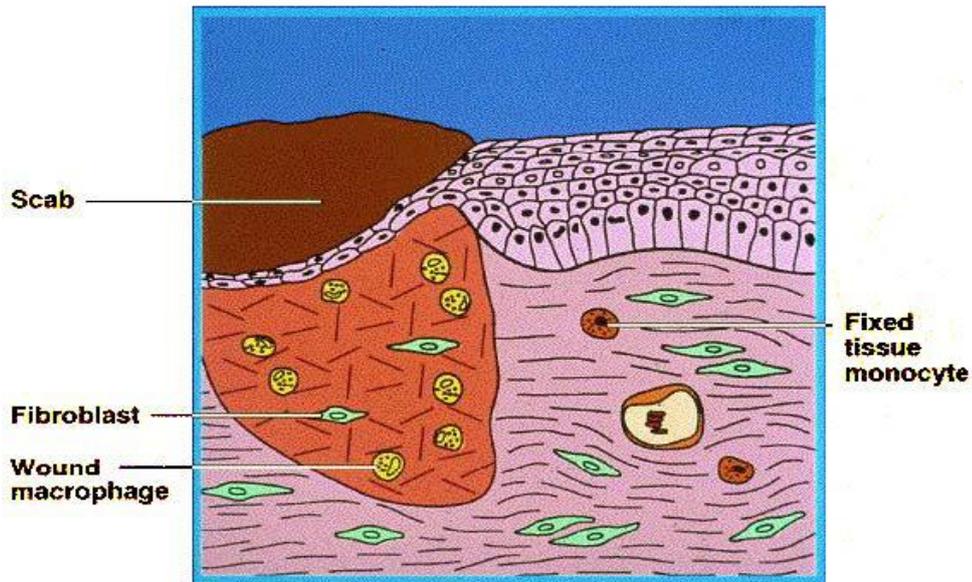


Fig 12: Phase inflammatoire

La phase inflammatoire se poursuit (figure 12), les macrophages tissulaires deviennent actifs et se déplacent dans le site de la lésion et se transforment en macrophages très active. Ces cellules hautement phagocytaires libèrent également le PDGF et le TGF- β à fin de recruter des fibroblastes sur le site et de commencer ainsi la phase proliférative (Diegelmann., 2004).

4-2-2 Phase proliférative

La seconde étape du processus cicatriciel conduit à la formation du tissu de granulation. Elle permet ainsi la réparation dermique et épidermique grâce à la synthèse de collagène et à la prolifération de kératinocytes, de fibroblastes et de néovaisseaux (Allas., 1997, Maurin., 2005).

A- Réparation dermique

La phase inflammatoire, grâce notamment aux nombreux médiateurs chimiques libérés, aboutit à l'activation des fibroblastes présents à l'état quiescent au niveau des berges et du lit de la plaie. Ces fibroblastes activés migrent alors vers le foyer inflammatoire, où ils sont retrouvés à partir du troisième jour. Ils assurent, essentiellement à partir du cinquième jour, la synthèse de collagène, de glycoprotéines et de protéoglycannes. Ces composés forment ainsi la nouvelle matrice extra-cellulaire qui succède la matrice provisoire formée lors de la phase exsudative (Allas., 1997, Hatz., 1994, Vandenbussche., 1983).

B- Angiogénèse

Parallèlement à la prolifération cellulaire, l'angiogénèse se développe au site de la plaie à partir du cinquième jour. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins se déroule en plusieurs étapes, chacune régie par des facteurs de croissance essentiellement d'origine plaquettaire et macrophagique. La néovascularisation régresse lorsque les besoins en oxygène sont moins intenses, notamment lorsque la synthèse de collagène et de matrice extra-cellulaire diminue. (Allas., 1997, Maurin., 2005, Stashak., 1984).

C- Réparation épidermique

La réépithélialisation assure la couverture finale de la plaie par un épithélium stratifié et kératinisé, formé à partir des cellules épidermiques provenant des berges du foyer cicatriciel, voir des follicules pileux (Allas., 1997, Dereure., 2001, Maurin., 2005).

4-2-3 Phase de contraction et remodelage

Il s'agit d'un mécanisme de réduction de la taille de la plaie par le mouvement centripète du tissu cutané entourant la plaie. C'est un processus dans lequel les fibroblastes joueraient un rôle du premier plan se produisant sept jours après la blessure, et son activité atteint un pic après deux semaines (Calvin., 1998).

Après l'arrêt de la transformation fibroblastique et de l'angiogénèse et longtemps après la réépithélialisation, une longue phase de remodelage de la cicatrice se fait par synthèse de collagène qui se poursuit essentiellement par remplacement du collagène de type III par du collagène de type I. Il s'agit d'une lente évolution vers l'équilibre entre synthèse et dégradation surtout par les métalloprotéases, une rupture de cet équilibre entraîne des vices de cicatrisation (cicatrice hypertrophique, chéloïde, cicatrice atrophique) entre autres, la collagénase 4 et la gélatinase. Cette phase finale de la cicatrisation se poursuit pendant des mois, voire des années après la cicatrisation de la plaie (Coulibaly., 2007, Moulin., 2001).

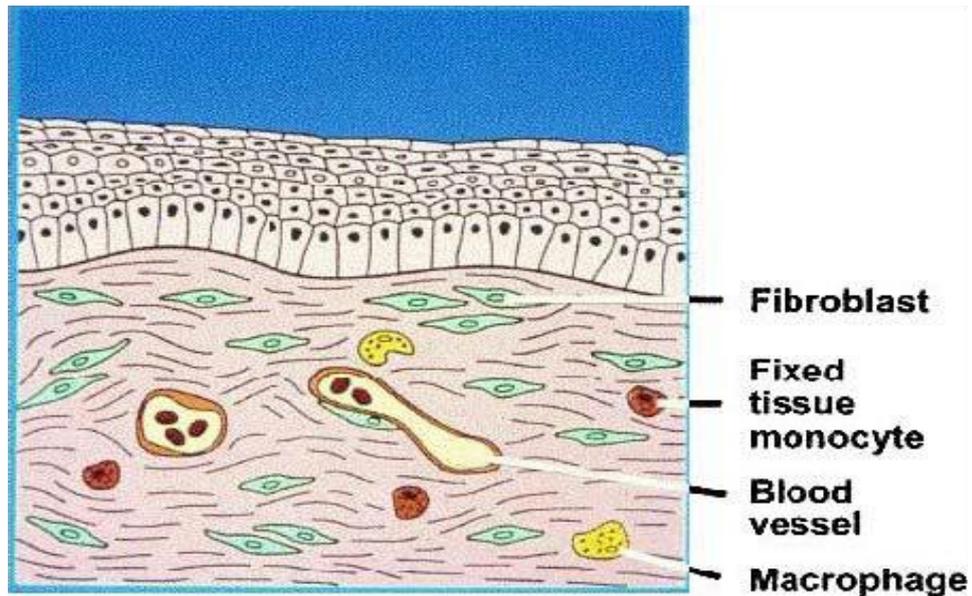


Fig 13: Phase de remodelage

La phase de remodelage (figure 13) est caractérisée par la synthèse continue et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire en tentant d'établir un nouvel équilibre (Diegelmann., 2004).

4-3 Méthodes d'étude de la cicatrisation

La cicatrisation est un phénomène très complexe, dont les études ont été effectuées auparavant sur des plaies traumatiques c'est-à-dire issues des accidents (coupures et contusion), ou des pathologies (particulièrement dans les cas d'escarres, d'ulcère de jambe et l'ulcère diabétique), ou bien des interventions chirurgicales. Ces lésions présentent des origines diverses, avec des paramètres non contrôlés ne permettant pas une bonne comparaison entre les différentes lésions.

Comme solution à ces problèmes, des études de cicatrisations sont actuellement réalisées par induction expérimentale des lésions cutanées plus contrôlées. Ces dernières sont induites en utilisant plusieurs modèles classés en trois groupes :

4-3-1 Modèles physiques

Principalement utilisé lors des prélèvements des greffons de peau (derme et épiderme), le rasoir à dermatome permet de régler la profondeur du prélèvement. Cette propriété est aussi exploitée dans les études de cicatrisation et réparation tissulaire de peau, ce modèle permet d'avoir une profondeur assez uniforme (Yamamoto., 2006). Il existe d'autres modèles physiques, tel que les brûlures par immersion dans une eau chauffée

(90°/10s), sont utilisés comme modèle d'étude de brûlure thermique. Cependant cette dernière peut varier selon différents facteurs tel que le temps d'application et la pression exercée. Les brûlures thermiques étudiées sont généralement du 2^{ème} degré.

Les brûlures sont des lésions causées par la chaleur excessive, l'électricité, radioactivité ou des agents corrosifs qui dénaturent les protéines dans les cellules cutanées. Les brûlures suppriment certaines des fonctions homéostatiques majeurs de la peau, notamment la thermorégulation, la protection contre les microorganismes et la déshydratation (Tortora & Derrickson., 2007).

On distigue 3 classes selon leur gravité :

➤ **Brûlures du premier degré**

Atteignent uniquement l'épiderme. Elles causent une douleur modérée et un érythème (rougeur), mais n'entraînent pas la formation de cloques. Les fonctions de la peau restent intactes. En cas de brûlure premier degré, on peut limiter la douleur et les lésions en appliquant immédiatement de l'eau froide sur la zone touchée. La guérison prend généralement de trois à six jours et peut s'accompagner de desquamation. Les coups de soleil légers sont des brûlures du premier degré (Tortora et Derrickson., 2007, Marieb., 2008).

➤ **Brûlures du deuxième degré**

Détruisent l'épiderme et une partie du derme. Elles suppriment partiellement les fonctions de la peau et entraînent une rougeur, la formation de cloques, un œdème et de la douleur. La formation de cloques est due à l'accumulation de liquide tissulaire qui s'insère entre l'épiderme et le derme. En l'absence d'infection, ce genre de brûlure guérit habituellement en trois ou quatre semaines, mais il peut laisser des cicatrices (Tortora & Derrickson., 2007, Marieb., 2008).

➤ **Brûlures du troisième degré**

Détruisent l'épiderme, le derme et le fascia superficiel. Elles suppriment en outre la plus part des fonctions de la peau. La couleur des lésions peu aller du blanc marbré à l'acajou; dans certains cas, ces brûlures ont un aspect sec et carbonisé. Elles causent un œdème considérable. La destruction des terminaisons nerveuses supprime les sensations dans la région atteinte. (Tortora & Derrickson., 2007, Marieb., 2008).

4-3-2 Modèles chimiques

L'induction de lésions chimiques est réalisée en grande partie pour reproduire des cas accidentels, par exemple en utilisant l'acide chlorhydrique (Cavallini & Casati., 2004), afin d'étudier la phase inflammatoire et de développer des traitements adéquats.

4-3-3 Études *in vitro*

La contraction des plaies, au cours de leurs réparations, est difficilement appréciable, à partir de là, la peau reconstruite est un bon modèle d'étude (Laplante *et al.*, 2001). En effet le derme équivalent et la peau reconstruite présentent l'avantage d'avoir des caractéristiques proches de la peau *in vivo*, et de permettre l'observation, ainsi que l'étude des phénomènes qui se déroulent lors de la cicatrisation. Ainsi l'observation de la réépithélialisation sur le modèle de la peau reconstruite est plus appréciable, que sur le modèle *in vivo*. Dans ce dernier cas, l'observation est rendue difficile par la formation de la croûte sur la plaie qui s'accompagne d'une contraction importante du derme.

Dans la grande majorité de ces études, les objectifs sont l'évaluation et l'estimation de la cinétique de cicatrisation (vitesse), et les possibilités de l'améliorer par différents moyens (molécules actives, des matériaux de substitution particulièrement dans le cas des grands brûlés).

Les études de la cicatrisation cutanée passe par deux phases, la première étant l'induction et le contrôle des lésions suivie d'une phase d'évaluation et de suivi de la cinétique de ce phénomène. Dans un premier temps le suivi est réalisé par simple observation clinique, et peut être complété par des prélèvements histologiques.

La cicatrisation peut être évaluée par :

- Mesure directe des dimensions de la plaie à la règle, une largeur et longueur (Vowden., 1994).
- L'utilisation de calques transparents, permet le relevé du contour sur du papier millimétré (Bohannon & Pfaller., 1983).
- Mesure du volume des plaies par un moulage au moyen d'une gomme siliconée (Zahouani., 1992).

Cependant, Ces techniques présentent le même inconvénient qui est le contact direct avec la plaie, mais ça reste un outil très utilisé pour l'évaluation de la cicatrisation.

I- Matériel végétal

La plante *Cleome arabica* a été récoltée à maturité dans la région de Biskra (lieu dit El outaya) en avril 2011. L'identification était faite par Professeur Hocine Laouer (LVRBN, Université de Ferhat Abbas, Sétif).

Le voucher spécimen n°CA1101 a été conservé dans l'herbier du laboratoire de pharmaco-toxicologie, institut National des sciences vétérinaires. Université des frères Mentouri, Constantine 1.

II- Méthodes

Chapitre 1 : Caractérisation phytochimique

1- Rendement de l'extraction hydroalcoolique

Une extraction était faite par l'ultrason de marque Fisher scientifique (FB15046) en utilisant de l'éthanol à 70% à température ambiante. La teneur en substances extractibles par l'éthanol est évaluée par la formule suivante :

$$\text{SE Et-OH\%} = \frac{\text{M2}}{\text{M1}} \times 100$$

SE Et-OH%: Teneur en substance extractible par Ethanol

M1 : poids de l'extrait sec.

M2 : poids initial de l'échantillon.

2- Méthode d'extraction

Avant de procéder à l'extraction, le matériel végétal est broyé après séchage à l'air libre et à l'obscurité. Le broyage était réalisé à l'aide d'un broyeur (type Gulatti MFC) qui tourne à vitesse de 1000 tr/min et équipé d'un tamis de maille de 0,85 mm (80 mesh). La poudre ainsi obtenue est conservée dans un bocal en verre hermétique à une température ambiante.

La méthode d'extraction est faite selon le protocole de Laghari *et al.*, (2013). Pratiquement, le matériel végétal séché et broyé est mis dans un bécher contenant une solution hydroalcoolique à 70% d'éthanol avec un rapport de 1/5 (Masse/Volume).

L'extraction est réalisée dans une cuve à l'ultrason pendant deux heures (2H) avec une fréquence de 20 kHz. Elle est refaite trois fois avec renouvellement du solvant à chaque fois. La solution ainsi obtenue est filtrée puis évaporée dans l'évaporateur rotatif (Buchi) à 45°C.

Les extraits obtenus sont pesés ensuite conservés à température - 4°C, à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

3- Screening et réactions chimiques

Les différentes réactions chimiques ont pour objectif de caractériser et rechercher les principaux groupes et familles chimiques dans les différentes parties graines, feuille, racine ainsi que l'extrait de la partie aérienne.

Cette caractérisation chimique préliminaire se fait dans des tubes à essais en utilisant différents protocoles avec plusieurs produits chimiques.

Les résultats qualitatifs sont classés en :

- **Réaction très positive +++ : Présence confirmée ;**
- **Réaction positive ++ : présence modérée ;**
- **Réaction plus au moins positive + : présence en tant que trace ;**
- **Réaction négative - : absence.**

➤ **Test des Alcaloïdes**

Ce test est basé sur le phénomène de précipitation avec un réactif spécifique « le Dragendorff » qui est considéré comme révélateur des alcaloïdes. (Dohou *et al.*, 2003).

Dans des tubes à essai 5 ml de l'extrait sont introduits en ajoutant 2 ml d'HCl et 1 ml de réactif de Dragendorff. La formation d'un précipité rouge ou orange indique la présence des alcaloïdes dans l'extrait.

➤ **Test des Flavonoïdes**

Le test consiste à ajouter à 1ml d'extrait à une solution de NaOH et laisser agir 3 minutes. L'apparition d'une coloration jaune intense implique la présence des flavonoïdes (Karumi *et al.*, 2004). L'ajout de quelques gouttes d'une solution acide diluée permet la persistance de la coloration.

➤ **Test des Tanins**

Dans un tube à essai, 2ml de chaque extrait est ajouté au trichlorure de fer (FeCl_3) à 2%. Ce test permet de détecter la présence ou l'absence des tanins. L'apparition d'une couleur brune noir confirme la présence des tanins galliques (tanins hydrolysables) et la couleur bleu verdâtre pour la présence des tanins catéchiques (ou tanins condensés). (Doh *et al.*, 2003).

➤ **Test des Coumarines**

Dans un tube à essai, 5ml de chaque extrait est ajouté à 0,5ml de NH_4OH à 25%. La présence des coumarines est révélée par l'observation de la fluorescence sous une lampe UV à 366 nm.

Une fluorescence intense dans le tube dont l'ammoniaque a été ajouté indique la présence des coumarines (Rizk., 1982).

➤ **Test des Saponines**

La détection des saponines est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 1 ml de l'extrait aqueux. Par la suite, cette solution est fortement agitée. Après 15 min de repos.

La détection des saponines se traduit par la persistance d'une mousse d'au moins 1 cm après les 15 minutes. (Dohou *et al.*, 2003, Koffi *et al.*, 2009).

➤ **Test des Terpenoïdes**

Ce test consiste à ajouter 2ml de CHCl_3 , 1ml d'anhydride acétique et 1 ml d'acide sulfurique concentré à chaque extrait.

La présence des terpenoïdes est confirmée par l'apparition d'une coloration violette. (Koffi *et al.*, 2009).

➤ **Test des Stéroïdes**

Les stéroïdes sont mis en évidence par dissoudre chaque extrait dans 1 ml de chloroforme et ajouter 1 ml d'acide sulfurique concentré. Le test positif est révélé par l'apparition d'une couche supérieure de couleur rouge (Trease & Evans., 1978).

4- Dosage spectrophotométrique

4-1 Dosage des phénols totaux

L'estimation quantitative exprimée en mg d'acide gallique est réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu. (Li *et al.*, 2007).

Dans un tube à essai, un volume de 200 µl de chaque extrait est ajouté à 1,5 ml du réactif Folin Ciocalteu (dilué dix fois). Après 5 minutes, 1,5 ml de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 5% est ajouté à la solution précédente.

L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm après deux heures dans l'obscurité, et la concentration des phénols totaux est estimée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-100µg /ml).

L'équation de régression déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique permet de déterminer la teneur en phénols totaux exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG /g d'extrait).

4- 2 Estimation quantitative des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont considérés comme une importante classe des polyphénols et vue la richesse des plantes en ces molécules, leur teneur est estimée dans les graines, feuilles et racine de *Cleome arabica*.

L'application de la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Baharun *et al.*, 1996) est fréquemment utilisée pour estimer la teneur des flavonoïdes dans les extraits des différentes parties de la plante.

Le protocole consiste à mettre dans un tube à essai 1ml de chaque extrait (avec dilution convenable), puis 1ml d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol) a été ajouté. Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 430nm.

La courbe d'étalonnage des flavonoïdes est effectuée en utilisant la Rutine à une concentration allant de 0 à 100 µg/ml. La quantité des flavonoïdes dans chaque extrait est déterminée suite à l'équation de régression linéaire déduite à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligramme équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg ER/g extrait).

4-3 Dosage des tannins condensés (proanthocyanidins)

Cette méthode de détermination du taux des proanthocyanidines a été proposée par Vermerris & Nicholson., (2008).

La méthode est basée sur le mélange butanol/HCl. Un volume de 250µl de chaque extrait a été mélangé avec 2,5 ml d'une solution d'acide de sulfate ferreux (77mg de sulfate d'ammonium ferrique : Fe₂(SO₄)₃ dissous dans 500 ml de (3:2 n-butanol: HCl). Après incubation à 95°C pendant 50 minutes, l'absorbance a été mesurée à 550nm. La teneur en Proanthocyanidine a été calculée selon la formule suivante :

$$T = \frac{A_{550nm} \times DF \times MW}{(\epsilon * l)}$$

DF : est le facteur de dilution

MW : la masse moléculaire de la cyanuration (287g/mol)

ε : le coefficient d'extinction moléculaire (34700 l/mol/cm).

Les proanthocyanidines ont été exprimées en mg de cyanidine équivalent / g d'extrait.

5- Analyse par chromatographie liquide a haute performance (HPLC/DAD/MS)

Les extraits des feuilles, des graines et des racines de *C. arabica ssp arabica* ont été analysés selon le protocole de Martins et ses collaborateurs (2016), à l'aide d'un HPLC Hewlett-Packard 1100 (Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US) avec une pompe quaternaire et un détecteur de rayon diode (DAD) couplé à une station HP Chem (Rev. A.05.04) de traitement de données. Une colonne Waters Spherisorb S3 ODS-2C18, (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) thermostatée à 35° C a été utilisée avec un volume d'injection égal à 100 µL.

L'éluant utilisé est composé de : (A) 0,1% d'acide formique dans l'eau, (B) l'acétonitrile. Le gradient d'élution utilisé est de 15% B pendant 5 min, 15 à 20% B pendant 5 min, 20-25% B en 10 min, 25-35% B en 10 min, 35-50% B pendant 10 minutes et Rééquilibrage de la colonne, en utilisant un débit de 0,5 ml / min.

Une double détection en ligne a été effectuée dans la DAD en utilisant 280 et 370 nm. Le spectromètre de masse (MS) connecté au système HPLC via la sortie de la cellule DAD.

La détection MS a été effectuée dans un API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Allemagne) équipé d'une source ESI et d'un analyseur de masse triple quadripôle-iontrap contrôlé par le logiciel Analyst 5.1. L'air de qualité zéro servait de gaz nébuliseur (30 psi) et le gaz turbo pour le séchage par solvant (400 °C, 40 psi). L'azote servait de rideau (20 psi) et de gaz de collision (moyen).

Les quadropoles ont été définis dans une résolution définie. La tension de pulvérisation ionique a été réglée à 4500 V en mode négatif. Le détecteur MS a été programmé pour l'enregistrement en deux modes consécutifs : analyse de la MS (EMS) et de l'analyse de l'ion produit (EPI).

L'analyse de la masse a été utilisée pour montrer les spectres de balayage complets, afin d'obtenir un aperçu de tous les ions dans l'échantillon.

Les paramètres utilisés étaient : potentiel de déploiement (DP) - 450 V, potentiel d'entrée (EP) -6 V, énergie de collision (CE) -10 V. Le mode EPI a été effectué afin d'obtenir le motif de fragmentation de l'ion (s) parent (s) dans le spectre précédent en suivant les paramètres : DP - 50 V, EP - 6 V, CE - 25 V et propagation de l'énergie de collision (CES) 0 V. Les spectres ont été enregistrés en mode ion négatif entre m/z 100 et 1000.

Les composés phénoliques ont été identifiés en comparant leur temps de rétention (Tr), les spectres UV-VIS et les spectres de masse avec ceux obtenus à partir des composés standards, lorsqu'ils sont disponibles. Dans le cas contraire, les composés ont été identifiés provisoirement en comparant l'information obtenue avec les données disponibles rapportées dans la littérature.

Pour une analyse quantitative, une courbe d'étalonnage pour chaque composé phénolique disponible a été construite en fonction du signal UV.

Pour les composés phénoliques identifiés pour lesquels le standard commercial n'était pas disponible, la quantification a été effectuée par la courbe d'étalonnage d'un autre composé à partir du même groupe phénolique. Les résultats ont été exprimés en mg par g d'extrait sec. Tableau 9 illustre les standards utilisés.

Tab 9: Les standards et leurs courbes d'étalonnage.

Standards	Courbe d'étalonnage
Catechine	$y=134,92x+32,987$; $R^2= 0.999$
acide p-Hydroxybenzoïque	$y= 286,67x+347,98$; $R^2= 0.998$
acide Ferulique	$y=525,36x+233,82$; $R^2= 0.999$
acide p-coumarique	$y=706,09x+1228,1$; $R^2= 0.999$
acide Sinapique	$y=270,42x+62,292$; $R^2= 0.999$
acide Vanillique	$y=394,49x+423,86$; $R^2= 0.998$
acide Gallique	$y=365,2x -38,923$; $R^2= 0.999$
acide caffeique	$y=359x+488,4$; $R^2= 0.997$
apigénine-6-C-glucoside	$y=179,52x+116,83$; $R^2= 0.999$
Kaempferol 3-rutinoside	$y=182,94x+96,644$; $R^2= 0.999$
Quercétine 3-glucoside	$y=336,36x+358,06$; $R^2= 0.998$
Kaempferol 3-glucoside	$y=236,33x+70,006$; $R^2= 1$
Isorhamentine 3-glucoside	$y=218,26x-0,98$; $R^2= 1$
Isorhamentine 3-rutinoside	$y=284,12x+67,055$; $R^2= 0.999$
Quercétine -3-rutinoside	$y=280,87x+373,73$; $R^2= 0.998$

Chapitre 2 : Activités biologiques

1- Activités antioxydantes

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (Cao & Prior., 1998).

1-1 Test antioxydant DPPH

Cette activité est évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (figure 14), qui est un radical libre stable de forme synthétique.

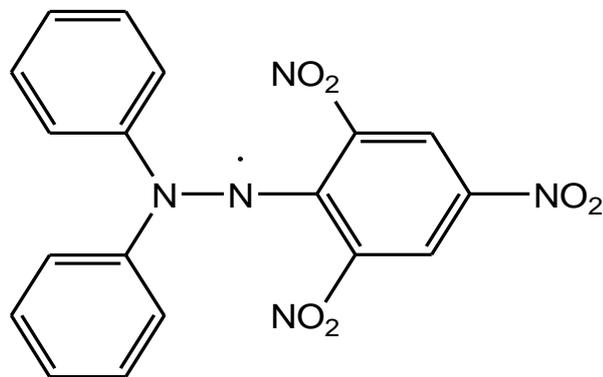


Fig 14: La formule du DPPH.

L'utilisation de ce radical permet l'évaluation de l'activité antioxydante de nombreux composés y compris les métabolites secondaires. La première étape de la réaction est la capture d'un atome d'hydrogène du composé phénolique par le radical DPPH, pour donner du diphénylpicrylhydrazine et un radical phénoxy (figure 15).

Cette étape est la première d'une série de réactions telles que des fragmentations, additions ou autres qui peuvent éventuellement influencer les résultats obtenus, notamment les cinétiques de la capture du DPPH par le composé testé (Chaabi., 2008).

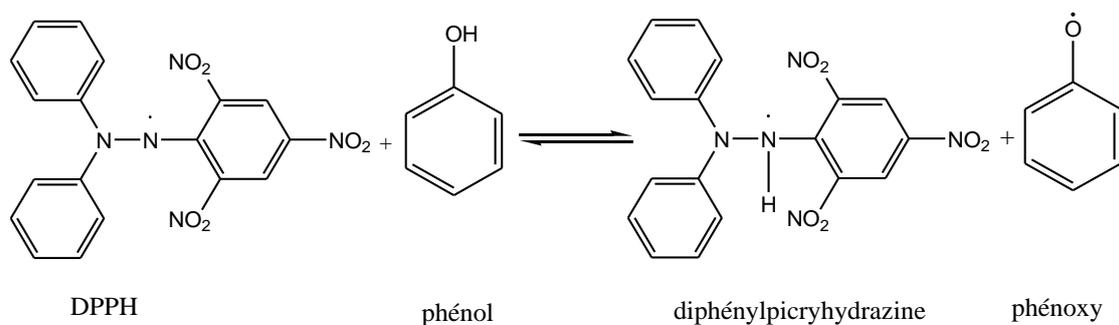


Fig 15: Réaction du radical DPPH avec un phénol.

L'utilisation du DPPH présente plusieurs avantages :

- Il forme un spectre caractéristique et facile à détecter.
- Il est stable au cours du temps.
- Il est compatible avec tous les solvants utilisés.

Le piégeage du radical DPPH se traduit par le changement de la couleur de la solution « violet » à une couleur « jaune », ce qui permet de suivre la décoloration à une longueur d'onde de 517nm (Chaabi., 2008).

Le protocole suivi est celui de Braho *et al.*, (2013), où l'activité antioxydante des extraits éthanoliques des feuilles, graines, et racines était évaluée en prenant 2 ml de chaque extrait à une concentration égal à 1mg/ml (à partir de la quelle une gamme de concentration allant de 1mg/ml jusqu'à 0,1mg/ml) ajouté à 2 ml de la solution DPPH (0,0394g/l).

L'acide ascorbique était utilisé comme un standard positif. Toutes les expériences ont été répétées 3 fois.

L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre à 517 nm après 30 min d'incubation dans l'obscurité à température ambiante. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antioxydante} = [(Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}) / Abs \text{ contrôle}] \times 100.$$

La valeur d'IC 50 a été déduite à partir des résultats obtenus, dont 50% de radicaux libres ont été piégés. Une faible valeur de l'IC50 indique une forte capacité à neutraliser le radical libre DPPH.

1-2 Test antioxydant de molybdate

La méthode de phosphomolybdate est basée sur la réduction de molybdène par les antioxydants non enzymatiques ce qui entraîne la formation d'un complexe de molybdène vert (Sudha *et al.*, 2011).

Un volume de 0,1 ml de chaque extrait éthanolique (feuilles, graines et racines) a été ajouté à 1 ml d'une solution contenant (0,6 M acide sulfurique, phosphate de sodium 28 mM et 4 mM de molybdate d'ammonium).

Tous les tubes ont été bien fermés et incubé à 90°C pendant 90 min. Après incubation et refroidissement, l'absorbance a été lue à 695nm contre un blanc.

L'acide ascorbique a été utilisé comme un contrôle positif et les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique mg par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait). Toutes les expériences ont été répétées 3 fois.

1-3 Test du pouvoir réducteur FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le Fe^{2+} à un pH faible forme un complexe avec la 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm.

Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur qui détermine la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues sont comparées avec l'absorbance d'un témoin qui est l'acide ascorbique usuellement (Benzie & Strain., 1996, Pulido., 2000).

Le pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles, des graines et les racines a été déterminé selon le protocole de Amarowicz *et al.*, (2010).

Un volume de 1 ml de chaque extrait dissous dans de l'eau désionisée a été ajouté à 2,5 ml de tampon phosphate (pH 6,6) et 2 ml de ferricyanure de potassium (1%). Après 20 min à 50 ° C, un volume de 2,5 ml d'acide trichloroacétique (10%) a été ajouté au mélange et centrifugé pendant 10 min à 3000Tr / min. Un volume de 2,5ml de la couche supérieure (surnageant) a été mélangé avec 2,5ml d'eau désionisée et 0,5 ml de (0,1%) de solution de chlorure ferrique ($FeCl_3$).

L'absorbance a été mesurée à 700 nm, dont l'absorbance la plus élevée indique le pouvoir réducteur le plus important. Toutes les expériences ont été répétées en triple, et les valeurs de l'IC50 ont été calculées à partir de l'absorbance graphique.

2- Activités Pharmacologiques et Toxicologique

Les animaux utilisés dans l'expérimentation sont soit des rats albinos ou les lapins de sexe male. Les conditions de vie étaient les mêmes pour toutes les activités, et qui sont mentionnées ci-dessous :

➤ **Les rats**

Les rats mâles *Albinos*, de la souche *Wistar*, proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger, pesant entre 100 et 300g.

L'élevage a été effectué dans le laboratoire de la Pharmacologie et Toxicologie à Université de constantine¹, avec un cycle photopériodique naturel. La température dans le laboratoire est $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Les animaux sont logés, dans des cages d'aluminium chacun porte 4 animaux, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. La litière utilisée est la sciure, renouvelée trois fois par semaine pour assurer le bon état hygiénique des animaux.

➤ **Les lapins**

Des lapins mâles, âgés de 2 à 3 mois et pesant 1,5 à 1,9 Kg, ont été utilisés dans cette étude. Ces animaux ont été fournis par une ferme d'élevage de la ville de Constantine.

Ils sont gardés à l'animalerie de l'Université pendant au moins une semaine avant l'expérience, dans des cages individuelles. La nourriture et l'eau ont été fournis ad libitum et le cycle lumière-obscurité était de 12 heures, avec une température de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et une humidité relative de 60 %.

Toutes les procédures expérimentales adoptées étaient en conformité avec les directives internationales pour la protection des animaux.

2- 1 Toxicité aigue

2-1-1 Administration par voie orale (per Os)

Les rats mâles *Wistar albinos* adultes, pesant entre 100 et 250 g, ont été répartis en Cinq groupes expérimentaux renfermant chacun 06 rats :

- Un groupe d'animaux témoins.
- Quatre groupes d'animaux traités.

Chaque lot reçoit une dose unique de l'extrait. Les animaux sont placés dans des cages spéciales quelques jours avant l'expérience.

Après avoir soumis les animaux à jeun pendant 24 heures, un volume de 1ml des différentes solutions est administré par gavage à l'aide d'une sonde rigide à bout olivaire (figure 16). La dose administrée est exprimée en mg/kg de poids corporel.



Fig 16: Administration de l'extrait par la sonde.

Pour ce test, des lots de rats reçoivent per os des doses croissantes du produit à tester. Cette procédure permet de déterminer la plus forte des faibles doses qui donne 0% de mortalité et la plus faible des fortes doses qui donne 100 % de mortalité.

Des dilutions sont effectuées entre ces deux valeurs extrêmes afin de déterminer la dose létale 50 %.

Après l'administration de l'extrait reconstitué dans l'eau distillée aux doses de 500, 2500, 5000 et 10000 mg/Kg et l'eau distillée seule pour le lot témoin, les animaux sont observés toutes les 30 minutes pendant 8 heures le premier jour et tous les jours pendant 14 jours à la recherche d'éventuels signes de toxicité retardée (Osorio Esquivel *et al.*, 2012) . Ils ont aussi été pesés pour suivre l'évolution de leur poids.

Pendant cette période d'observation, on note le nombre de morts ainsi que les troubles symptomatiques. Après dissection, les organes (rein, rate, foie, poumons et cœur) sont observés macroscopiquement *in-situ*, prélevés, débarrassés de l'excès de graisse, séchés avec du papier filtre et pesés.

Les organes prélevés (rein, rate, foie, poumon et cœur) sont conservés dans une solution de formol à 10% pour des études anatomopathologiques.

2-1-2 Administration par voie intrapéritonéale (IP)

Pour permettre une meilleure biodisponibilité du principe actif, le test de toxicité aigüe a été réalisé par injection intrapéritonéale de l'extrait hydroalcoolique de *C. arabica* à un groupe de 24 rats albinos de poids allant de 100 et 250 g, élevés à l'animalerie du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'institut des sciences vétérinaires, université des frères Mentouri, Constantine1.

Les animaux ont été répartis en 4 lots, de six rats chacun et mis à jeun pendant 24 heures. Ces groupes ont reçu par voie intrapéritonéale les extraits reconstitués dans de l'eau distillée des doses de 750 et 1500 et 3000mg/kg de poids corporel et de l'eau distillée pour le lot témoin (figure 17).



Fig 17: Administration de l'extrait par voie intrapéritonéale (IP).

Les rats ont été ensuite observés durant les deux premières heures suivant l'administration des extraits. Puis, ils ont reçu l'eau et l'alimentation *ad libitum*.

L'observation des animaux s'est poursuivie pendant 14 jours à la recherche d'éventuels signes de toxicité retardée.

Le dénombrement de morts ainsi que les troubles symptomatiques sont notés jusqu'au 14^{ème} jour après l'administration des extraits (Nene BI *et al.*, 2008).

La dose létale DL50 d'un extrait égale à la dose qui entraîne la mort de 50% de l'effectif des rats d'un lot.

La DL50 est déterminée par la méthode graphique de Miller & Tainter., (1944). La valeur de la DL50 permet de classer les extraits étudiés sur l'échelle de toxicité proposée en 1980 par Hodge et Sterner chez le rat ou la souris (Hodge & Sterner., 1943) :

- **Extrêmement toxique** : DL50 < 1 mg/kg P.c ;
- **Très toxique** : DL50 de 1 à 50 mg/kg P.c ;
- **Moyennement toxique** : DL50 de 50 à 500 mg/g P.c ;
- **Faiblement toxique** : DL50 de 500 à 5000 mg/kg p.c ;
- **Pratiquement non toxique** : DL50 de 5000 à 15000 mg/kg P.c ;
- **Relativement sans danger** : DL50 > 15000 mg/kg P.c.

2- 2 Toxicité larvicide sur les larves *Artemia salina*

➤ **Préparation des *Artemia***

Les œufs d'*Artemia salina* ont servi à la réalisation du test. Pour cela, il faut préparer 2g d'œufs, ils sont mis à éclore dans une cuve contenant 1 litre d'eau de mer reconstitué à 70% sous oxygénation.

Remarque : la préparation s'effectue la veille, l'éclosion étant supérieure à 80% en 24 heures.

➤ **Paramètres de culture**

- Température : il est préférable de la maintenir entre 25 et 30°C ; si ce paramètre n'est pas respecté le métabolisme du cyste est stoppé de façon irréversible.
- Salinité : favorable entre 20 et 25 g/l.
- Aération : permet d'homogénéiser le milieu et de favoriser l'éclosion.
- Eclairage : une lumière artificielle continue favorise un meilleur rendement. (Geneviève & Caporalino-Djian., 1994).

➤ **Eclosion des nauplii**

Au bout de 30 heures, le bullage est stoppé pour récolter les *nauplii*. Une source lumineuse est dirigée vers le bas de la cuve. Par phototropisme, les larves se séparent des œufs non éclos et des débris d'œufs. Il suffit alors de les recueillir pour procéder à la réalisation des tests (figure 18).



Fig 18: Culture des larves d'*Artemia salina*.

➤ **Préparation des extraits**

Les extraits hydroalcooliques secs des feuilles, graine, racine et partie aérienne de *C. arabica* sont pesés avec précision et dilués dans l'eau de mer reconstituée afin de réaliser les différentes concentrations.

Chaque extrait est testé aux concentrations : 100, 250, 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$, pour la réalisation de ce test, des plaques de 24 puits ont été utilisées (figure 19).

La solution d'extrait à tester est ajoutée dans les puits contenant les larves. A l'aide d'une pipette Pasteur, dix larves sont transférées dans chaque puits. Le volume est ensuite ajusté à 3ml avec de l'eau de mer reconstituée à 70%.

Une série de puits de témoins positifs est réalisée aux concentrations suivantes : 100, 250, 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ avec le sulfate de cuivre, et des puits de témoins négatifs réalisés avec l'eau de mer. Les préparations sont ensuite laissées 24 heures.

Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution et les témoins.

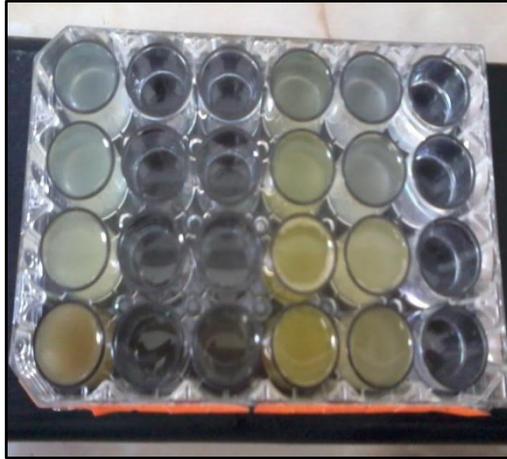


Fig 19: Plaque de 24 puits contenant les larves et des différents extraits.

➤ **Lecture des résultats**

Après 24 heures et ensuite 48 heures, le nombre de larves survivantes est compté dans chaque puits et la mortalité calculée à chaque concentration (figure 20).



Fig 20: Les larves sous microscope.

Le pourcentage de mortalité chez les témoins est évalué en utilisant la formule :

$$\% m = \text{NLm} / (\text{NLtotal} - \text{NNy})$$

%m : Pourcentage de mortalité.

NLm : Nombre de larves mortes.

NL total : Nombre de larves total.

NNy : Nombre de nymphes.

Le test est considéré valide si le pourcentage de mortalité chez les témoins est inférieur à 5% ou compris entre 5% et 20%.

- Si le pourcentage de mortalité chez les témoins est compris entre 5% et 20%, la mortalité après exposition doit être corrigée en utilisant la formule d'Abbott (OMS., 2004).
- Si la mortalité chez les témoins excède 20 %, le test est invalide et doit être recommencé.

$$\% \text{ Mortalité corrigée} = (\% \text{ Mort.Observée} - \% \text{ Mort.Témoin}/100 - \% \text{ Mort.Témoin}) \times 100$$

A partir des résultats, la concentration létale 50% (CL50) reflétant la toxicité des produits, est estimée (tableau 10) :

Tab 10: Estimation de la toxicité.

CL50	Toxicité
CL50 \geq 1000 μ g/ml	-
1000 μ g/ml > CL50 \geq 500 μ g/ml	+
500 μ g/ml > CL50 \geq 250 μ g/ml	++
250 μ g/ml > CL50 \geq 100 μ g/ml	+++

2- 3 Etude de l'effet hémolytique des extraits de *Cleome arabica*

Ce test d'effet hémolytique de la plante étudiée est réalisé selon la méthode de Guo-Xiang & Zai-Qun., (2008) avec une légère modification.

Des échantillons de sang des lapins ont été recueillis dans des tubes héparines. Après centrifugation à 1500 rpm pendant 5 min, le surnageant est éliminé, le culot est lavé trois fois par une solution tampon phosphate salin PBS (125 mM NaCl ,10mM de diphosphate de sodium, pH 7.4), la dernière centrifugation dure 10 min. Le culot cellulaire obtenu est dilué avec la solution PBS pour obtenir un hématocrite de 2%.

Les extraits hydroalcooliques des quatre parties (feuille, graine, partie aérienne et racine) de *C. arabica* sont dilués dans du tampon phosphate salin pour obtenir les différentes concentrations 20, 10, 5 et 1mg/ml.

Dans chaque tube 1ml d'extrait à différentes concentrations ; 2,5ml de tampon phosphate salin (PBS) et 3,5 ml de la suspension érythrocytaire préparée sont ajoutés. On mélange les tubes délicatement et on les laisse dans un incubateur agitateur à 37°C durant 60 min.

La lecture de l'absorbance de chaque tube est effectuée à 630nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible après leur centrifugation à 1500 tour/minute durant 5 min contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes démarches expérimentales. Il est composé de la suspension érythrocytaire et de la solution tampon de PBS, en absence d'extrait. Un tube d'hémolyse totale contient la suspension érythrocytaire et Saponine. L'expérience est répétée trois fois, et le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{[(\text{Abs de l'extrait} - \text{Abs de témoin négatif}) / \text{Abs hémolyse totale}] \times 100}{1}$$

2- 4 Détermination de l'activité antalgique

2-4-1 Test de tail flick

Une heure après l'administration orale de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *Cleome arabica*, la queue de chaque animale est placée dans de l'eau chaude maintenue à 55°C. Le temps que met l'animal pour retirer sa queue est mesuré et considéré comme temps de réaction. (Al-Sobarry *et al.*, 2013).

Le gavage a été fait à l'aide d'une sonde gastrique, dont chaque des lots reçoit comme suit :

Lot 1 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *Cleome arabica*, à la dose de 250mg/kg de poids corporel.

Lot 2 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *Cleome arabica*, à la dose de 500mg/kg, de poids corporel.

Lot 3 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *Cleome arabica*, à la dose de 1000 mg/kg, de poids corporel.

Lot témoin : de l'eau distillée à raison de 1 ml/Kg de poids corporel.

Lot de référence : un analgésique utilisé en thérapeutique l'Acide acétylsalicylique à la dose de 100 mg/ kg de poids corporel.

2-4-2 Test de la plaque chauffante

Ce test consiste à déposer le rat sur une plaque chauffante réglée à 55°C, une heure après l'administration de l'extrait à différentes doses pour les lots traités, l'eau distillée pour le lot témoin, et l'acide acétylsalicylique pour le lot de référence. Le chronomètre est déclenché dès que les pattes de rat touchent la plaque.

Les seules réponses à considérer chez le rat sont le léchage des pattes, les sauts réalisés par le rat sur la plaque et ses réactions à vouloir quitter la plaque chauffante. D'autres types de comportements ne sont pas pris en compte.

Le temps de réaction est mesuré au moment où le rat est maintenu sur la plaque chauffante pendant une durée de 30 seconds maximums.

Ces temps de réaction des animaux traités sont comparés à ceux des rats ayant reçu uniquement de l'eau distillée (Vaz *et al.*, 1996, Le Bars *et al.*, 2001).

Les lots sont répartis comme suit :

Lot 1 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *Cleome arabica*, à la dose de 250mg/kg de poids corporel.

Lot 2 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *Cleome arabica*, à la dose de 500mg/kg, de poids corporel.

Lot 3 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *Cleome arabica*, à la dose de 1000 mg/kg, de poids corporel.

Lot témoin : de l'eau distillée à raison de 1 ml/Kg de poids corporel.

Lot de référence : un analgésique utilisé en thérapeutique l'Acide acétylsalicylique à la dose de 100 mg / kg de poids corporel.

2-4-3 Test de torsion

Les expériences ont été réalisées sur un modèle de douleur induit par l'acide acétique chez des rats mis à jeun 15 heures avant l'expérimentation.

L'injection intrapéritonéale d'acide acétique à 1% chez le rat provoque un syndrome douloureux qui se manifeste par des contorsions caractéristiques avec étirement des pattes postérieures et de la musculature dorso-ventrale.

Le nombre d'étirements est comptabilisé 15 minutes après injection de l'acide acétique (Sy *et al.*, 2009).

Le gavage a été fait à l'aide d'une sonde gastrique, dont chaque un des lots reçoit comme suit :

Lot témoin : de l'eau distillée à raison de 1 ml/Kg de poids corporel ;

Lot 1 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *C. arabica*, à la dose de 250mg/kg, per os ;

Lot 2 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *C. arabica*, à la dose de 500mg/kg, per os ;

Lot 3 : l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *C. arabica*, à la dose de 1000 mg/kg, per os ;

Lot 4 (référence) : un analgésique utilisé en thérapeutique l'Acide acetyl salicylique à la dose de 100 mg/ kg, per os.

Une heure après le gavage, une solution d'acide acétique à 1%, est injectée par voie intra-péritonéale aux rats et le nombre de contorsions (NC) pour chaque rat a été compté, sur une durée de 15 minutes.

Les moyennes de contorsions dans les groupes traités ont été comparées au groupe témoin, et le pourcentage d'inhibition (PI) de la douleur a été obtenu à partir de la formule suivante :

$$PI \% = \frac{NCTe - NCTr}{NCTe} \times 100$$

Avec :

NCTe : nombre moyen des contorsions dans le lot témoin.

NCTr : nombre moyen des contorsions dans le lot traité.

2- 5 Effet de la cicatrisation chez le lapin

2-5-1 Essais sur les plaies de brûlures thermiques

Les lapins utilisés pour ce test sont anesthésiés par 50 mg/kg de chlorhydrate de kétamine après une tranquillisation par voie intramusculaire, avec 5 mg/kg de diazépam sur le lieu de l'expérimentation.

Le dos de l'animal a été rasé et épilé, ensuite, une brûlure a été faite en mettant une plaque métallique chauffée à 170°C sur la zone préparée pendant 10s. Après 250mg des extraits d'essai a été appliqués par voie topique sur la zone brûlée une fois par jour. (Farnood-Shokouhi *et al.*, 2012).

La zone brûlée a été mesurée immédiatement après la brûlure et chaque 3 jour jusqu'à ce que l'épithélialisation complète ait eu lieu à l'aide d'un pied à coulisse.

Plaie 1 : n'a reçu aucun traitement et a servi de témoin.

Plaie 2 : a reçu un traitement avec cicatryl® crème à raison de 250 mg.

Plaie 3 : a reçu l'extrait hydroalcoolique de *C. arabica* à la dose de 250 mg.

Le degré de cicatrisation de la plaie a été calculé selon la formule suivante :

Degré de cicatrisation de la plaie (%) =

$$\% = \frac{\text{Taille de la plaie initiale} - \text{taille de la plaie du jour spécifique}}{\text{Taille de la plaie initiale}} \times 100$$

2-5-2 Essais sur les plaies d'excision

Les propriétés cicatrisantes sont testées sur des plaies d'excision sur le dos des lapins. Ces derniers sont anesthésiés par 50mg/kg de chlorhydrate de kétamine après une tranquillisation par voie intramusculaire, avec 5 mg/kg de diazépam sur le lieu de l'excision.

Un lambeau de peau d'environ 17mm est excisé (Bensegueni *et al.*, 2007). Les lapins sont répartis en 4 lots :

Lot 1 : aucun traitement et serviront de témoin négatif.

Lot 2 : traité par cicatryl[®] crème à raison de 250 mg.

Lot 3 : traité par l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *C. arabica* à la dose de 250mg.

Les applications sont faites à raison d'une fois par jour pendant neuf jours. Les plaies ne sont pas protégées par un pansement.

Une étude planimétrique est mise en œuvre pour évaluer l'activité cicatrisante des extraits de *Cleome arabica*. Les diamètres des plaies d'excision des différents lots sont mesurés tous les trois jours.

Analyse statistique

Le logiciel EXCELSTAT 2014 a été utilisé pour toutes les analyses statistiques.

1- Rendement de l'extraction par l'éthanol

Le rendement de l'extraction hydroalcoolique a été calculé pour les 3 différentes parties de *C. arabica* : feuille, graine et racine (tableau 11).

Tab 11: Rendement de l'extraction hydroalcoolique.

Partie de plante	Rendement (g/100g) *
Feuille	13,33 ± 1,33
Graine	12,86 ± 0,19
Racine	5,53 ± 0,15

* valeur exprimée en moyenne ± ET (n=3)

Les résultats obtenus montrent que les feuilles présentent le taux en matière extractible le plus important et qui est de 13,33 ± 1,33 g/100g matière sèche (m/m). Un rendement de 12,86 ± 0,19 et 5,53 ± 0,15 g /100g matière sèche pour les graines et les racines respectivement.

2- Screening phytochimique

Les tests de caractérisation réalisés sur les différents extraits hydroalcoolique des feuilles, graines, et racines ont donné les résultats illustrés dans le tableau 12.

Tab 12: profil phytochimiques des différents extraits de *C. arabica*.

Métabolites secondaires	Feuille	Graine	Racine
Alkaloïdes	+++	-	-
Flavonoïdes	+++	++	+
Saponines	+++	+	+
Tannins	+++	++	+
Stéroïdes	+++	++	++
Triterpenes	+++	++	+
Coumarines	+++	++	+

+++ : Présence confirmée ; ++ : présence modérée ; + : présence en tant que trace ; - : absence.

Les résultats présentés dans le tableau 13 montrent une richesse relative en métabolites secondaires analysés de l'extrait des feuilles par rapport aux extraits des graines et racines.

L'extrait hydroalcoolique des feuilles, révèle la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, triterpènes, tannins, stéroïdes et coumarines.

L'analyse des graines montre une absence des alcaloïdes mais une présence plus au moins importante en flavonoïdes, saponines, triterpènes, stéroïdes et coumarine par rapport aux feuilles.

L'examen des racines montre notamment l'absence des alcaloïdes et une présence modeste des autres groupes de métabolites.

Nos résultats phytochimiques de *C.arabica* confortent avec les travaux précédents notamment concernant la présence des flavonoïdes dans les parties aériennes (Sharaf *et al.*, 1997, Intan *et al.*, 2005 et Touil & Rhouati., 1998). Les stéroïdes (Harraz *et al.*, 1995), et les alcaloïdes (Djeridane *et al.*, 2010, Takhi *et al.*, 2011).

3- Dosage spectrophotométrique

Les résultats du dosage des phénols totaux, flavonoïdes, et proanthocyanidines dans les différentes parties de la plante *C. arabica* sont illustré dans le tableau 13.

L'estimation du contenu en phénols totaux des différentes parties de *C. arabica* a été faite par rapport à l'acide gallique. La courbe d'étalonnage est illustrée dans la figure 21, et la teneur en phénols totaux est exprimée en mg équivalent acide gallique (EAG) par g d'extrait sec.

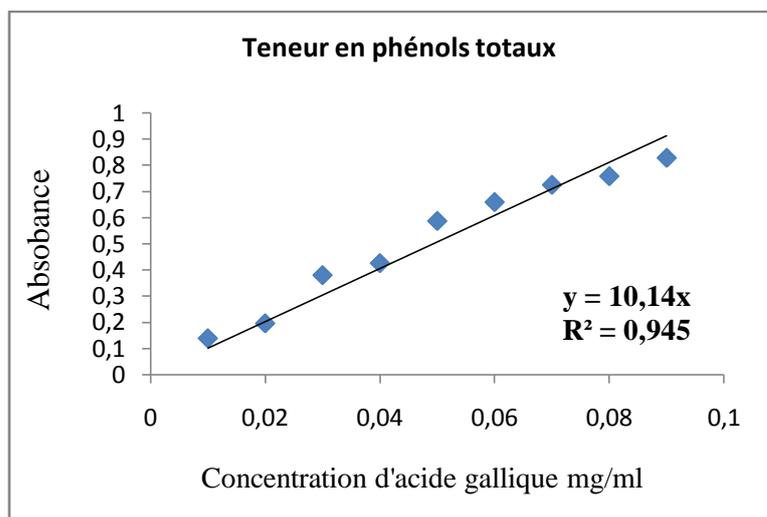


Fig 21: Courbe d'étalonnage des acides phénols totaux

L'évaluation des contenus en flavonoïdes dans les différents extraits de *C. arabica* a été réalisée par rapport à la rutine. La courbe d'étalonnage est illustrée dans la figure 22, et la teneur en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent rutine par g d'extrait sec.

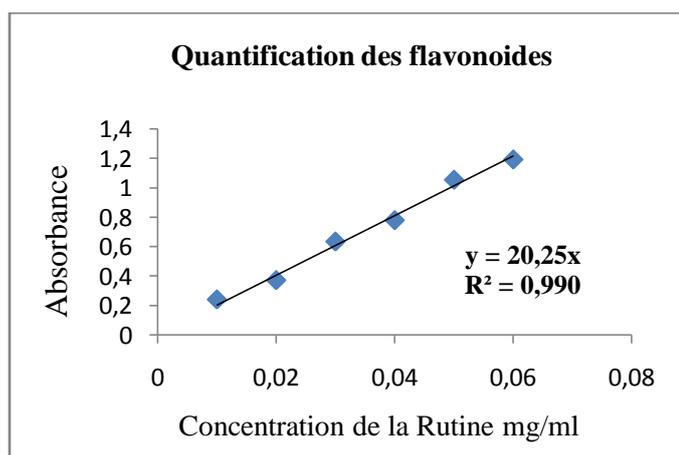


Fig 22: Courbe d'étalonnage des Flavonoïdes.

La méthode décrite par Vermerris & Nicholson., (2006) a permis de quantifier les proanthocyanidines dans les différents extraits hydroalcooliques en utilisant l'équation mentionnée précédemment dans le protocole. Les teneurs en proanthocyanidines sont exprimés en mg équivalent cyanidine par g d'extrait sec.

Les résultats du dosage des phénols totaux, flavonoïdes et proanthocyanidines des les extraits des feuilles, graines et racines figurent dans le tableau 13.

Tab 13: Quantification des phénols totaux, flavonoïdes, et proanthocyanidines.

Extrait	Phenols totaux A,* (mg EAG/g d'ext)	Flavonoides B,* (mg ER /g d'ext)	Proanthocyanidines C,* (mg EC/g d'ext)
Feuille	35,17 ± 0,01	11,35 ± 0,01	5,15 ± 0,01
Graine	28,86 ± 0,01	5,31 ± 0,01	7,77 ± 0,02
Racine	14,53 ± 0,01	2,91 ± 0,01	4,49 ± 0,01

A: Polyphenols exprimés en mg equivalent acide gallique /g d'extrait; B: Flavonoides exprimés en mg equivalent Rutine/g d'extrait; C: Proanthocyanidines exprimés en mg cyanidine/g d'extrait; *: valeurs exprimées en moyennes ± Ecartype (n=3).

L'estimation quantitative des différents extraits hydroalcooliques des feuilles, graines, et racines de *C. arabica* révèle que l'extrait des feuilles présente la quantité la plus importante en phénols totaux et aussi en flavonoïdes (35,17 ± 0,01 mg EAG/g d'extrait, et 11,35 ± 0,01mg ER/g d'extrait) avec une quantité plus au moins modérée en proanthocyanidines (5,15± 0,01 mg EC/g d'extrait).

Le taux estimé des proanthocyanidines dans l'extrait des graines est plus élevé (7,77± 0,02 mg EC/g d'extrait) en le comparant avec l'extrait des feuilles et des racines alors que le taux des phenols totaux et flavonoides sont estimés à 28,86±0,01 mg EAG/g d'extrait, et 5,31±0,01mg ER/g d'extrait respectivement.

L'extrait des racines révèle les quantités les plus faibles en phénols totaux, flavonoïdes et aussi proanthocyanidines avec des taux égales à 14,53 ± 0,01 mg EAG/g d'extrait, 2,91 ± 0,01mg ER/g d'extrait, et 4,49 ± 0,01mg EC/g d'extrait respectivement.

Quelques travaux ont été faits sur la plante *C.arabica*, citant; Djeridane et ses collaborateurs (2010) qui rapportent que le dosage des phenols totaux et des flavonoides sont estimé à 2,17 et 1,35 mg/g de matière sèche.

L'étude de Takhi *et al.*, 2011 estime que les phénols totaux sont égales à 191,20mg/100g des feuilles de *C. arabica*.

Tigrine *et al.*, 2013 rapportent que l'estimation des phénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait des feuilles de *C.arabica* est de $322,1 \pm 3,44$ mg EAG/g d'extrait et $245,6 \pm 4,67$ mg EQ/g d'extrait respectivement.

Nos résultats estimés en mg/100g de matière sèche des feuilles sont en accords avec les travaux de Tigrine *et al.*, 2013. (Taux en PT = 468,81 mg/100g, taux en flavonoïdes = 151,29 mg/100g).

4- Analyse HPLC/DAD/MS

L'analyse par HPLC/DAD/MS a permis d'identifier et quantifier les acides phénols et les flavonoïdes des trois extraits (Feuille, graine et racine).

Les extraits ont été analysés dans deux longueurs d'ondes différentes à 280 nm pour l'identification des acides phénols et à 370 nm pour l'identification des flavonoïdes.

Les résultats de l'analyse qualitative et quantitative effectuée par HPLC/DAD/MS des trois extraits hydroalcoolique (feuilles, graines, et racines) sont présentés dans les tableaux (14, 15, 16). Les spectres chromatographiques à 280 nm et 370 nm respectifs sont illustrés dans les figures (23, 24, 25, 26, 27, 28).

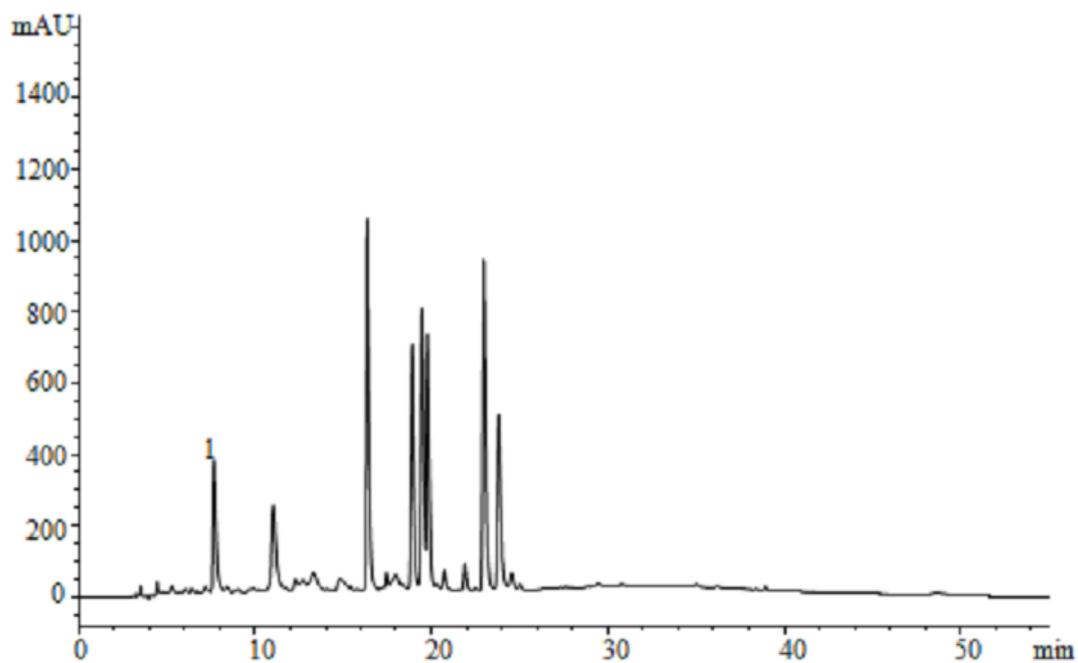


Fig 23: Chromatogramme de l'extrait des feuilles à 280 nm.

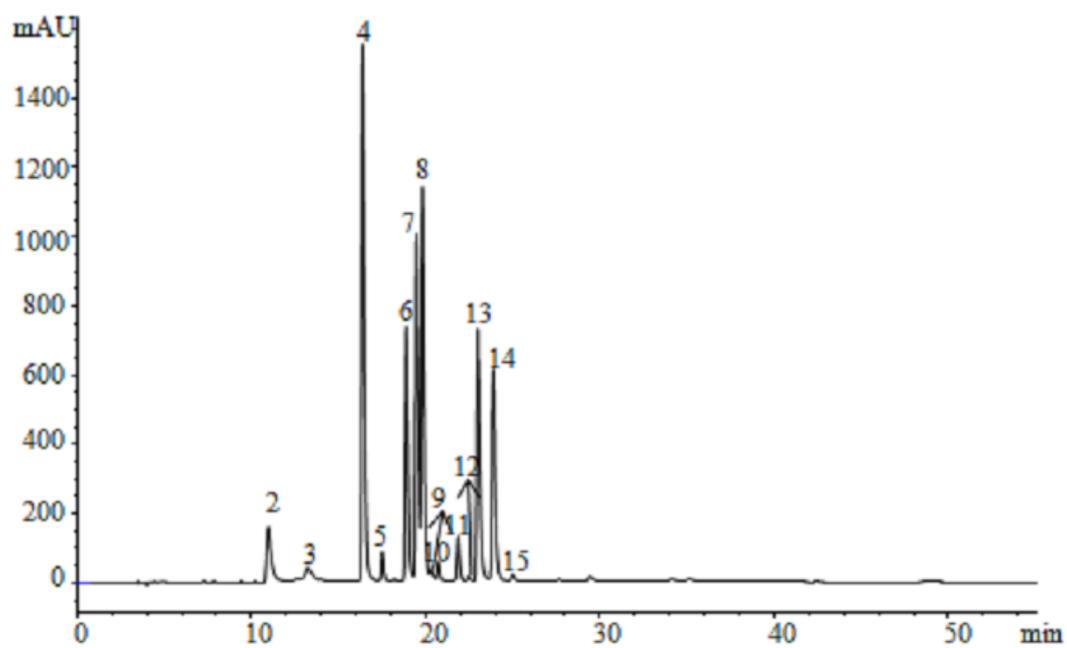


Fig 24: Chromatogramme de l'extrait des feuilles à 370 nm.

Tab 14: Résultats analyse HPLC/DAD/MS de l'extrait des feuilles de *C.arabica*

Composé	tr (min)	λ	[M-H]-	Fragments	Identification	Quantification mg/g
1	7,69	278	289	245	catechine	1,234 ± 0,011
2	11	338	593	503, 473, 383, 353, 325, 297	Apigénine -6-C-hexoside-8C-hexoside	1,585 ± 0,103
3	12,3	272	307	145	Cleomine hexoside	N'est pas quantifié
4	16,53	354	609	463, 447, 300	Quercétine rutinoside	5,46 ± 0,106
5	17,51	354	651	447,301	Quercétine acylhexoside rhamnoside	0,175 ± 0,022
6	18,92	350	593	447, 431, 285	Kaempferol rutinoside	3,814 ± 0,148
7	19,45	348	593	447, 301	Quercétine dirhamnoside	2,662 ± 0,057
8	19,78	354	623	477, 461,315	Isorhamnetine rutinoside	4,565 ± 0,179
9	20,34	354	463	301	Quercétine 3-glucoside	0,031 ± 0,005
10	20,77	346	635	489, 431, 285	Kaempferol rhamnoside acylhexoside	0,258 ± 0,007
11	21,87	356	665	519, 461, 315	Isorhamnetin acylhexoside rhamnoside	0,428 ± 0,023
12	22,47	356	593	461, 315	Isorhamnetine pentoside rhamnoside	0,065 ± 0,0002
13	23,00	342	577	431, 285	Kaempferol dirhamnoside	3,116 ± 0,066
14	23,82	348	607	461, 315	Isorhamnetine dirhamnoside	2,932 ± 0,056
15	25,01	356	477	315	Isorhamnetine hexoside	0,124 ± 0,002

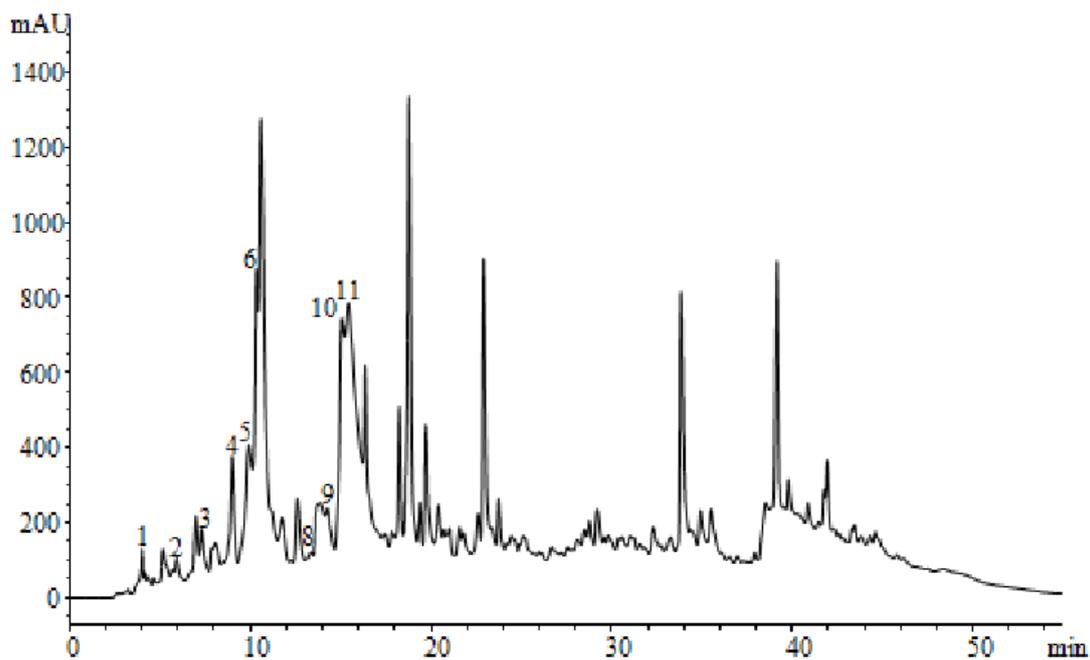


Fig 25: Chromatogramme d'extrait des graines à 280nm.

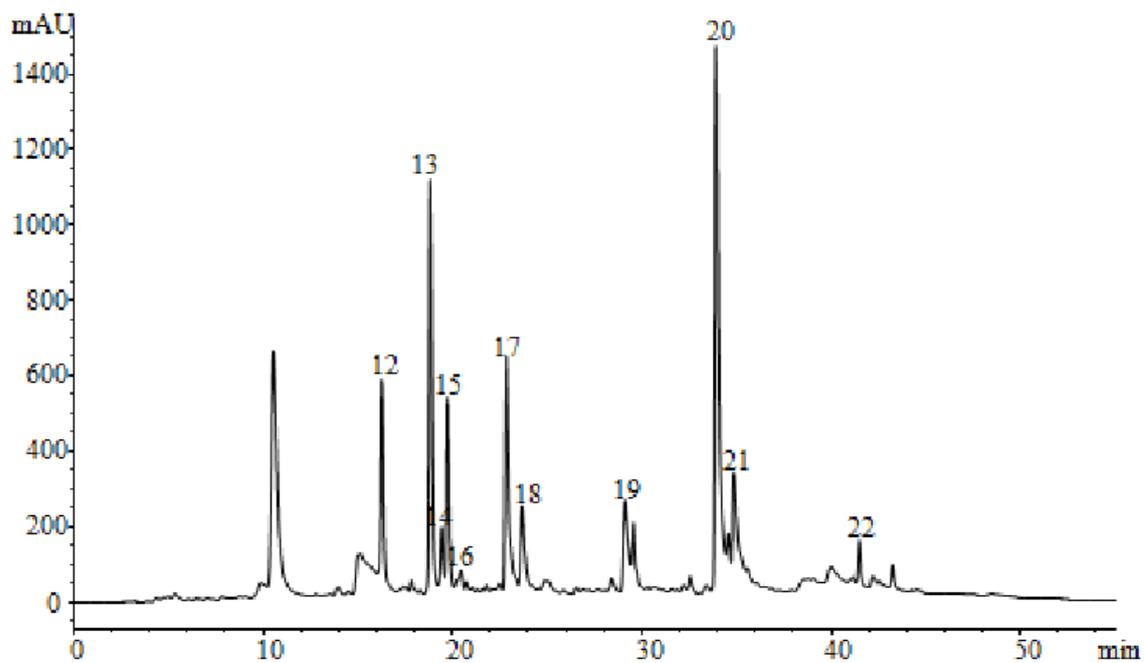


Fig 26: Chromatogramme d'extrait des graines à 370 nm.

Tab 15: Résultats HPLC/DAD/MS de l'extrait des graines de *C. arabica*

Composé	tr (min)	λ	[M-H]-	Fragments	Identification	QUANTIFICATION mg/g
1	4,03	254/290	315	153	acide 3,4-dihydroxybenzoïque hexoside	0,003 ± 0,001
2	5,92	260/296	153	109	acide 3,4-dihydroxybenzoïque	0,004 ± 0,001
3	7,28	280	577	119	Acide p-coumarique Dimere	0,021 ± 0,001
4	9,07	254	137		Acide p-OH benzoïque	0,024 ± 0,01
5	9,8	324	509	452,436,332,296,236, 193	Derivé acide ferulique	TRACES
6	10,2	280	289	245	Catechine	0,15 ± 0,014
7	10,57	334	593	503, 473, 383, 353, 325, 297	Apigénine -6-C-hexoside-8C-hexoside	0,149 ± 0,014
8	13,3	280	203	159, 142	Tryptophane	N'est pas quantifié
9	14,2	312	551	405, 275, 163	derivé acide p-coumarique	TRACES
10	15,03	326	581	435, 295, 235, 193	derivé acide Ferulique	0,036 ± 0,006
11	15,38	310	611	325, 223	derivé acide Sinapique	0,167 ± 0,037

12	16,3	356	609	463, 447, 300	Quercetin rutinoside	0,029 ± 0,001
13	18,8	352	593	447, 431, 285	Kaempferol rutinoside	0,121 ± 0,007
14	19,4	352	593	447, 301	Quercetine dirhamnoside	0,009 ± 0,0001
15	19,7	356	623	477, 461, 315	Isorhamnetine rutinoside	0,034 ± 0,004
16	20,2	354	463	301	Quercetine hexoside	TRACES
17	22,9	342	577	431,285	Kaempferol dirhamnoside	0,064 ± 0,001
18	23,7	348	607	461, 315	Isorhamnetine dirhamnoside	0,031 ± 0,002
19	29,16	370	447	301	Quercetin rhamnoside	0,021 ± 0,001
20	33,8	368	431	285	Kaempferol 4' rhamnoside	0,173 ± 0,016
21	34,9	374	461	315	Isorhamnetine 4' rhamnoside	0,044 ± 0,002
22	41,5	374	331	315	Laricitrine	0,006 ± 0,001

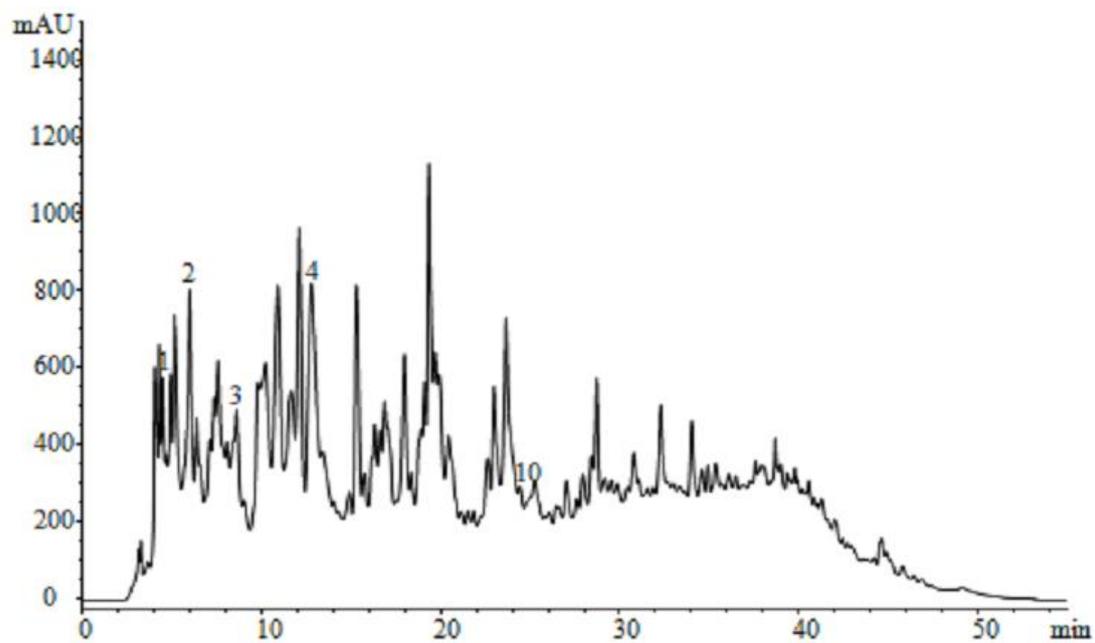


Fig 27: Chromatogramme d'extract des racines à 280 nm.

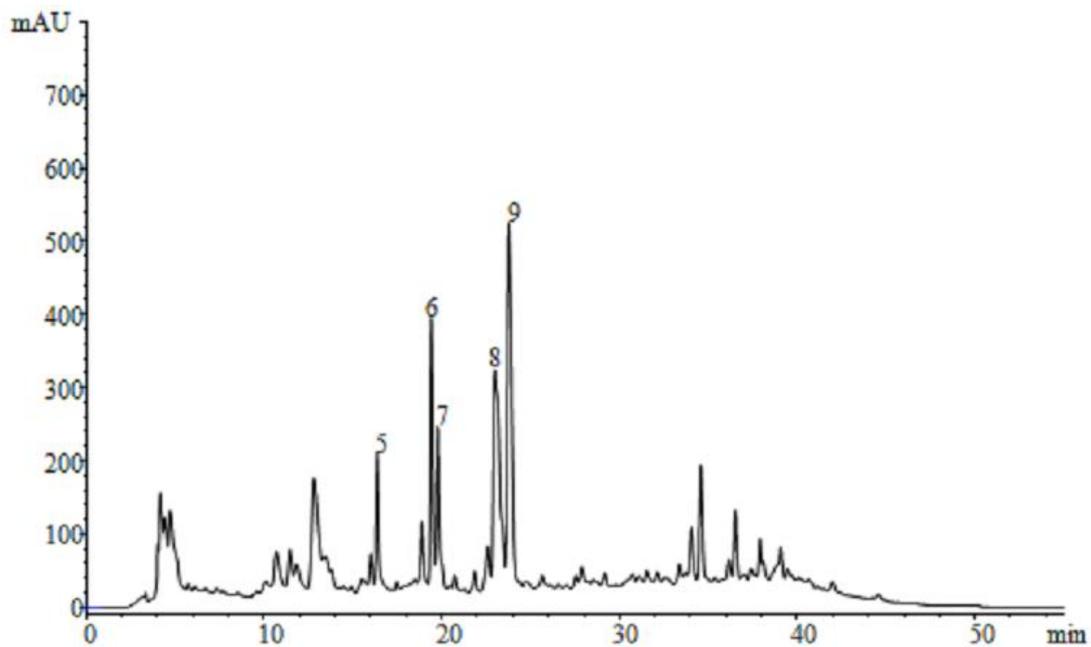


Fig 28: Chromatogramme d'extract des racines à 370 nm.

Tab 16: Résultats HPLC/DAD/MS de l'extrait des racines de *C. arabica*.

Peak	tr (min)	λ	[M-H]-	Fragments	Identification	QUANTIFICATION mg/g
1	4,47	250/290	474	167	Derivé acide vanillique	0,004 ± 0,0001
2	5,93	276	475	414, 374, 332, 169	Derivé acide gallique	0,017 ± 0,002
3	8,61	254/292	473	329, 167	Derivé acide vanillique	0,012 ± 0,002
4	12,8	330	355	193	Derivé acide ferulique	0,006 ± 0,003
5	16,3	356	609	463, 447, 301	Quercetine rutinoside	0,006 ± 0,0003
6	19,4	350	593	447, 301	Quercetine dirhamnoside	0,011 ± 0,0003
7	19,7	360	623	477, 461,315	Isorhamnetine rutinoside	0,01 ± 0,0005
8	22,9	344	577	431, 285	Kaempferol dirhamnoside	0,033 ± 0,0001
9	23,70	346	607	461, 315	Isorhamnetine dirhamnoside	0,044 ± 0,0005
10	24,4	326	677	535, 353	acide tricaffeoylquinique	0,002 ± 0,0001

Les résultats montrent que la composition de l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *C.arabica* est marqué surtout par la présence des flavonoïdes principalement de type flavonol avec la seule mention d'un composé de type flavanol qui est la catéchine.

Les quatre génines de type flavonol identifiés sont quercétine, isorhamnetine, keampferol, et apigénine avec des pourcentages de 31,5%, 30,65%, 27,18%, 6% respectivement. Une seule molécule de type flavanol était identifiée comme catéchine et estimée présente avec un taux de 4,67%.

Les résultats montrent que la composition de l'extrait hydroalcoolique des graines de *C.arabica* est marquée par la présence des acides phénols et des flavonoides avec des taux de 23,48 et 76,52% respectivement.

Le profil des acides phénols est marqué par la présence d'un acide sinapique, férulique, acides para-hydroxy benzoïque, para-coumarique, et d'autres acides mineurs.

En général, le profil flavonique de l'extrait hydroalcoolique des graines est qualitativement comparable à celui de l'extrait des feuilles, à l'exception de la présence dans l'extrait des graines un flavonoïde de type flavonol qui est le laricitrine. Ce dernier a été identifié dans plusieurs espèces comme le fruit de *Vitis vinifera L* (Nazareth Torres *et al.*, 2017), le fruit et le jus de *Syzygium cumini. L* (Carvalho *et al.*, 2017), *Vaccinium myrtillus*, et *Ribes nigrum* (Tian *et al.*, 2017).

Sur le plan quantitatif, l'extrait des graines présente un contenu relativement plus faible en flavonoides par rapport à celui des feuilles, et avec des pourcentage de présence différents dont le keampferol est dominant avec un taux de 43,08%, suivi par la catéchine 18,05%, et l'apigénine 17,93%. L'isorhamnetine et la quercétine sont présentent avec un taux moins important 13,12, et 7,10%, et finalement laricitrine avec un pourcentage de 0,72%.

Le composé détecté à 12,3 mn est identifié comme la cléomine hyxoside par rapport à la littérature (Intan *et al.*, 2005).

L'analyse de l'extrait hydroalcoolique des racines révèle aussi le même profil flavonique. On note la présence des hétérosides quercétine, isorhamnetine, keampferol, à l'exception de l'apigénine et ses dérivés. Les flavonoides sont présents au niveau des racines avec un taux de 71,72% par rapport au contenu global identifié de l'extrait racinaire.

Les résultats montrent aussi un profil des acides phénols différents des graines par la présence de l'acide tricaffeoylquinique, dérivé de l'acide gallique, dérivé de l'acide ferulique et deux dérivés de l'acide vanillique et qui sont présents avec un taux de 28,28% du contenu identifié.

Les résultats obtenus sont conformes aux ceux de Touil & Rhouati (1998), qui ont signalé la présence de dérivés d'apigénine, de quercétine et de kampferol dans la partie aérienne de *Cleome arabica*.

Sharaf *et al.*, (1997) ont analysé quatre espèces de *Cleome*, spécialement *Cleome amblyocarpa*, et ils ont confirmé la présence du Kaempferol 7-Rha et ses dérivés, Quercétin 7-Rha, Isorhamnetin et ses dérivés, Apigénin 6,8-di-CG.

De même, les travaux d'Intan *et al.*, (2005) sont en accord avec nos résultats.

En 2015, les travaux de Samout et ses collaborateurs lors d'une analyse par HPLC sur les feuilles et les tiges de *C. arabica* concordent avec nos résultats par la présence des molécules de type acides phénols (acide protocatecique, gallique, hydroxybenzoïque, vanillique, et acide syringique) et flavonoides (Quercétine, keampferol, isorhamnetine avec mention de la luteoline).

On note que les données obtenues par HPLC/DAD/MS s'accordent avec ceux obtenus par le dosage spectrophotométrique. Les teneurs les plus élevées en phénols totaux et en flavonoides sont identifiées dans l'extrait des feuilles, suivi par l'extrait des graines, et en dernière position l'extrait des racines.

5- Activités antioxydantes

Le potentiel antioxydant des différentes parties de *C.arabica* mesuré par les trois tests (DPPH, FRAP, PHOSPHOMOLYBDENUM) et est corrélé avec leurs contenus en phénols totaux et flavonoides.

5-1 Activité antioxydante par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH)

Les valeurs d'IC50 sont déterminées graphiquement à partir de la courbe réalisée en fonction des concentrations des extraits et leurs pourcentages d'inhibition respectifs (figure 29, tableau 17).

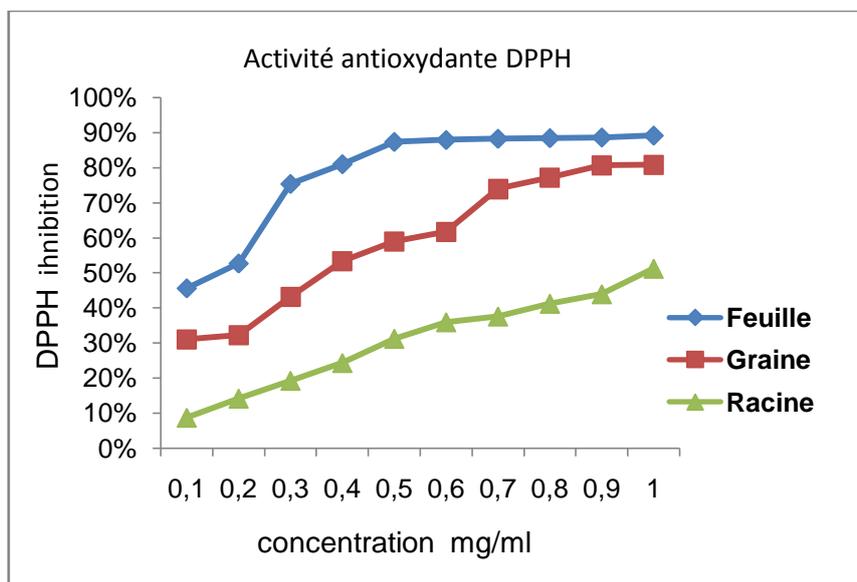


Fig 29: Le pourcentage d'inhibition de DPPH

Tab 17: Les valeurs d'IC50 des différents extraits.

Extrait hydroalcoolique	IC 50(mg/ml)
FEUILLE	0,092 ± 0,012 ⁺
GRAINE	0,46 ± 0,003 ⁺
RACINE	0,979 ± 0,025 ⁺
ACIDE ASCORBIQUE	0,020 ± 0,001
RUTINE	0,019 ± 0,001

(+ : P > 0,0001) : Valeur comparée à l'acide ascorbique et la rutine, valeur d'IC50 exprimée en moyenne ± ET (n=3). Rutine vs Acide ascorbique (non significative). + : Extrait vs control.

En général, toutes les parties de la plante *C. arabica* ont provoqué une décoloration plus au moins différente de la solution DPPH, ceci prouve leur capacités antioxydantes qui est exprimée par les valeurs IC50.

L'extrait des feuilles possède une activité antiradicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH importante comparée à celles obtenues par les extraits des graines et racines.

Les valeurs d'IC50 obtenues pour les feuilles, graines, et racines sont 0,092 ± 0,012 ; 0,46 ± 0,003 ; 0,979 ± 0,025 mg/ml respectivement.

L'activité antioxydante de l'acide ascorbique et de la rutine sont comparables avec des IC50 de $0,020 \pm 0,001$ et $0,019 \pm 0,001$ mg/ml respectivement.

L'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique et la rutine est significativement supérieure à celle obtenues par les feuilles de *C. arabica*.

Selon Kasangana *et al.*, (2015), la capacité antioxydante du piègeur du radical libre DPPH est attribué à sa capacité à fournir de l'hydrogène à ce radical afin de le stabiliser.

5-2 Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur du fer des différentes parties de *C. arabica* (feuille, graine, et racine) et les valeurs d'IC50 obtenues respectives sont illustrées dans la figure 30, et le tableau 18.

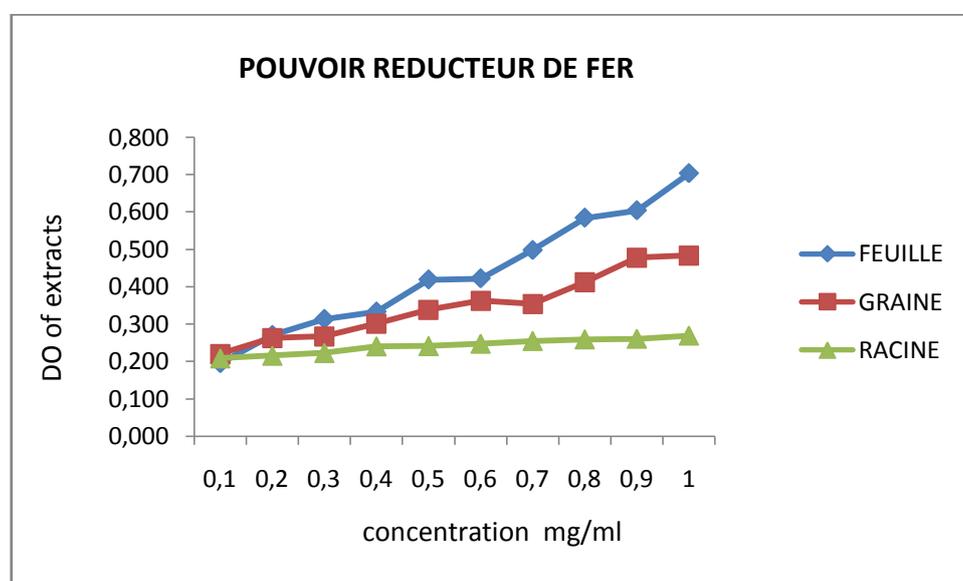


Fig 30: Pouvoir réducteur FRAP des feuille, graine, et racine.

Tab 18: Les valeurs d'IC50 des différents extraits.

Ext hydroalcoolique	IC 50 (mg/ml)
FEUILLE	0,674 ± 0,007 ⁺
GRAINE	1,076 ± 0,006 ⁺
RACINE	4,470 ± 0,072 ⁺
Acide ascorbique	0,06 ± 0,001

(+ : P > 0,0001) : Valeur comparée à l'acide ascorbique, valeur d'IC50 exprimée en moyenne ± ET (n=3).

Les résultats montrent que l'extrait hydroalcoolique des feuilles, graines, et racines possèdent un pouvoir réducteur sur le modèle utilisé.

Le pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles exprimé en IC50 est de 0,674 ± 0,007 mg/ml, valeur significativement plus faible que celles obtenues par l'extrait des graines (1,076 ± 0,006mg/ml) et l'extrait des racines (4,470 ± 0,072mg/ml). Par contre, ces valeurs sont significativement supérieure à celle obtenue par le témoin positif (acide ascorbique) avec IC50 égale à 0,06 ± 0,001 mg/ml.

Ceci dénote d'un pouvoir réducteur plus important de l'extrait hydroalcoolique des feuilles par rapport aux extraits des graines et racines. Ce résultat corrobore le résultat du test effectué sur le DPPH.

Divers travaux ont suggéré que les propriétés réductrices qu'ils exercent sont basées sur le don d'une atome d'hydrogène pour briser la chaîne des radicaux libres (Naima *et al.*, 2012).

5-3 Evaluation de l'activité antioxydante par le phosphomolybdate

Les résultats de la capacité antioxydante mesurée par le test de phosphomolybdate sont exprimés dans le tableau 19.

Tab 19: Taux des antioxydants par le phosphomolybdate.

Extrait hydroalcoolique	Taux des antioxydants (mg EAG/g d'extrait)
Feuille	14,00 ± 0,019 ⁺
Graine	12,06 ± 0,004 ⁺
Racine	10,04 ± 0,003 ⁺
Acide ascorbique	137,53 ± 0,021

(+ : P > 0,0001) : Valeur comparée à l'acide ascorbique, valeur du taux des antioxydants exprimée en moyenne ± ET (n=3).

La lecture des résultats montre que le taux des antioxydants est plus élevé dans l'extrait des feuilles, comparé aux extraits des graines et racines.

Les valeurs de la teneur en antioxydants exprimés en mg/g d'extrait sont respectivement 14,00 ± 0,019 ; 12,06 ± 0,004 ; 10,04 ± 0,003 mg EAG/g d'extrait. L'extrait hydroalcoolique des feuilles montre le taux en antioxydants le plus élevé.

Les résultats obtenus par ce test vont dans le même sens que ceux obtenus par le DPPH, et le FRAP.

5-4 Corrélation entre les contenus en Phénols Totaux et flavnoïdes vis-à-vis l'activité antioxydante

Une étude a été faite statistiquement pour déterminer une éventuelle relation entre le contenu en phénols totaux et flavonoïdes des différentes parties de *C.arabica* et les activités antioxydantes obtenues par les trois tests (DPPH, FRAP, PHOSPHOMOLYBDATE). Les résultats sont exprimés dans le tableau 20.

Tab 20: Corrélation entre les phénols totaux, les flavonoides et les activités antioxydantes.

Coefficient de corrélation (R)	DPPH	FRAP	Les antioxydants totaux
Phénols totaux	- 0,99	- 0,98	0,98
Flavonoides	- 0,94	- 0,78	0,97

Les valeurs des coefficients de corrélation qui se situent dans la plage de 0,6 et 1 ; indique une corrélation très fortes.

Pour le premier test, une très bonne corrélation entre la capacité du piégeage du radical libre DPPH par les trois extraits et leurs teneurs en phénols totaux et flavonoïdes comme le démontre les valeurs du coefficient de corrélation R - 0,99 et - 0,94 respectivement.

Dans le second test, l'analyse montre une corrélation importante entre les contenus en phénols totaux des trois extraits et l'activité FRAP avec une valeur de R égale à - 0,98. Alors que cette corrélation est moins évidente entre les contenus en flavonoides des trois extraits et la même activité où la valeur du R est égale à - 0,78.

La valeur négative est due à l'utilisation des IC50, dont l'extrait ayant une valeur IC50 plus faible possède de bonnes propriétés antioxydantes.

Dans le troisième test, une très bonne corrélation est enregistrée entre le taux en antioxydants totaux et les deux contenus en phénols totaux et flavonoïdes des trois extraits avec des coefficients de corrélation 0,98, et 0,97 respectivement.

L'activité antioxydante de *C.arabica* a fait l'objet de quelques études en occurrence à celle de Selloum *et al.*, (1997). Cette étude a mis en évidence le pouvoir antioxydant de l'extrait hydroalcoolique des feuilles en présence des espèces réactives d'oxygène O₂⁻, H₂O₂, et HOCl qui est estimé à 52,87%, 66,34% et 91,45% respectivement.

Djeridane *et al.*, (2010) rapportent que l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de *C.arabica* était réalisée par le test du DPPH, et l'IC50 est estimée égale 13,15 ± 0,01mg/l.

Plus récemment, Tigrine *et al.*, (2013) rapportent que l'extrait des feuilles de *Cleome arabica* est pourvu d'une forte activité antiradicalaire contre le radical libre DPPH (IC50 4,88 µg/ml) et un puissant pouvoir réducteur. Cependant, une bonne activité chélatrice était obtenue qu'avec des concentrations élevées (IC50 = 377,75 µg/ml).

Nos résultats confortent d'une part les études précédentes en ce qui concerne la présence d'une activité antioxydante dans la partie aérienne de *C.arabica*. D'autre part, notre étude montre que cette activité est plus importante dans les feuilles que dans les autres parties de la plante (graines et racines).

La présence d'un taux élevé en flavonoïdes et en phénols totaux dans les feuilles comparé à celui des racines et des graines pourrait justifier son potentiel antioxydant important.

Cette activité antioxydante est liée à plusieurs paramètres physico-chimiques, et qui est dépendante de la structure moléculaire selon plusieurs études (Teixeira *et al.*, 2005, Brenda *et al.*, 2005, Trouillas *et al.*, 2006, Mendoza-Wilson & Glossman-Mitnik., 2006, Wei *et al.*, 2006). Cela dû à la présence des groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'hydrogène et/ou d'électron. (Alimi *et al.*, 2013).

Concernant la corrélation entre le pouvoir antioxydant et les contenus en phénols totaux, et en flavonoïdes, nos résultats confortent de nombreuses recherches qui confirment cette corrélation (Kalt *et al.*, 1999, Zheng & Wang., 2001, Cai *et al.*, 2004, Rosa *et al.*, 2006, Katalinic *et al.*, 2006, Tawaha *et al.*, 2007, Kopjar *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2013, Kasangana *et al.*, 2015).

6- Toxicité aigüe

La partie aérienne de la plante *C.arabica* a été sujet d'une étude toxicologique *in vivo*. L'évaluation de la toxicité aigüe a été réalisées par deux méthodes, une par vois orale et l'autre par vois intrapéritoniale.

6-1 Toxicité par voie orale

L'extrait hydroalcoolique de *C. arabica* de la partie aérienne a été testé pour sa toxicité *in vivo* sur des rats avec des doses de 500mg/kg, à 10000mg/kg. L'administration de l'extrait était par voie orale -gavage-.

La toxicité aigüe permet de connaitre la plus petite dose qui, administrée en une seule prise entraine la mort de 50% des animaux dans les 24 à 48 heures après le traitement, la durée maximale d'observation étant de 15 jours (Dubick *et al.*, 1993). Ceci permet de déterminer la dose létale (DL50). L'évolution du poids corporel (tableau 21, figure 31) est

enregistrée le long de la période d'essai (14 jours). Le gain du poids est calculé pour chacun des lots (tableau 22).

Au bout des 14 jours, aucune mort n'a été enregistrée chez les différents lots traités par l'extrait de la plante *C. arabica*. On peut déduire que la DL50 est supérieure à 10000mg/kg. D'autre part, les rats traités par l'extrait ont présenté une carte clinique dépourvue de signes de toxicité. Leur comportement était semblable à celui des rats témoins.

Selon la classification de Hodge & Sterner., (1943), l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de la plante *C. arabica ssp arabica* est pratiquement non toxique.

Tab 21: Evolution du poids corporel des animaux en Kg(*).

LOT (L)	JOURS					
	J1	J2	J4	J6	J10	J14
L Témoin	0,125± 0,07	0,135± 0,05	0,137 ± 0,04	0,137± 0,05	0,141± 0,025	0,146± 0,017
L 1 (10000mg/kg)	0,149± 0,04	0,152± 0,03	0,164± 0,07	0,162± 0,046	0,167± 0,065	0,181± 0,07
L 2 (5000mg/kg)	0,136± 0,017	0,151± 0,02	0,151± 0,03	0,152± 0,012	0,162± 0,05	0,168± 0,07
L 3 (2500mg/kg)	0,096± 0,016	0,101± 0,016	0,109± 0,012	0,102± 0,012	0,107± 0,011	0,125± 0,009
L 4 (500mg/kg)	0,103± 0,03	0,104± 0,015	0,108± 0,026	0,110± 0,016	0,112± 0,016	0,124± 0,013

* : valeurs exprimée en moyenne ± Ecartype. (n= 6).

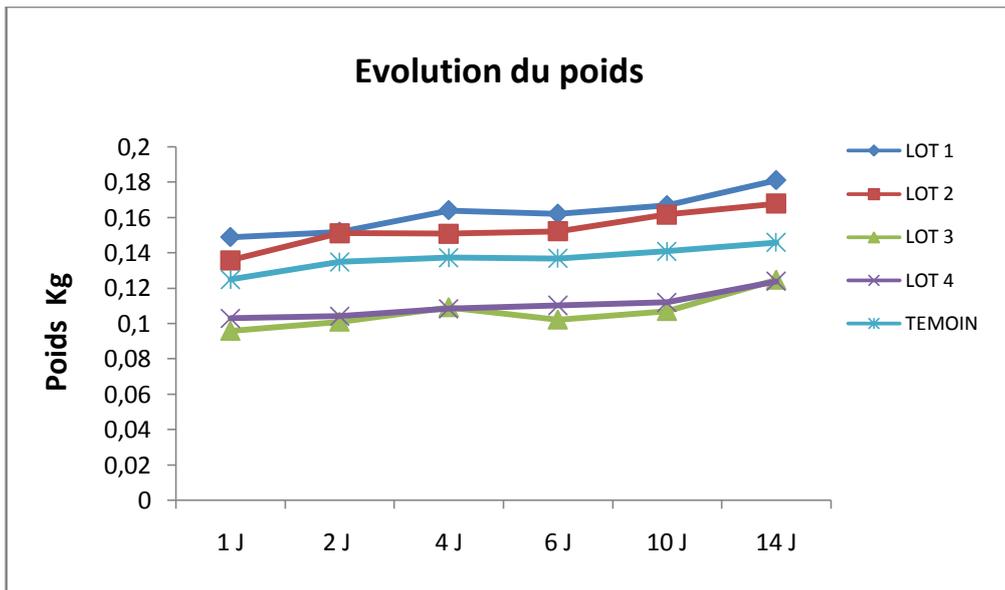


Fig 31: Evolution du poids corporel.

D'après la figure 31, tous les lots ont présenté une évolution corporelle normale et similaire à celle du lot témoin.

Tab 22: Gain du poids par lot, exprimé en Kg et en pourcentage.

Gain Poids (GP)	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4	Témoin
Moyenne 1 ^{er} jour	0,149 ± 0,004	0,136 ± 0,017	0,096 ± 0,016	0,103 ± 0,015	0,125 ± 0,007
Moyenne 14 ^{ème} jour	0,181 ± 0,007	0,168 ± 0,01	0,125 ± 0,009	0,124 ± 0,013	0,146 ± 0,007
GP en Kg	0,032	0,032	0,029	0,021	0,021
GP en %	17,76	19,15	23,10	16,94	14,38

Après la période de surveillance, les rats ont été sacrifiés pour isolés les différents organes. Ces derniers présentaient un aspect normal similaire à celui des organes du lot témoin (figure 32).

Le sacrifice des rats :

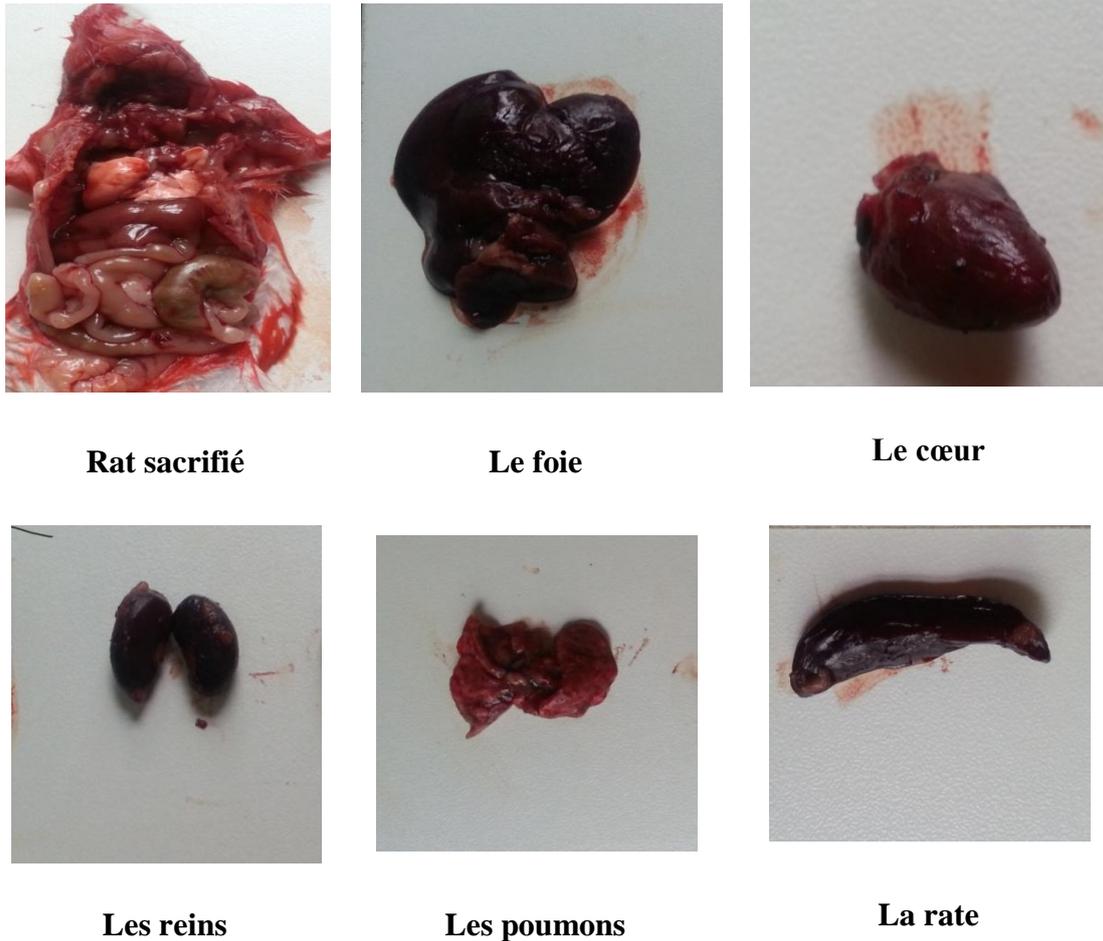


Fig 32: les organes pesés après sacrifice des rats.

6- 2 Toxicité aigue par voie Intra-péritonéale (IP)

La toxicité aigue a été testée sur des rats regroupés en 4 lots, dont 3 lots ont été traité respectivement par 3 doses de l'extrait hydroalcoolique de *C. arabica* (750mg/kg, 1500mg/kg, 3000mg/kg) et le 4^{ème} lot est considéré comme lot témoin.

Les résultats obtenus révèlent l'absence de symptômes de toxicité dans les 3 lots ainsi que le lot témoin. Le comportement des rats était normal avec une démarche et activité normale ; Absence de difficultés respiratoires, convulsion, diarrhée, coma, sang dans les urines, et gonflement de la partie d'injection chez tous les rats des différents lots testés ainsi que le lot témoin.

L'évolution du poids corporel des lots traités par la partie aérienne de *C.arabica* était normale et comparable à celle du lot control (tableau 23, figure 33).

Tab 23: Evolution du poids corporel des animaux en Kg(*).

LOT (L)	JOURS					
	J 1	J 2	J 4	J 6	J 10	J 14
L 1 (750mg/kg)	0,120± 0,015	0,123± 0,014	0,124± 0,014	0,126± 0,013	0,130± 0,012	0,138± 0,010
L 2 (1500mg/kg)	0,131± 0,028	0,133± 0,018	0,136± 0,023	0,140± 0,013	0,145± 0,03	0,153± 0,044
L 3 (3000mg/kg)	0,123± 0,034	0,125± 0,011	0,128± 0,019	0,126± 0,017	0,136± 0,02	0,149± 0,047
L Témoin	0,125± 0,018	0,126± 0,05	0,130± 0,032	0,134± 0,06	0,139± 0,05	0,148± 0,048

* : valeurs exprimée en moyenne ± Ecartype. (n= 6).

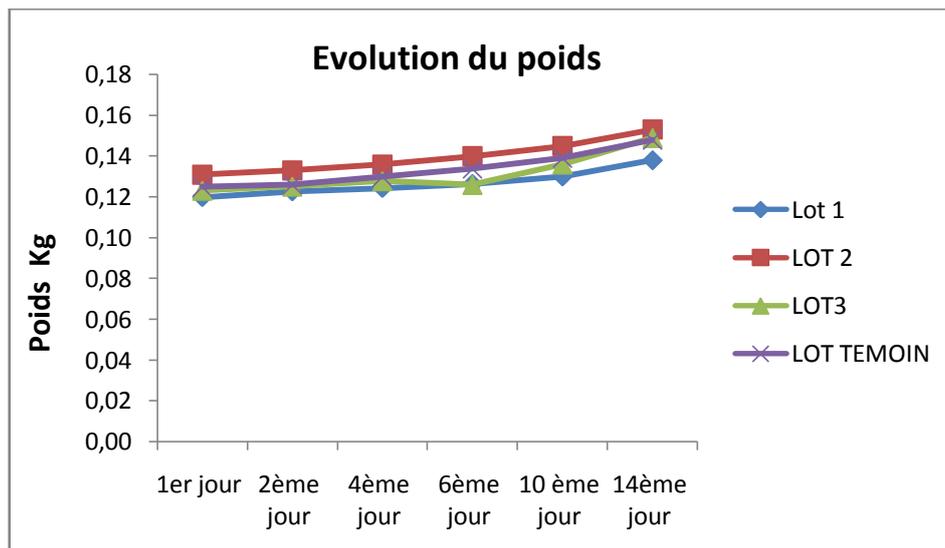


Fig 33: Evolution du poids corporel des animaux.

Le gain du poids dans chaque lot était calculé qui est présenté par la différence entre la moyenne du poids final et la moyenne du poids initial de chaque de chaque lot tableau 24). Ces derniers présentaient un aspect normal et similaire à celui des organes du lot témoin.

Tab 24: Gain du poids par lot.

GAIN POIND	LOT 1	LOT 2	LOT3	TEMOIN
Moyenne J 1	0,120± 0,015	0,131± 0,009	0,123± 0,009	0,125± 0,008
Moyenne J 14	0,138± 0,010	0,153± 0,014	0,149± 0,007	0,148± 0,008
GP en Kg	0,018	0,022	0,026	0,023
GP en gram	18,167	22,000	25,833	23,000
GP en %	13,164	14,379	17,338	15,541

Les rats des lots traités n'ont pas présenté des signes de toxicités ou troubles anormaux, ainsi que l'évolution du poids apparait semblable entre le lot témoin et les lots traités.

D'après ces résultats, l'extrait hydroalcoolique de la plante *C. arabica* est considéré non toxique pour les doses traitées.

Selon les études faites sur d'autres espèces du genre *Cleome*, il ressort que les extraits obtenus de ce genre *Cleome* ne sont pas toxiques.

Parimala Devi *et al.*, (2002) ont rapporté que l'extrait méthanolique de *C.viscosa* est non toxique et ne provoque pas la mort des animaux à une dose de 3200mg/Kg poids corporel.

Asis Bala *et al.*, (2010) ont déterminé la DL de l'extrait méthanolique de *C.gynandra* sur des souris qui est égale à 2000mg/Kg poids corporel.

Notre étude a révélé que l'administration de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de la plante *Cleome arabica* par voie orale et par voie intrapéritonéale respectivement à une dose de 10000mg/Kg et 3000mg/Kg n'induit pas de signes de toxicité ou altère négativement ni le comportement ni le poids des animaux aux doses prescrites.

En conclusion, les résultats de notre étude s'accordent avec les études déjà réalisées sur d'autres espèces du genre *Cleome* (Parimala Devi *et al.*, 2002 ; Asis Bala *et al.*, 2010).

7- Toxicité larvicide sur les larves *Artemia salina*

La cytotoxicité de l'extrait hydroalcoolique des différentes parties feuille, graine, racine a été évaluée par le test des larves (*Artemia salina*).

Le taux de mortalité des larves était calculé après 24 heures pour quatre doses différentes des extraits (1mg/ml ; 0,5mg/ml ; 0,25mg/ml ; 0,1mg/ml).

Une solution de CuSO₄ avec les mêmes doses et l'eau de mer reconstituée sont servis de témoin positif et control respectivement (tableau 25, figure 34).

Tab 25: Evolution de la mortalité après 24 heures (*).

Concentration (µg/ml)	Taux de mortalité (TM %)				
	Feuille	graine	racine	témoin +	témoin -
1000	93,33±1,15	100 ±0,00	86,67±1,53	100 ±0,00	Abs
500	86,67±1,53	93,33±1,15	83,33±1,15	100 ±0,00	Abs
250	66,67±1,53	63,33±1,53	70,00±1,00	100 ±0,00	Abs
100	3,33±0,58	56,67±1,53	10 ±0,00	100 ±0,00	Abs

Abs : absence de mortalité, * : valeur exprimée en moyenne ± écartype (n=3).

Les résultats montrent l'évolution de la mortalité et fonctions des concentrations des extraits des différentes parties de la plante *C.arabica*.

Les concentrations du CuSO₄ comparables aux extraits ont provoquées 100% de mortalité dans le lot témoins positif. Par contre, aucune mort n'a été enregistrée dans le lot control.

On observe dans les lots traités par l'extrait hydroalcoolique des feuilles, graines et racines, une mortalité des larves d'*Artemia salina* dose- dépendante.

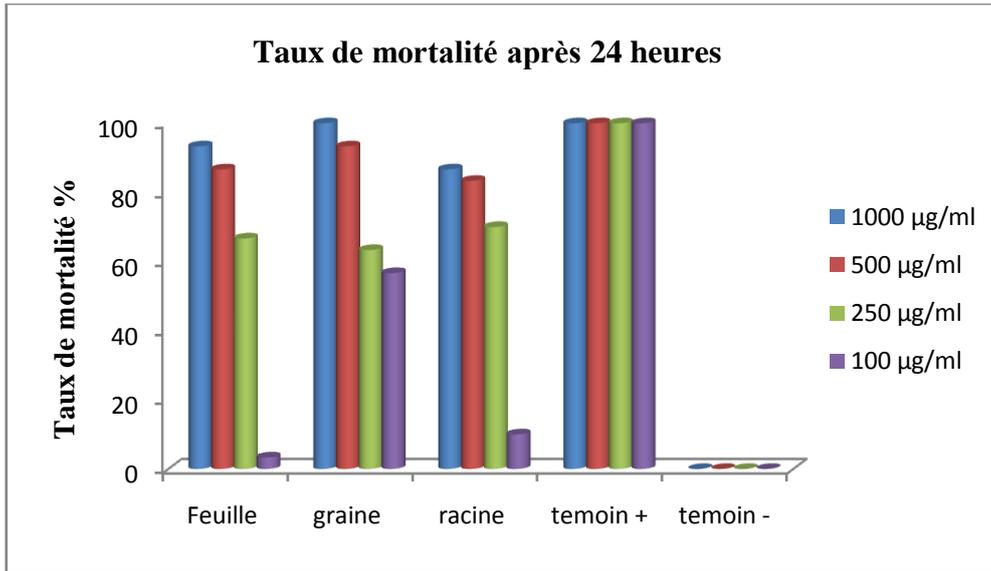


Fig 34: Evolution de la mortalité après 24H.

Les valeurs des CL50 déduites des courbes (figure 35) sont exprimées dans le tableau 26.

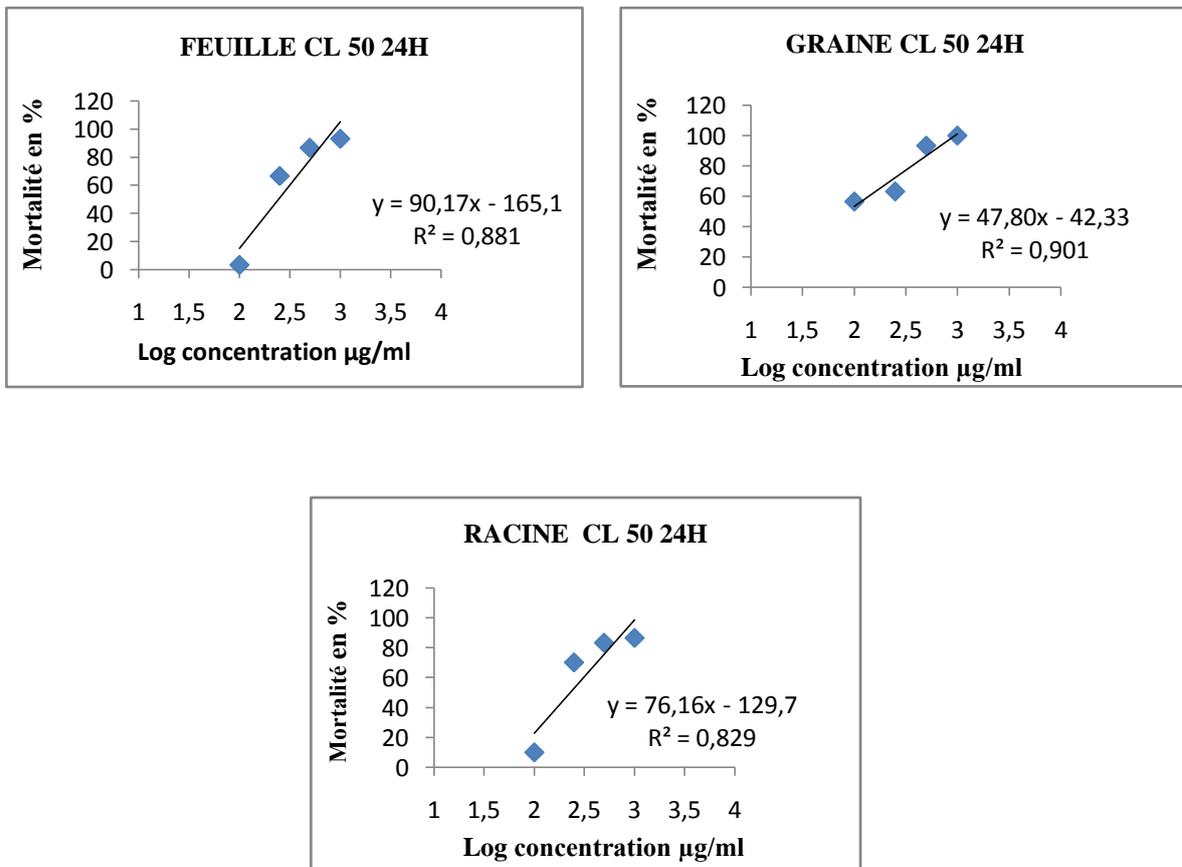


Fig 35: Courbes des CL50 après 24 heures.

Tab 26: Valeurs des CL50 après 24H.

Partie de plante	CL50 _{24H} µg/ml
Feuille	242,66
Graines	85,31
Racine	228,55

De la lecture des résultats, il peut être déduit que l'extrait hydroalcoolique des graines présente la toxicité la plus élevée avec une valeur de CL50 de 85,31 µg/ml. Alors que l'extrait des feuilles est considéré relativement moins toxique par rapport à l'extrait des racines de *C.arabica*.

Ces résultats permettent d'établir l'ordre des trois extraits selon leur cytotoxicité ; Extrait de graine > extrait des racines > extrait des feuilles. Selon les valeurs d'IC50, les extraits sont cytotoxiques +++ (250 µg/ml > CL50 ≥ 100 µg/ml).

Plusieurs études comme celles de Zani *et al.*, (1995) et El-Gohary *et al.*, (2013) ont rapporté que la toxicité pour les crevettes a une bonne corrélation avec l'activité antitumorale, antiparasitaire chez l'homme.

Notre travail montre que la cytotoxicité sur les larves de crevettes *Artemia salina* la plus élevée est localisée au niveau des graines par rapport aux autres parties de la plante *C.arabica* (feuilles et racines). Ceci révèle que cette partie de la plante contient des substances qui peuvent être considérées comme des agents cytotoxiques, et qui sont utilisés comme des produits anticancéreux.

Nos résultats sont en accord avec les travaux faits par Tigrine *et al.*, (2013), qui montrent que l'extrait hydroalcoolique des feuilles possède une activité anticancéreuse sur cinq lignées cellulaires cancéreuses MCF-7, DLD-1, HepG2, HeLa et SK-N-BE correspondent au cancer du sein, du colon, du foie, du col de l'utérus, du cerveau respectivement. Ils rapportent que l'effet préventif et apoptotique de l'extrait de *C. arabica* est peut être du sa richesse en matière de polyphénols y compris les flavonoïdes.

Une étude plus avancée de Molla *et al.*, (2016) a permis d'évaluer l'effet anticancéreux des composés phénoliques isolés; acides phénols et flavonoïdes de type flavonol et flavanol sur quatre lignées cancéreuses (HELA, HCT-116, MCF-7, HEPG-2 respectivement pour les cancers du col de l'utérus, colon, sein, foie). Cette étude a permis de confirmer que tous composés phénoliques testés sont pourvus d'un effet anticancéreux. Quelques molécules sont aussi identifiées dans nos extraits comme la quercétine, quercétine-3-O-glucoside, dérivé d'apigénine, Dérivé d'acide cinnamique, et acide p-coumarique. Ceci peut expliquer nos résultats concernant la cytotoxicité des graines par rapport aux feuilles et qui peut être dû à la présence des acides phénols en plus des flavonoïdes dans l'extrait des graines et pareillement pour l'extrait des racines.

8- Cytotoxicité hémolytique

La toxicité hémolytique des extraits était évaluée vis-à-vis les érythrocytes du sang prélevé des lapins.

Les résultats du tableau 27 illustrent l'évolution du taux d'hémolyse des globules rouges en fonction de la concentration des différents extraits des feuilles, graines et racines de *C. arabica*. Les concentrations testées sont 1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml et 20mg/ml.

Tab 27: Taux d'hémolyse par concentration.

Concentration	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml
GRAINE	21,43± 0,33%	67,14± 0,27%	92,86± 0,27%	201,43±0,12%
FEUILLE	7,14± 0,06%	18,57± 0,04%	32,86± 0,01%	58,57± 0,02%
RACINE	5,71± 0,04%	10,00± 0,06%	14,29± 0,02%	30,00± 0,14%

La figure 36 exprime en courbe l'évolution du taux hémolytique des érythrocytes. Les CL50 ont été déduites à partir des graphes (figure 37), et présentait dans le tableau 28.

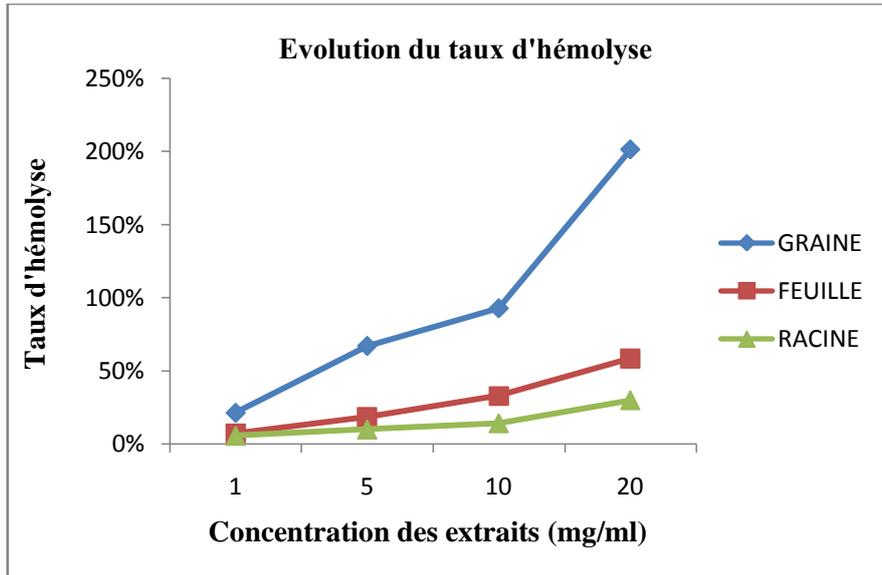


Fig 36: Evolution du taux d'hémolyse.

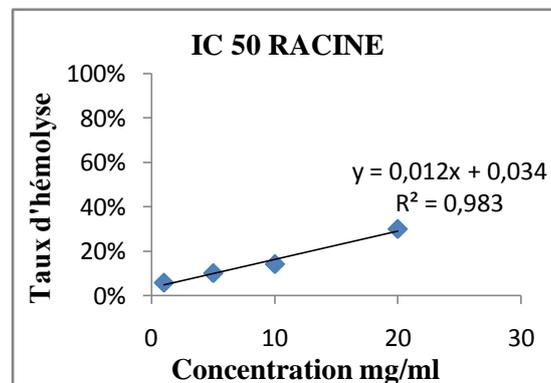
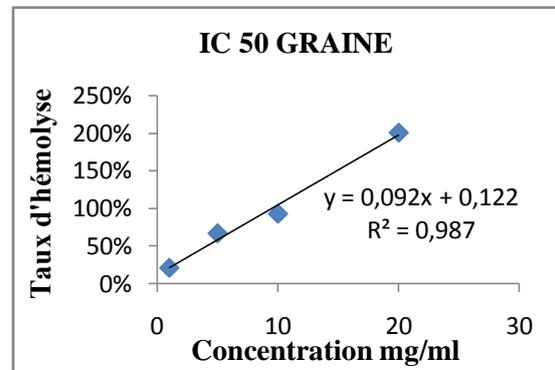
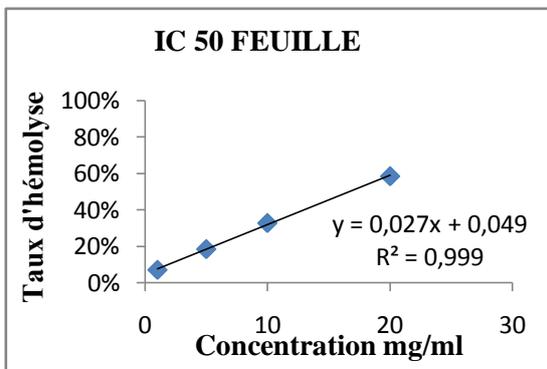


Fig 37: Courbes des IC50 de l'hémolyse.

Tab 28: Les valeurs des IC50 correspondent à 50% d'hémolyse.

Extrait	IC 50 (mg/ml)
GRAINE	4,1
FEUILLE	16,7
RACINE	38,83
Saponine	0, 316

Les résultats indiqués dans le tableau 27 montrent que l'extrait des graines présente l'effet hémolytique le plus important ; avec un taux de $21,43 \pm 0,33\%$ à la concentration de 1mg/ml, suivi par l'extrait des feuilles et racines ($7,14 \pm 0,06\%$ et $5,71 \pm 0,04\%$) respectivement.

A la concentration de 5mg/ml, l'extrait des graines a présenté un taux d'hémolyse qui dépasse les 50%. A cette même concentration, l'extrait des feuilles présente un taux relativement inférieur ($18,57 \pm 0,04\%$), et à effet moins important l'extrait des racines ($10 \pm 0,06\%$).

Signalant que le taux d'hémolyse approche à 100% pour l'extrait des graines à concentration de 10mg/ml, en le comparant à celui de l'extrait des feuilles ($32,86 \pm 0,01\%$), et aussi l'extrait des racines ($14,29 \pm 0,02\%$).

En augmentant la concentration à 20mg/ml, on remarque que le pourcentage de cellules hémolysées en présence de l'extrait des graines atteint les 100%. En ce qui concerne les deux autres extraits celui des feuilles et des racines, le taux est plus important par rapport aux concentrations précédentes qui est de $58,57 \pm 0,02\%$ et $30 \pm 0,14\%$ respectivement.

Une relation Dose-dépendante entre la concentration des différents extraits et le taux d'hémolyse des érythrocytes a été démontrée ; où le pourcentage d'hémolyse augmente avec la concentration de l'extrait. Les courbes d'évolution du taux d'hémolyse ont été tracées afin de déterminer l'IC50, qui correspond à la concentration nécessaire pour provoquer l'hémolyse de 50% des globules rouges.

Les IC50 obtenues sont de 4,1 ; 16,7 et 38,83mg/ml pour l'extrait des graines, feuilles et racines respectivement.

La saponine est utilisée comme témoin positif présente une valeur d'IC50 égale à 0,316mg/ml ; une concentration faible, qui reflète un pouvoir hémolytique potentiel. Ceci est conforme avec d'autres études qui ont rapporté que les saponines ont la capacité de lyser les érythrocytes (Ahn *et al.*, 1998, Sindambiwe *et al.*, 1998, Estrada *et al.*, 2000, Molgaard *et al.*, 2000, Woldemichael & Wink., 2001). Les recherches sur les propriétés hémolytiques des saponines sont généralement attribuées à l'interaction entre ces molécules et les stérols de la membrane érythrocytaire (Sparg *et al.*, 2004).

L'effet hémolytique des extraits testés peut être dû à un effet synergique des autres métabolites secondaires qui se combinent avec les saponines de chaque extrait brut ou peut-être en raison de la variété des saponines existantes dans l'extrait (différents les uns des autres par les fragments glycon et aglycon qui semblent jouer un rôle dans l'activité hémolytique des saponines) (Baumann *et al.*, 2000, Hashim., 2014).

Il a été rapporté que l'activité hémolytique augmente avec le nombre croissant de groupes polaires dans le groupe aglycon, en plus, les saponines stéroïdiennes et triterpénoïdes avec une seule chaîne de sucre (monodesmosides) ont une forte activité hémolytique par rapport à celles à deux chaînes de sucre (bidesmoside) qui ont montré une activité plus faible (Francis., 2002).

Les résultats obtenus par le criblage phytochimique révèlent la présence des saponines dans les trois extraits de *C. arabica*, même que l'hémolyse des cellules nécessite des doses fortes par rapport au témoin positif.

L'extrait des graines a présenté un taux d'hémolyse relativement important par rapport aux deux autres extraits. En se basant sur ces données, cet effet peut être expliqué par sa richesse en tripterpènes.

Les résultats obtenus peuvent être bénéfiques vu que ces parties de la plante (feuilles, graines, et racines) sont pourvues d'un effet hémolytique et toxique sur les érythrocytes à des concentrations relativement élevées. La détermination du pouvoir hémolytique de notre plante est parait indispensable pour une meilleure connaissance et adaptation rationnelle de la phytothérapie traditionnelle surtout pour les modes d'administration et les précautions à prendre lors de son utilisation afin d'éviter l'éclatement des cellules sanguines.

9- Activité antalgique

L'effet antalgique de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de la plante *C.arabica* a été évalué par les trois tests (tails-flick, test de la plaque chauffante, et le test de torsion).

9-1 Test tail-flick

L'extrait hydroalcoolique de *C. arabica* a été évalué (figure 38, 39) par trois doses 250mg/kg, 500mg/kg, et 1000mg/kg. Le taux d'inhibition était calculé par rapport au témoin négatif.

Les résultats obtenus pour le lot contrôle, lot témoin positif (acide acétylsalicylique) et les lots traités par les différentes doses de l'extrait sont exprimés dans le tableau 29.



Fig 38: Gavage de l'extrait.



Fig 39: Immersion de la queue à 55°C.

Tab 29: Temps de réaction et le pourcentage d'inhibition de l'extrait.

Test tail-flick	Dose mg/kg	T de réaction « S »	% Inhibition
LOT 1	250	3,46 ± 0,28 ^{*,#}	49,21
LOT 2	500	3,67 ± 0,11 ^{*,#,+}	58,03
LOT 3	1000	4,26 ± 0,87 ^{**,+}	83,60
TEMOIN +	100	4,98 ± 0,41 ^{**}	114,42
control (-)	/	2,32 ± 0,65	/

Valeur exprimée en moyenne ± ET (Test Newman-Keuls, n=6), *(P < 0,001), ** (P < 0,0001) : valeur comparée au control (-) ; # (P < 0,001) : valeur comparée au témoin (+) ; + (P < 0,01) : valeur comparée au lot 1.

Les résultats obtenus par les lots traités par l'extrait hydraolcoolique de la partie aérienne de *C.arabica* (250, 500, 1000 mg/Kg) et l'acide acétylsalicylique (100mg/kg) comparés au lot control - (H₂O) montrent que le temps de réaction enregistré par le lot témoin positif est de 4,98 ± 0,41 secondes. Cette valeur est significativement supérieure à celle obtenue par le lot control -. Il peut être déduit que l'acide acétylsalicylique possède un effet inhibiteur de la douleur thermique.

Les lots traités par l'extrait de *C.arabica* à différentes doses ont montré un effet analgésique significativement supérieur au control -. Les deux lots 2, et 3 (500, et 1000mg/Kg) présentent des différences significatives par rapport au lot 1 (250mg/Kg).

L'effet produit par l'extrait de *C.arabica* à la dose de 1000mg/Kg poids corporel a produit un temps de réaction (4,26 ± 0,87 secondes) non significativement différent à celui du temps de réaction du témoin positif (4,98 ± 0,41secondes). Il peut être déduit que l'effet analgésique produit par l'extrait *C.arabica* à la dose de 1000mg/Kg poids corporel est comparable à celui de l'acide acétylsalicylique à la dose de 100mg/Kg.

L'ordre du pourcentage d'inhibition (tableau 34) est de :

Acide acétylsalicylique ~ extrait (1000mg/Kg) > extrait (500mg/Kg) > extrait (250mg/Kg).

Il ressort de la lecture des résultats, qu'il y'a une relation entre la dose et l'effet produit (figure 40) ; les lots 1, 2, et 3 traités avec les doses respectives (250, 500, et 1000 mg/ml) présentent des temps de réaction de (3,46 ± 0,28 ; 3,67 ± 0,11 et 4,26 ± 0,87 secondes).

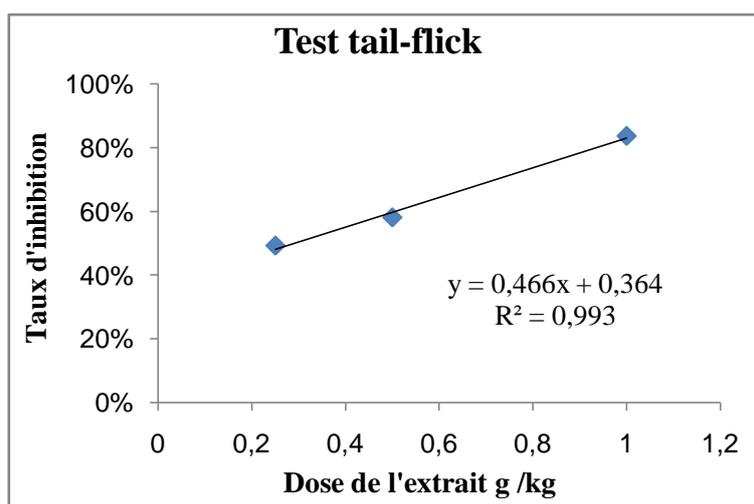


Fig 40: Relation dose-dépendante de test tail-flick.

La dose effective (ED50) est la dose responsable de 50% de l'effet analgésique par rapport au lot témoin négatif, dont elle est égale à 291,84mg/kg poids corporel.

9-2 Test de la plaque chauffante

Le test de la plaque chauffante (figure 41et 42) est effectué en traitant trois lots avec les doses 250mg/kg, 500mg/kg et 1000mg/kg de l'extrait de la partie aérienne de *C. arabica*. Un lot gavé avec l'eau distillée comme témoin négatif et un lot témoin positif qui est traité par l'acide acétylsalicylique à 100mg/kg.



Fig 41: Gavage de l'extrait

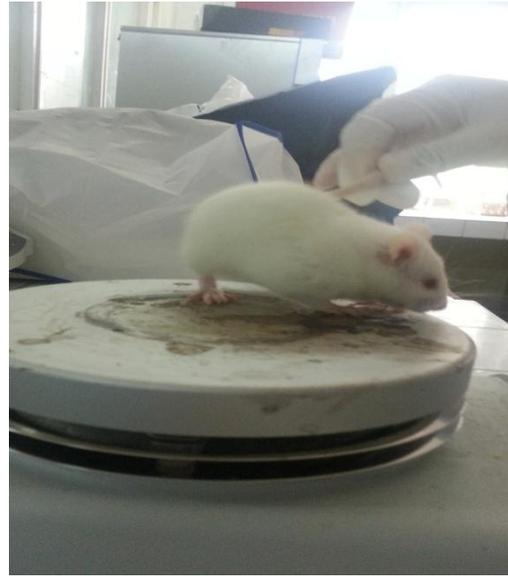


Fig 42: Rat sur la plaque chauffante à 55°C.

Le tableau 30 montre le temps de réaction et le taux inhibition calculé par rapport à lot témoin négatif.

Tab 30: Temps de réaction et le pourcentage d'inhibition de l'extrait.

Test plaque chauffante	Dose mg/kg	T de réaction « S »	% Inhibition
LOT 1	250	1,92 ± 0,19 ^{##}	7,35
LOT 2	500	2,46 ± 0,12 ^{*, #, +}	37,40
LOT 3	1000	2,8 ± 0,11 ^{**, #, ++}	56,37
TEMOIN +	100	4,26 ± 0,61 ^{***}	137,86
TEMOIN -	/	1,79 ± 0,26	/

Valeur exprimée en moyenne ± ET (Test Newman-Keuls, n=6), * (P < 0,05), ** (P < 0,001), *** (P < 0,0001) : valeur comparée au control (-) ; # (P < 0,001), ## (P < 0,0001) : valeur comparée au témoin (+) ; + (P < 0,01), ++ (P < 0,01) : valeur comparée au lot 1.

Il ressort de la lecture de tableau 30 que le temps de réaction enregistré par le lot témoin positif traité par l'acide acétylsalicylique (4,26 ± 0,61 secondes) est très hautement significatif par rapport aux différents lots (traités par l'extrait et témoin négatif).

Une différence hautement significative est signalée entre le lot témoin négatif et le lot 3 (1000mg/Kg), et une différence moins importante enregistré avec le lot 2 (500mg/Kg). Par contre, la comparaison avec le lot 1 (250 mg/Kg) révèle qu'il n'existe pas de différences significatives.

L'analyse statistique de la comparaison des résultats obtenus entre les lots traités par l'extrait de la plante signale qu'il existe des différences significatives et très significatives entre les trois lots. Ceci dénote que la dose de l'extrait peut avoir un effet sur le temps de réaction enregistré.

Le pourcentage d'inhibition est déduit et permet d'ordonner les différents lots selon leur effet analgésique : Acide acétylsalicylique > extrait (1000mg/Kg) > extrait (500mg/Kg) > extrait (250mg/Kg).

A partir des résultats obtenus (tableau 30), le temps de réaction est dose-dépendant, on remarque que les lots 1, 2, et 3 avec les doses respectives (250, 500, et 1000 mg/ml) présentent des temps de réaction ($1,92 \pm 0,19$; $2,46 \pm 0,12$; $2,8 \pm 0,11$ secondes) respectivement. Ceci dénote une relation dose-dépendante vis-à-vis de l'effet mesuré (figure 43).

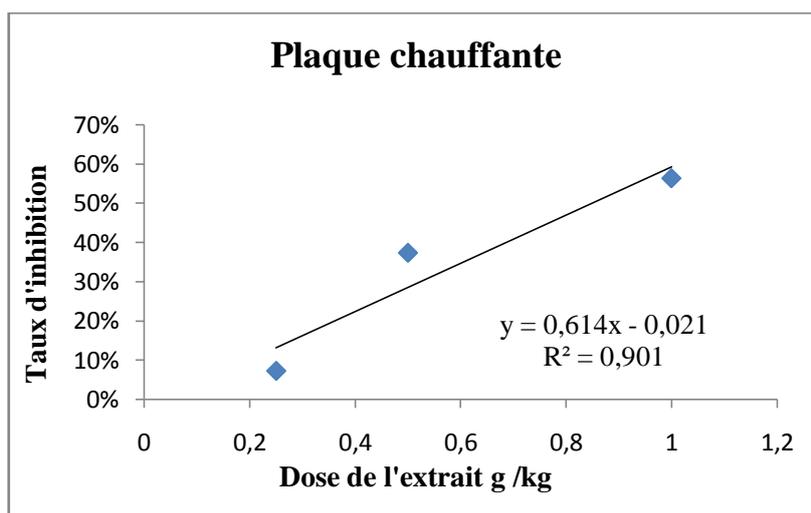


Fig 43: Relation dose-effet par le test plaque chauffante.

La courbe réalisée a permis de déduire la valeur ED50, qui est égale à 848,53mg/kg du poids corporel.

9-3 Test de torsion (acide acétique)

L'effet analgésique est mesuré par le test de torsion (figure 44 et 45). L'activité des lots traités par l'extrait de la partie aérienne de *C.arabica* à différentes doses est comparée à celui de lot témoin positif traité par l'acide acétylsalicylique et le lot control négatif (sans traitement). Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 31.



Fig 44: Injection IP de l'acide acétique.



Fig 45: La crampe

Tab 31: Nombre de torsion et le pourcentage d'inhibition de l'extrait.

Test de torsion	Dose mg/kg	Nbr de crampes	% Inhibition
LOT 1	250	67,16 ± 2,48 ^{*,#}	29,42
LOT 2	500	60,33 ± 1,63 ^{*,#,+}	36,60
LOT 3	1000	30,16 ± 3,25 ^{*,++}	68,30
TEMOIN +	100mg	28 ± 2,36 [*]	70,58
TEMOIN -	/	95,16 ± 3,12	/

Valeur exprimée en moyenne ± ET (Test Newman-Keuls, n=6), * (P < 0,0001) : valeur comparée au control (-); # (P < 0,0001) : valeur comparée au témoin (+); + (P < 0,01), ++ (P < 0,0001): valeur comparée au lot 1.

L'analyse statistique des résultats obtenus entre les lots traités par l'extrait de la plante signale qu'il existe des différences très hautement significatives. Une différence très hautement significative est aussi enregistrée entre le lot témoin positif et le lot témoin négatif.

Il ressort de la lecture de tableau 31, que le nombre de torsion enregistré par le lot témoin positif ($28 \pm 2,36$) est très hautement significatif par rapport aux lots traités 1 et 2 ($67,16 \pm 2,48$; et $60,33 \pm 1,63$ crampes) respectivement ; alors la différence par rapport au lot 3 (1000mg/Kg) est non significative.

Le pourcentage d'inhibition est déduit, dont le lot 3 présente le taux d'inhibition le plus important (68,30%) par rapport aux deux autres lots. Les résultats ont permis d'ordonner les différents lots selon l'effet analgésique comme suit :

Acide acétylsalicylique ~ extrait (1000mg/Kg) > extrait (500mg/Kg) > extrait (250mg/Kg).

A partir des résultats obtenus (tableau 31), le temps de réaction est dose-dépendant. On remarque que les lots 1, 2, et 3 avec les doses respectives (250, 500, et 1000 mg/ml) présentent des nombres de contorsion de $67,16 \pm 2,48$; $60,33 \pm 1,63$; $30,16 \pm 3,25$ crampes respectivement. Ceci dénote une relation dose-dépendante vis-à-vis de l'effet mesuré (figure 46).

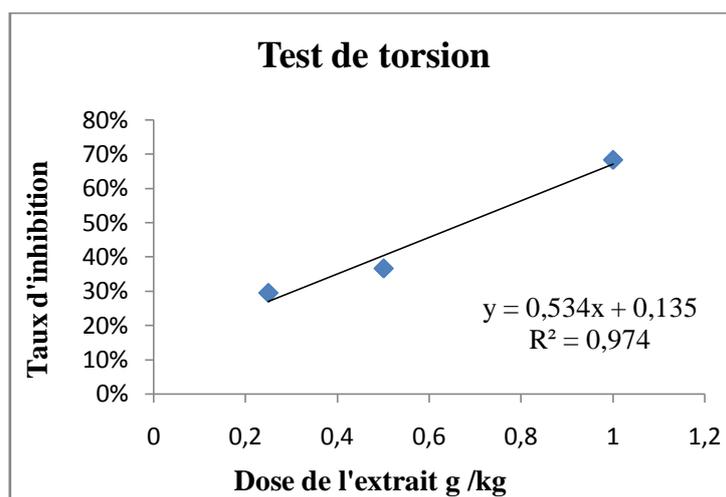


Fig 46: Relation dose-effet par le test de torsion.

La courbe tracée permet de déduire la dose effective ED50, qui est trouvée égale à 683,52mg/kg poids corporel.

Dans notre évaluation de l'effet analgésique de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de la plante *C.arabica*, 3 tests ont été utilisés : test de tail flick, test de la plaque chauffante et le test de torsion.

Il est clairement visible que l'extrait *C.arabica* à travers les trois tests utilisés présente un effet analgésique significatif par rapport au lot control négatif. Dans le test de la plaque chauffante, l'effet produit par l'extrait hydroalcoolique de *C.arabica* à la dose la plus élevée est significativement inférieur à celui produit par l'acide acétylsalicylique à 100mg/Kg poids corporel. Les deux tests en occurrence celui de tail flick et le test de torsion, l'effet produit par l'extrait hydroalcoolique de *C.arabica* à la dose de 1000mg/Kg est comparable à celui produit par l'acide acétylsalicylique.

L'effet analgésique de l'extrait de *C.arabica* est dose-dépendant pour les trois tests, ceci est en accord avec plusieurs études (Biswas *et al.*, 1991 ; Okolo *et al.*, 1995 ; Olugbenga *et al.*, 2001 ; Halmi *et al.*, 2016 ; Zeghad *et al.*, 2016).

Les deux premiers tests (tail flick et test de la plaque chauffante) nous renseignent sur l'effet analgésique produit à travers une action centrale. Le 3^{ème} test de torsion nous oriente sur un mécanisme périphérique (Xie *et al.*, 2008).

Elisabetsky et ses collaborateurs (1995) rapportent que ces contractions provoquées par l'acide acétique sont dues à la production et à la libération des médiateurs algogènes via les cyclooxygénases (COX) et la biosynthèse des prostaglandines, notamment la PGE2 produite par la COX-1. Ces derniers excitent par la suite les terminaisons nerveuses de la douleur étant donné que la contraction abdominale est liée à la sensibilisation des récepteurs nociceptifs aux prostaglandines (Chen., 1993). L'administration de l'acide acétylsalicylique (100mg/kg) en traitement préventif aux rats a inhibé de façon significative l'action algogène de l'acide acétique, en inhibant la formation des médiateurs de la douleur dans les tissus périphériques, car elle inhibe l'activité de la COX-1 et de la COX-2 (Hirose *et al.*, 1984).

A partir des résultats obtenus, on peut conclure que l'extrait de *C.arabica* possède une activité analgésique. On peut postuler que cette activité pourrait être attribuée à différents constituants présents dans l'extrait, qui pourraient exercer leur effet analgésique au niveau central et/ou périphérique.

Des études précédentes utilisant des souris *swiss albinos* ont rapporté que des extraits hydroalcooliques (100 à 400 mg/Kg, *p.o*) des espèces du genre *Cleome*, en l'occurrence de *C.viscosa*, et *C. rutidosperma*, possèdent un effet analgésique (Bose *et al.*, 2007, Parimaladevi *et al.*, 2003).

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait hydroalcoolique de *C.arabica* a révélé la présence de phytoconstituants, comme les alcaloïdes, flavonoïdes (quercétine, apigénine, kaempferol), et triterpènes (Koyama *et al.*, 2001, Sukma *et al.*, 2002, Deachapunya *et al.*, 2005, Ajaiyeoba *et al.*, 2008, Nsonde-Ntandou *et al.*, 2010). Ces constituants sont susceptibles d'être responsables de l'effet analgésique observé à travers les trois tests de l'extrait hydroalcoolique de *C.arabica*.

Ce résultat nous incite à approfondir cet aspect par une étude pharmacologique rationnelle. Le point de départ serait de procéder par un fractionnement pharmaco-guidé de l'extrait hydroalcoolique dans le but d'identifier et d'isoler la ou les molécules impliquées dans l'activité. Ceci pourrait être poursuivi par l'évaluation des effets des molécules pures et de leurs mécanismes d'action.

10- Effet cicatrisant de *C. arabica*

Les résultats des deux types d'essais (brûlures thermiques et test d'excision) effectués pour l'évaluation de l'effet cicatrisant de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de la plante *C.arabica* sont présentés comme suit :

10-1 Plaies de brûlures thermiques

Les résultats obtenus dans le cas des brûlures thermiques pour les trois lots control – (physiologique), lot témoin + (Cicatryl®) et le lot traité par l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *C.arabica* sont présentés dans le tableau 32, en exprimant l'évolution de la contraction des plaies.

Tab 32: Pourcentage d'évolution de contraction des plaies.

Lot	Pourcentage de contraction (#)					
	J0	J3	J6	J9	J12	J15
Control –	-	3,99 ± 1,15	6,16 ± 1,21	13,24 ± 1,42	34,80 ± 1,13	65,60 ± 1,40
Témoin +	-	4,35 ± 1,29	13,12 ± 1,24*	21,30 ± 1,28*	44,18 ± 1,32*	80,08 ± 1,08*
EXT ETH	-	7,68 ± 1,07*	14,68 ± 1,12*	28,59 ± 1,46* ⁺	55,50 ± 1,26* ⁺	91,69 ± 1,01** ⁺

: Valeur exprimée en moyenne ± ET, Test de student (n=6) ; (*: P < 0,01, **P < 0,001) : valeur comparée au control –, (+ : P < 0,01) : valeur comparée au témoin +.

Le tableau 33 et la figure 47 présentent la progression et la description de la contraction des plaies de brûlures thermiques chez le model lapin.

Tab 33 : Présentation des résultats des plaies Brûlures thermiques.

Jours	Description des résultats
J0	Pratiquement toutes les plaies présentent la même surface et la même texture.
J3	Toutes les plaies des différents lots ont présenté un aspect sec, avec un gonflement léger et un changement de la couleur de la peau brûlée. Notant que les plaies traitées par le témoin + ont été légèrement humides par rapport aux autres plaies. La différence des taux de contraction à ce jour n'est pas vraiment importante et qui varie de 4 à 7%.
J6	la couche supérieure n'est pas encore détachée mais un début d'un épaissement est remarqué. La taille des plaies a connu une diminution dont l'extrait hydroalcoolique a présenté un taux de contraction important ($14,68 \pm 1,12\%$) par rapport à celui du contrôle- ($6,16 \pm 1,21\%$) et moins important par rapport à celui enregistré par le témoin + ($13,12 \pm 1,24\%$).
J9	Un épaissement important de la peau des plaies était remarqué chez les lots traités, et la contraction est débutée par un détachement de la peau brûlée à partir des bords. Les lots traités par EXT ETH et le témoin+ ont présenté des taux de contraction importants ($28,59 \pm 1,46\%$, et $21,30 \pm 1,28\%$) par rapport au lot control - ($13,24 \pm 1,42\%$).
J12	Toutes les plaies ont été dépourvues totalement de la couche de la peau brûlée, et les tailles des plaies ont vraiment diminué avec des taux de $55,5 \pm 1,26\%$, $44,18 \pm 1,32\%$ et $34,80 \pm 1,13\%$ pour les lots EXT ETH, témoin + et le lot control- respectivement.
J15	La contraction est presque totale pour le lot EXT ETH ($91,69 \pm 1,01\%$). La contraction estimée du lot témoin + est égale à $80,68 \pm 1,08\%$, alors que les plaies non traitées ont montré une contraction de $65,60 \pm 1,40\%$.

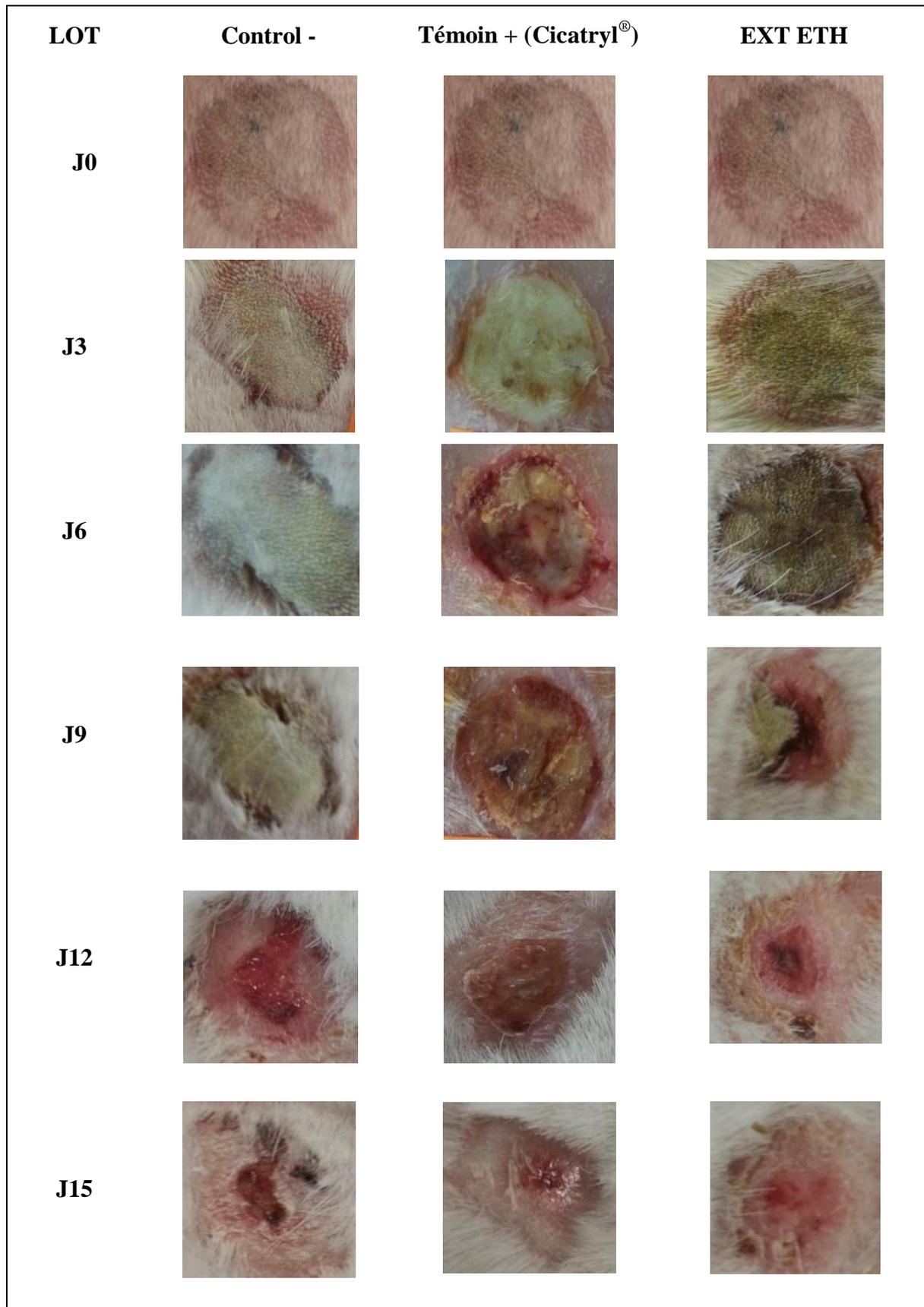


Fig 47: Progression de la cicatrisation des plaies de brûlures thermiques chez le model lapin.

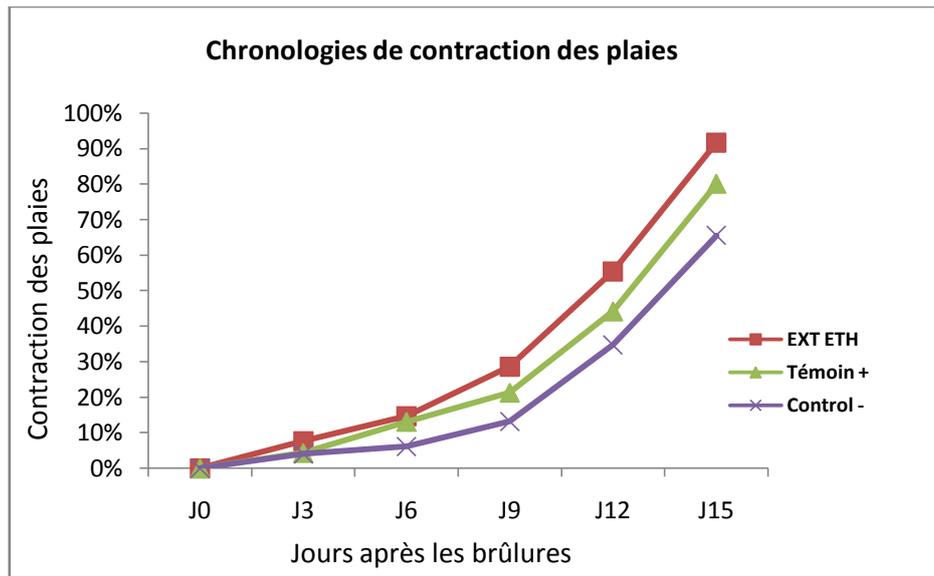


Fig 48: Evolution de la contraction des plaies des brûlures thermiques.

La lecture des résultats des tableaux et de la figure 48 montre clairement qu'il y'a une différence significative dans l'évolution de la cicatrisation entre d'une part le lot traité par l'extrait hydroalcoolique et le control-, et d'autre part, le lot témoin + qui traité par la pommade (Cicatryl®) et le control -.

Concernant l'extrait, une différence significative avec le control- est observée dans la contraction des plaies dès le 3^{ème} jour (J3) et jusqu'à la fin de l'expérience. Quant au lot traité par la pommade, cette différence avec le control - n'est visible qu'à partir du 6^{ème} jour (J6) et se maintien jusqu'à la fin de l'expérience.

La comparaison entre les lots traités par la pommade et l'extrait hydroalcoolique de *C. arabica* montre que ce dernier présente une meilleure efficacité concernant la contraction des plaies observable dès le 3^{ème} jour (J3) et se maintient jusqu'à la fin de la période d'essai.

A l'issu du 15^{ème} jour (J15), le lot traité par l'extrait hydroalcoolique montre une contraction presque totale des plaies. Cette contraction est significativement meilleure que celle du lot traité par la pommade témoin, et le lot control-.

10- 2 Effet cicatrisant sur les plaies d’excision

Le tableau 34 présente l’évolution dans le temps du pourcentage de contraction des plaies exprimée en moyenne \pm ET.

Tab 34: Evolution des plaies d’excision exprimée en pourcentage de contraction.

Lots	Pourcentage de contraction (#)				
	J0	J3	J6	J9	J12
Control -	-	5,92 \pm 1,37	16,39 \pm 0,49	37,62 \pm 0,89	67,76 \pm 1,53
Témoïn +	-	4,78 \pm 1,4	24,04 \pm 0,92 [*]	47,32 \pm 1,03 [*]	79,48 \pm 0,78 [*]
EXT ETH	-	6,92 \pm 1,17	36,65 \pm 1,13 ^{*,+}	71,13 \pm 0,92 ^{**,+}	92 \pm 0,81 ^{**,+}

: Valeur exprimée en moyenne \pm ET, test de student (n=6), (* : P < 0,01, **P < 0,001) : valeur comparée au control -. (+ : P < 0,01) : valeur comparée au témoin+.

Tab 35: Description des résultats des plaies d'excision.

Jours	Présentation des résultats
J0	la forme et la taille des plaies des différents lots traités et non traité sont Pratiquement semblables.
J3	La taille et la forme des différentes plaies sont légèrement différentes avec des taux de contraction de 5,92 \pm 1,37%, 4,78 \pm 1,4% et 6,92 \pm 1,17% pour le control -, le témoin + et lot traité par l’extrait respectivement.
J6	Une réduction importante des surfaces des plaies traitées par l’extrait de la plante (36,65 \pm 1,13%), ce qui signifie une amélioration de la contraction. Le lot control a présenté le taux le plus faible qui est de 16,39 \pm 0,49 %, alors le lot traité par cicatryl [®] a présenté un taux de 24,04 \pm 0,92 %.
J9	La contraction des plaies est de plus en plus importante, principalement le lot traité par l’extrait de la plante (71,13 \pm 0,92%). Les taux de 47,32 \pm 1,03%, 37,62 \pm 0,89% sont enregistrés par le lot témoin + et le lot control – respectivement.
J12	La contraction est presque totale pour le lot traité avec l’extrait de la plante (92 \pm 0,81 %), et moins importante pour les deux autres lots témoin + et control – (79,48 \pm 0,78 %, 67,76 \pm 1,53 %).

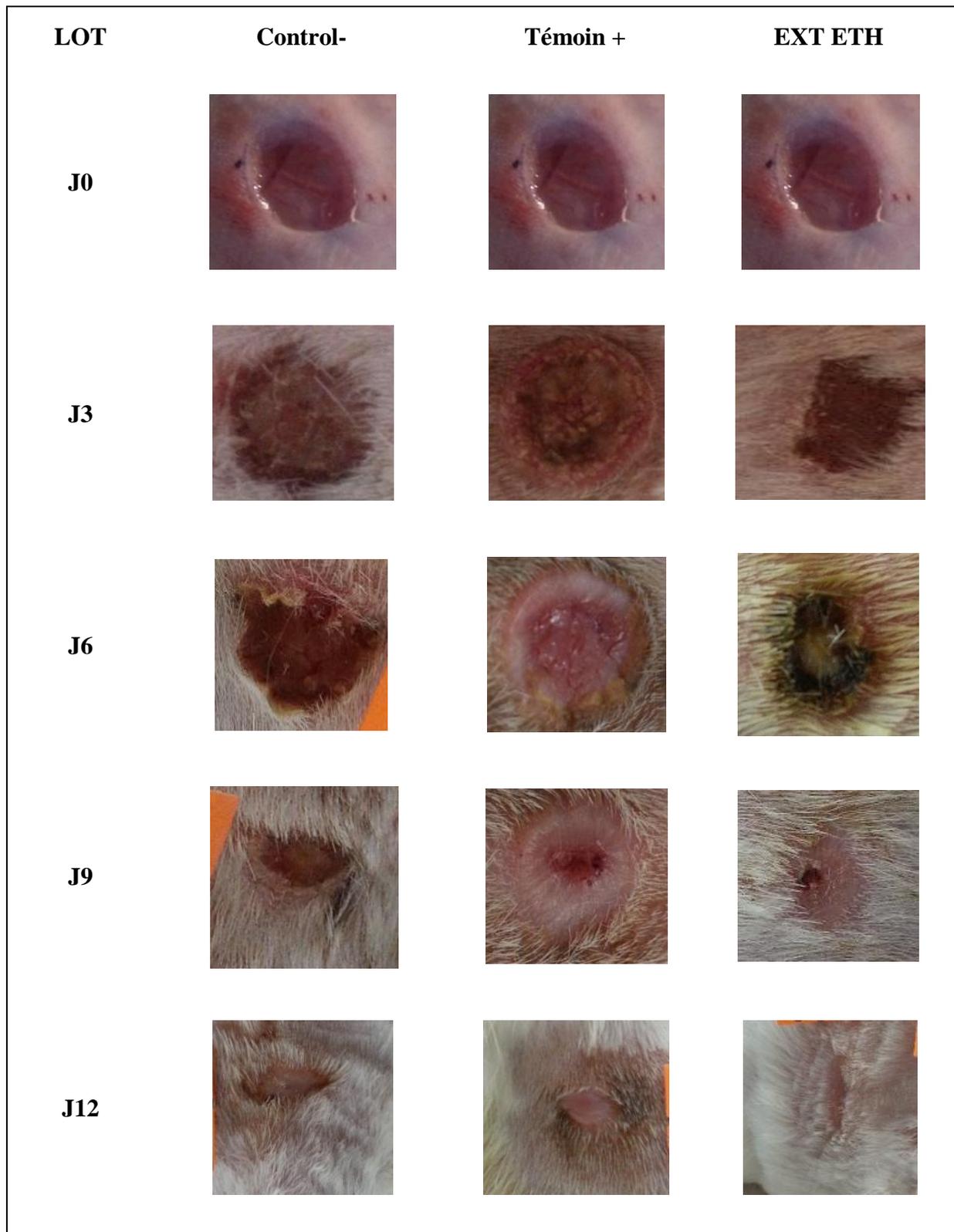


Fig 49: Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision chez le model lapin.

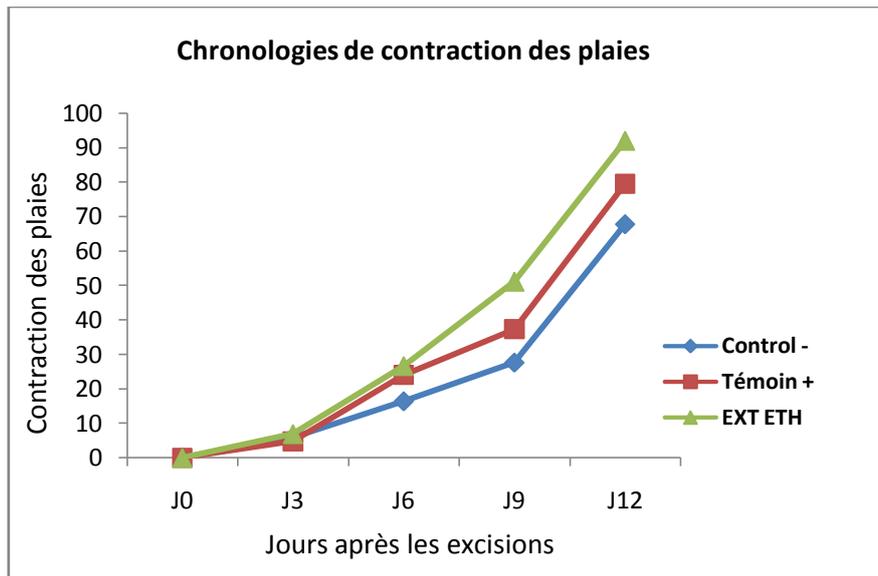


Fig 50: Evolution de la contraction (%) des plaies d'excisions.

De la lecture du tableau (34, 35) et de la figure (49, 50), les résultats montrent qu'à J3 il n'y a pas de différences significatives entre le lot traité par l'extrait hydroalcoolique et le lot control -. Cette remarque est aussi valable pour le lot traité par la pommade témoin et le lot control -.

De J6 jusqu'à J12, une bonne évolution de la cicatrisation est observée pour les lots traités par l'extrait hydroalcoolique de la plante *C.arabica* et par la pommade comparée au lot control- ($P < 0,001$).

Le lot traité par l'extrait montre une évolution significativement meilleure de la guérison, sur la période de J6 jusqu'à J12, par rapport au lot traité par la pommade ($P < 0,01$).

Dans la présente étude, il est utile de souligner que seul le paramètre contraction des plaies a été évalué sur les deux tests (brulures thermiques et excision). Toute fois, ce seul paramètre demeure insuffisant pour évaluer l'efficacité clinique chez l'animal et doit être complété par la mesure d'autres paramètres, notamment, biochimiques, et histologiques.

Le paramètre contraction des plaies demeure une bonne indication pour déceler d'éventuels extraits potentiellement actifs. La contraction de la plaie indique le taux de la zone cicatrisée pendant le processus de cicatrisation, et un taux important de contraction de la plaie indique une meilleure efficacité du traitement (Krishnappa *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydroalcoolique est doué d'une activité cicatrisante comparable à celle de la pommade Cicatryl[®] par rapport au paramètre régression des plaies.

Nos résultats confortent ceux obtenus lors d'une étude réalisée par Singh *et al.*, 2017 sur plusieurs fractions (extrait méthanolique, éther de pétrole, acétate d'éthyle, et l'extrait aqueux) des graines de *Cleome viscosa*. Cette étude a révélé un potentiel cicatrisant très important des différentes fractions dont l'extrait méthanolique a enregistré un pourcentage de contraction de $90,89 \pm 0,69\%$ sur une période d'épithélialisation de 23 jours.

D'autres travaux rapportent l'effet important de l'extrait hydroalcoolique de plusieurs plantes. Les travaux de Farahpour *et al.*, (2016) indiquent que l'extrait éthanolique de *Moltkia coerulea* augmente significativement ($p < 0,05$) le pourcentage de contraction de la plaie d'excision, caractérisée par une distribution de fibroblastes et de fibrocytes remarquablement supérieure par rapport aux autres lots. Bramara *et al.*, (2017) rapportent que l'administration et l'application de l'extrait hydroalcoolique de *Lepidium meyenii* démontre un effet dose-dépendant remarquable sur les différentes étapes de la cicatrisation ; telles que la synthèse du collagène, la contraction, et la réduction de la charge bactérienne de la plaie.

Bensegueni., (2007) rapporte que l'huile de lentisque est douée d'un effet cicatrisant important pour le traitement des brûlures, ce qui est aussi confirmé par les travaux de Boulebda *et al.*, (2009), Belfadel., (2009), Djerrou *et al.*, (2010), Maameri *et al.*, (2012), et Abdeldjelil., (2016).

Selon Bahramsoltani *et al.*, (2014), les produits naturels cicatrisants peuvent agir par un des mécanismes suivants : effet antioxydant antimicrobien, anti-inflammatoire, ou stimulation de la synthèse du collagène.

Les travaux antérieurs réalisés par d'autres auteurs ont démontré que *C. arabica* est douées de propriétés antioxydantes (Djeridane *et al.*, 2010, Tigrine *et al.*, 2013). Nos travaux sur l'extrait hydroalcoolique utilisant les tests antioxydants *in vitro* (DPPH, FRAP, Phosphomolybdenum) confortent cette information.

Au cours du processus de la cicatrisation, et spécialement pendant la phase inflammatoire, les cellules neutrophiles à activité phagocytaire et non phagocytaire entraînent la production des radicaux libres (Forman & Thomas., 1986, Dobke *et al.*, 1989, Chan *et al.*, 2009) dans la plaies. Ceci entraîne un déséquilibre de la balance oxydative malgré les mécanismes de protection de l'organisme qu'ils soient enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase) ou

non enzymatique (vitamine C, E, glutathion, polyphenols) (Nguyen *et al.*, 1993, Horton., 2003). L'ajout des antioxydants dans le traitement des brûlures était effectué dans plusieurs études expérimentales et cliniques. Suite à cette action, une amélioration du phénomène de la cicatrisation et des effets bénéfiques ont été rapportés tel que : la réduction de l'incidence de l'infection de la plaie, la réduction du temps de guérison (Sahib *et al.*, 2010).

D'autre part, on note que parmi les contaminants les plus courants dans les plaies sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* et les bacilles coliformes.

De cet effet, Heisey & Gorham., (1992) note que *C. arabica* est pourvue d'un pouvoir antibactérien. D'autres travaux sur des espèces du genre *Cleome* ont mis en évidence ; Sudhakar *et al.*, (2006) rapportent que l'extrait éthanolique des feuilles et des fleurs de *Cleome viscosa* a présenté un large spectre d'activité antimicrobienne, particulièrement important contre *Escherichia coli*, et *pseudomonas aeruginosa* et modéré en présence des espèces *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*. De même, l'extrait de *Cleome droserifolia* a prouvé un effet modéré avec *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, et un effet antibactérien plus important avec des zones d'inhibition qui varient entre 11 à 20 mm contre les espèces bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida Albicans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* (Khafagi & Dewedar., 2000).

Plusieurs travaux ont signalé que *C.arabica* possède des propriétés anti-inflammatoires. Bouriche et ses collaborateurs (2005) ont démontré que l'extrait des feuilles de *C. arabica* présente un effet anti-inflammatoire comparable à celui de la quercétine et la rutine. Ainsi, l'extrait éthanolique de *Cleome rutidosperma* était testé pour son effet anti-inflammatoire contre un agent irritant. Cette activité est confirmée par la capacité de l'extrait à réduire l'œdème local sur la patte du rat. (Bose *et al.*, 2007).

A ce stade, on pourrait postuler que l'activité cicatrisante de l'extrait hydroalcoolique de *Cleome arabica* pourrait être associée en partie à son pouvoir antioxydant, antibactérien et anti-inflammatoire. Il serait utile de procéder à une évaluation plus complète de *Cleome arabica*, notamment, sur son effet sur la production de collagène.

Conclusion générale

L'Algérie présente un patrimoine végétal important par sa richesse et sa biodiversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes. Cette richesse floristique est considérable et comporte des milliers d'espèces de plantes qui présentent divers intérêts médicinales et autres. Les plantes médicinales font l'objet de recherche scientifique soutenue en vue de les valoriser comme source de substances naturelles bioactives.

Cette étude s'inscrit dans une double perspective de développement économique et de gestion durable des ressources naturelles. Le thème s'intéresse particulièrement à une espèce désertique du genre *Cleome*, qui est menacée du fait du changement climatique que subit notre pays ces dernières années. Cette plante s'appelle *Cleome arabica* connue sous l'appellation locale de « Natten ». Malgré son importance dans l'écosystème où elle évolue, elle demeure insuffisamment étudiée à la fois sur le plan phytochimique et pharmacologiques.

Le but ultime de cette étude est d'approfondir les connaissances sur cette plante importante. Deux objectifs spécifiques sont fixés :

- Caractérisation quantitative du contenu en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes, tanins) dont les différentes parties de la plante (feuilles, graines, et racines), complétée par une analyse HPLC/DAD/MS.
- Evaluation *in vivo* et *in vitro* des activités biologiques (antioxydante, analgésique, cicatrisante) et potentiel toxique (toxicité aiguë, cytotoxicités).

Sur le volet chimique, l'analyse par HPLC/DAD/MS a révélé que l'extrait hydroalcoolique des trois parties de *C.arabica* est marqué par la présence des flavonoïdes principalement du type flavonol à diverses génines (quercétine, keampférol, et isorhamnetine). Des acides phénols ont également été identifiés dans les extraits des graines, principalement les acides ferulique, para-hydroxybenzoïque, et para-coumarique, et dans les racines des dérivés des acides tricaffeoylquinique, gallique, ferulique et de l'acide vanillique.

Sur le plan quantitatif, l'analyse par HPLC/DAD/MS a révélé que l'extrait des feuilles présente un contenu relativement plus important notamment en flavonoïdes par rapport à celui des extraits des graines et racines. Ceci conforte les résultats du dosage

spectrophotométrique, qui a révélé un taux élevé en phénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait des feuilles comparé à ceux des racines et des graines.

Notre étude a permis d'établir le profil en composés phénoliques des parties végétatives (graines, et racines) de *Cleome arabica* non auparavant étudiées.

Sur le volet biologique, l'évaluation du potentiel antioxydant par les trois tests *in vitro* (DPPH, FRAP et Phosphomolybdenum) montre un pouvoir antioxydant important de l'extrait des feuilles, comparé à ceux des graines et des racines. Ceci pourrait être justifié par la présence dans les feuilles d'un contenu relativement important en composés phénoliques, comme il a été révélé auparavant par les analyses phytochimiques. Une corrélation positive a été démontrée entre les contenus en phénols totaux et flavonoïdes des différentes parties (feuilles, graines, et racines) de la plante et leur pouvoir antioxydant respectifs.

L'évaluation par les trois tests de douleur ; tail flick (ED50 291,84mg/Kg P.C), plaque chauffante (ED50 848,53mg/Kg P.C), et test de torsion (ED50 683,52mg/Kg P.C) a montré que l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *Cleome arabica* possède un pouvoir analgésique dose-dépendant, qui se manifeste par un mécanisme central et/ou périphérique.

L'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne s'est révélé également doué d'une activité cicatrisante chez le lapin dans le cas de plaies d'excision et thermique. Cet effet cicatrisant de l'extrait de *C. arabica* s'est montré significativement plus important que la pommade commercialisée (Cicatryl[®]) utilisée comme témoin.

Sur le volet toxicité, les essais de toxicité aigue pratiqués par deux voies d'administration (per os, IP) à différentes doses ont montré que l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *C. arabica* est dénué de toxicité chez les rats aux doses maximales prescrites.

D'autre part, le test de larves de crevettes *Artemia salina* à différentes doses (1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,1 mg/ml) montre une mortalité élevée dans tous les lots traités par les extraits des différentes parties de la plante, notamment par celui des graines. Les DL50 obtenues pour les extraits des graines, racines et feuilles sont 85,31 ; 228,55 ; 242,66 µg/ml respectivement.

Pour sa part, le test d'hémolyse pratiqué à différentes doses (1 ; 5 ; 10 ; 20 mg/ml) a montré également que l'extrait des graines possède le pouvoir hémolytique le plus élevé

comparé aux deux autres extraits des feuilles et des racines avec des DL50 égales à 4,1 ; 16,7 ; 38,83mg/ml, respectivement. Toutefois, les valeurs des DL50 reflètent une activité hémolytique faible. La présence des saponines révélées lors screening préliminaire pourrait être associées à l'effet hémolytique observé.

En conclusion,

Sur le volet chimique, les analyses faites restent partielles et ne reflètent pas la totalité du profil chimique de la plante ; à part, les composés phénoliques objet de cette étude, les autres classes de produits naturels, comme les stéroïdes et triterpènes, reportés auparavant dans l'espèce, demeurent insuffisamment caractérisés. Ces composés pourraient être associés aux activités étudiées dans ce travail.

Sur le volet biologique, l'effet antioxydant pourrait être l'un des mécanismes expliquant l'effet analgésique observé chez *Cleome arabica*. Cette plante contient des antioxydants comme les flavonoïdes, en l'occurrence les flavonols, qui peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant le processus de réparation des tissus au niveau moléculaire (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2010. De manière spécifique, les flavonoides inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation.

De même, l'effet antioxydant des extraits de *C.arabica* peut contribuer au processus de la cicatrisation. L'ajout des antioxydants dans le traitement des brûlures entraîne une amélioration du phénomène de la cicatrisation (réduction de l'incidence de l'infection de la plaie, et du temps de guérison). Ceci est dû à l'inhibition de la production des EOR, notamment par les flavonoïdes. Cette dernière peut s'effectuer directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe de ces molécules (Sahib *et al.*, 2010).

Notre évaluation chez l'animal a permis de mettre en évidence une activité analgésique et cicatrisante qui conforte certaines utilisations traditionnelles connues de la plante entant que cicatrisant et remède contre la douleur.

La nature des molécules impliquées dans les activités observées méritent d'être explorées. Ceci pourrait être réalisé grâce à une approche de fractionnement bioguidé. Les molécules actives identifiées pourront par la suite être réévaluées et éventuellement modulées par rapport à leurs réponses biologiques et toxicologiques.

L'absence de toxicité à court terme après administration chez le rat (p.os, I.P) de l'extrait de la partie aérienne de *C.arabica*, associée au faible pouvoir hémolytique donnent des indications favorables à l'innocuité de la plante. Toutefois, des études de toxicité plus large (sub-chronique, chronique, effet mutagène, reprotoxicité, etc.) doivent être faites pour évaluer le potentiel toxique ou non de *C.arabica*.

Références bibliographiques

- Abdeldjelil, M.C. (2016). Effets cicatrisants de produits à base d'huile de lentisque (*Pistacia lentiscus L.*) sur les brûlures expérimentales chez le rat. These doctorat d'Etat en sciences vétérinaires. Université de Constantine.
- Abdel-Kader, M.S., Alqasoumi, S.I., Al-Taweel, A.M. (2009). Hepatoprotective constituents from *Cleome droserifolia*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 57(6), 620-624.
- Abdel-Kawy, M.A., El-Deib, S., ElKhyat, Z., Mikhail, Y.A. (2000). Chemical and biological studies of *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. Part-I. Egypt Journal Biomedicine Science, 6, 204.
- Abdel-Sattar, E., Abdel-Monem, A.R., & Sleem, A.A. (2009). Biological and chemical study of *Cleome paradoxa B.Br.* Pharmacognosy Research, 1, 175–178.
- Afifi, M.S. (2014). Phytochemical and biological investigation of *Cleome brachycarpa vahl.* Growing in egypt. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 5(9), 4008-4014.
- Aharoni, A., Galili, G. (2011). Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. Current Opinion in Biotechnology, 22, 239–244.
- Ahmad, I., Malik, M.I., Iqbal, K., Ahmad, K., & Naz, S. (1990). Efficacy of formalinized liver organ vaccine against Angara disease in broilers. Veterinary Archiv, 60, 131-8.
- Ahmed, S., Sultana, M., Ul hasan, M.M., Azhar, I. (2011). Analgesic and antiemetic activity of *cleome viscosa* l. Pakistan Journal of Botany, 43, 119-122.
- Ahn, B. Z., Yoon, Y.D., Lee, Y.H., Kim, B.H., Sok, D.E. (1998). Inhibitory effect of bupleuri radix saponins on adhesion of some solid tumor cells and relation to hemolytic action: screening of 232 herbal drugs for anti-cell adhesion. Planta Medica, 64, 220-224.
- Ajaiyeoba, E.O., Ashidi, J.S., Okpako, L.C., Houghton, P.J., Wright, C.W. (2008). Antiplasmodial compound from *Cassia siamea* stem bark extract. Phytotherapy Research, 22, 254–255.
- Akroum, S. (2010). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université des Freres Mentouri de Constantine 1-Algerie.
- Alimi, H., Bouoni, Z., Feriani, A., Hfaeidh, N., Sakly, M., Ben Rhouma, K., (2013). Preliminary characterization, antioxidant activities and ulcer curative effect of *Opuntia ficus indica f. inermis* roots polysaccharides in rats. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research, 2(4), 42-51.

- Alkhatib, R. (2010). Étude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris Korovin* et *Ferula lycia Boiss.* (Apiacées). Thèse de Doctorat. Université Lille nord de France.
- Allas, S. (1997). Effets et mécanismes d'actions d'extraits plaquettaires de porc sur la cicatrisation cutanée par première et seconde intention. Thèse Doctorat en sciences biomédicales. Université Montréal, 141
- Al-Sobarry, M., Alwashli, A., Cherrah, Y., Alaoui, K. (2013). Toxicité aiguë et action analgésique d'extrait éthanolique des feuilles d'*Aloe perryi*, plante endémique du Yémen. *Phytothérapie*, 11(1), 17-21.
- Amarowicz, R., Estrella, I., Hernández, T., Robredo, S., Troszynska, A., Kosinska, A., Pegg, R.B. (2010). Free Radical-Scavenging Capacity, Antioxidant Activity, and Phenolic Composition of Green Lentil (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, 121, 705 –711.
- Arts, I.C., & Hollman, P.C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 317S-325S.
- Arya, V., Kumar, D., Gautam, M. (2014). Phytopharmacological review on flowers: Source of inspiration for drug discovery. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4, 45–51.
- Asolkar, L.V., Kakkar, K.K., Chakre, O.J. Second supplement to Glossary of Indian medicinal plants with active principles part I (A–K), (1965–1981). Publications and Information Directorate (CSIR): New Delhi.
- Azza R. Abdel-Monem. (2012). A new alkaloid and a new diterpene from *Cleome paradoxa B.Br.* (Cleomaceae). *Natural Product Research*, 26 (3), 264–269.
- Baba Aissa, F. (2000). Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition Librairie Moderne Rouiba (Alger), 368.
- Baba Aissa, F. (2011). Encyclopédie des plantes utiles. El maarifa (Ed) Alger, 471.
- Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse Doctorat. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from *Hawthorn fresh* plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.

- Bahramsoltani, R., Farzaei, M.H., Rahimi, R. (2014). Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Arch Dermatol Res*, 306(7), 601-617.
- Bala, A., Kar, B., Haldar, P.K., Mazumder, U.K., Bera, S. (2010). Evaluation of anticancer activity of *Cleome gynandra* on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(1), 131-134.
- Bala, A., Kar, B., Karmakar, I., Kumar, R.B.S., Kanti Haldar, P. (2012). Antioxidant activity of Cat's whiskers flavonoid on some reactive oxygen and nitrogen species generating inflammatory cells is mediated by scavenging of free radicals. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10(5), 0321- 0327.
- Baumann, E., Stoya, G., Ikner, A.V., Richter, W., Lemke, C., Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Actahistochem*, 102, 21- 35.
- Bawankule, D.U., Chattopadhyay, S.K., Pal, A., Saxena, K., Yadav, S., Faridi, U., Darokar, M.P., Gupta, A.K., Khanuja, S.P.S. (2008). Modulation of inflammatory mediators by coumarinolignoids from *Cleome viscosa* in female swiss albino mice. *Inflammopharmacology*, 16, 272–273.
- Belfadel, F.Z. (2009) Huile de fruits de *Pistacia lentiscus* caractéristiques physicochimiques et effets biologiques (effet cicatrisant chez le rat). Mémoire de magister en chimie organique. Université de Constantine (Algérie). 136.
- Ben sakhria, A. (2016). Méthodes séparatives : Toxicité des substances chimiques. *analytical toxicology*, 1- 9.
- Bénard, C. (2009). Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de Doctorat : Université de Nancy.
- Bengmark, S. (2004). Acute and "chronic" phase reaction-a mother of disease. *Clinical Nutrition*, 23, 1256-1266.
- Beniston, N.W. (1984). *Fleurs d'Algérie*. Edition Entreprise National du Livre (Algérie), 359.
- Bennani, H., Fiet, J. & Adlouni, A. (2009). Impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate : étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols. *Revue Francophone des Laboratoires*, 416, 23-26.
- Bensegueni, A. (2007). Les onguents traditionnels dans le traitement des plaies et des brûlures. Thèse doctorat d'Etat en sciences vétérinaires, option chirurgie pharmacologie. Université de Constantine, 97.

- Bensegueni, A., Belkhiri, A., Boulebda, N., Keck, G. (2007). Evaluation de l'activité cicatrisante d'un onguent traditionnel de la région de Constantine sur les plaies d'excision chez le rat. *Sciences & Technologie C*, (26), 83-87.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76.
- Bissinger, B.W., Michael Roe, R. (2010). Tick repellents: Past, present, and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96, 63–79.
- Biswas, A.R., Ramaswamy, S., Bapna, J.S. (1991). Analgesic effect of *Momordica charantia* seed extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 115- 118.
- Bohannon, R. W., Pfaller, B. A. (1983). Documentation of wound surface area from tracings of wound perimeters: clinical report on three techniques. *Physical therapy*, 63(10), 1622-1624.
- Bose, A., Mondal, S., Gupta, J-K., Ghosh, T., Dash, G.K., Si, S. (2007). Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia*, 78, 515–520.
- Boulebdia, N., Belkhiri, A., Belfadel, F.Z., Bensegueni, A., Bahri, L. (2009). Dermal wound healing effect of *Pistacia lentiscus* fruits's fatty oil. *Pharmacognosy Research*, 1(2), 66-71.
- Boulos, L. (1983). *Medicinal Plants of North Africa*. Reference Publication Inc Michigan USA ; 52.
- Boumendjel, A., Pietro, A.D., Dumontet, C., Barron, D., 2002. Recent Advances in the discovery of Flavonoïds and analogs with high-Affinity binding to P-Glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. *Medicinal Research Reviews*, 22, 512-529.
- Bounihi, A. (2015). Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées) .Thèse de Doctorat. Université Mohammed V, Maroc.
- Bouriche, H., Miles, E.A., Sellouma, L., Calder, P.C. (2005). Effect of *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72, 195–201.
- Boykin, J.V.JR. (1996). Hyperbaric Oxygen therapy : A physiological approach to selected problem wound healing. *Wounds*, 8(16), 183-198.
- Braho, Z.L., Olgica, D.S., Sava, M. V., Ivana, D.R., Milan, S.D., Ljiljana, R.C. (2013). Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare L.* *Food control*, 33, 498-504.

- Bramara, B.V.B., Vasavi, H.S., Sudeep, H.V., Prasad, K.S. (2017). Hydroalcoholic extract from *Lepidium meyenii* (Black Maca) root exerts wound healing activity in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Wound Medicine*, 19, 75- 81.
- Brenda, M., Contreras, M.L., Fernando, G., René, T. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatum*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(2), 309 -312.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. Edition Technique et documentation, 233.
- Burkill, H.M. (1985). *The useful plants of west tropical Africa, (Families A-D)*, 2nd ed. Kew, UK: Royal Botanic Gardens.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, 74, 2157-2184.
- Calvin, M. (1998). Cutaneous wound repair. *Wounds*, 10(1), 12-32.
- Cao, G., Prior, R.L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44(6), 1309-1315.
- Cavallini, M., Casati, A. (2004). A prospective, randomized, blind comparison between saline, calcium gluconate and diphtherine for washing skin acid injuries in rats: effects on substance P and β -endorphin release. *European journal of anaesthesiology*, 21(5), 389-392.
- Chaabi, M. (2008). *Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse doctorat en science, L'université Frère Mentouri. Constantine & L'université Louis Pasteur.
- Chan, E.C., Jiang, F., Peshavariya, H.M., Dusting, G.J. (2009). Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther*, 122(2), 97-108.
- Chanforan, C. (2010). *Stabilité de micro-constituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate*. Thèse de Doctorat : Université d'Avignon et des pays de vaucluse.
- Chauhan, J.S., Srivastava, S.K., & Srivastava, S.D. (1979). 2 Glycoflavanones from the roots of *Cleome viscosa*. *Indian Journal Of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 17(3), 300-302.

- Cheftel, J.C., Cheftel, H., Besançon, R. (1989). Aspect toxicologique : introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Edition Lavoisier Paris, 137-162.
- Chen, Q. (1993). Methodology in pharmacological study on Chinese materia medica. Beijing: 7 People's Medical Publishing House, 360.
- Cheruvanky, H. (2004). Method for treating hypercholesterolemia, hyperlipidemia and arteriosclerosis. United States Pathol, 6(4), 733-99.
- Christophe, P., & Christophe, S. (2011). Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Edition Springer, 84.
- Colot, M. (1972). Notions techniques de pharmacologie générale. Masson.
- Cos, P., Ying L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van-Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. Journal of Natural Products, 61(1), 71-76.
- Coulibaly, H. (2007). Aspects épidémiocliniques, et prise en charge dermatologique des chéloïdes dans le service de dermato-vénérologie du CNAM. Thèse Doctorat d'état en Médecine de Pharmacie. 90.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. (2010). Comprehensive Natural Products II. Chemistry and Biology, 2, 5 - 39.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). Biochemistry and molecular biology of plants, 24, 1250-1319.
- Cuvelier, M.E. (1992). Mesure de l'efficacité des antioxygènes d'origine végétale: recherche des composés actifs de la sauge. Thèse des Sciences ENSIA de Massy.
- Dangles, O., & Dufour C. (2008). Recent advances in Polyphenol Research. Chapter 3, 67-87.
- Dangles, O., & Dufour, C. (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications, Eds O. Andersen and K. Markham, CRC Press, Boca Raton. Chapter 9, 443-469.
- Dangles, O., Stoeckel, C., Wigand, M.C., Brouillard, R. (1992). Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. Tetrahedron letters, 33(36), 5227-5230.
- De Carvalho, T.I.M., Nogueira, T.Y.K., Mauro, M.A., Gómez-Alonso, S., Gomes, E., Da-Silva, R., Lago-Vanzela, E.S. (2017). Dehydration of jambolan *Syzygium cumini* L. juice during foam mat drying: Quantitative and qualitative changes of the phenolic compounds. Food Research International, 102, 32-42.

- Deachapunya, C., Poonyachoti, S., Thongsaard, W., Krishnamra, N., (2005). Barakol extracted from *Cassia siamea* stimulates chloride secretion in rat colon. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314, 732–737.
- Del Bubba, M., Giordanie, E., Pippucci, L., Cincinelli, A., Checchini, L., Galvan, L. (2009). Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth 104 and ripening and in response to different postharvest treatments. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7), 668-677.
- Dereure, O. (2001). Dynamique de la cicatrisation normale. In : Plaies et cicatrisation au quotidien. Sauramps médical, Montpellier, 15-21.
- Descheemaeker, K. (2003). Nutri-et Phytothérapie : Developpements Recents. Edition Garant, 12- 46.
- Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R. & Perluigi, M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(5), 737–747.
- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K., Maiza, A. (2004). Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana Lam* (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10), 1073-1080.
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Traoré, A.S., Voragen, A.G.J., Van Berkel, W. J.H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1 (1), 21-38.
- Diegelmann, R.F., Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9(1), 283-289.
- Diezi J. 1992. Principes de base et répercussions cliniques. Dans *Pharmacologie : Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Schorderet Editions Frison-Roche, Paris 2^{ème} édition Genève, 33-35.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J.M., & Stocker, P. (2010). isolation and characterisation of new steroid derivative as a powerful antioxydant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxydant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and chemical toxicology*, 48, 2599-2606.
- Djerrou, Z., Maameri, Z., Hamdi-Pacha, Y., Serakta, M., Riachi, F., Djaalab, H., Boukeloua, A. (2010). Effect of virgin fatty oil of *Pistacia lentiscus* on experimental burn wound's healing in rabbits. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 7(3), 258-263.

- Dobke, M. K., Deitch, E.A., Hamar, T. J., Baxter, C.R. (1989). Oxidative activity of polymorphonuclear leukocytes after thermal injury. *Arch. Surg*, 124(7), 856- 859.
- Dohou, N., Gmiran, Y., Idrissi Hassani, L.M. (2003). Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine, *Thymelaea lychroides*. *Acta Botanica Malacitana*, 29, 233-239.
- Dubick, M.A., Zaucha, G.M., Korte, D.W., Wade, C., Wade, J.R. (1993). Acute and subacute toxicity of 7,5% hypertonic saline 6% dextran-70 (HSD) in dogs, biochemical and behavioural responses. *Journal of Applied Toxicology*, 13, 49-55.
- Dykes, L., & Rooney, L.W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal Sciences*, 44, 236 - 241.
- El-Askary, H.I. (2005). Terpenoids from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. *Molecules*, 10(8), 971–977.
- El-Gohary, N. S., Shaaban, M. I. (2013). Synthesis, antimicrobial, anti-quorum-sensing, antitumor and cytotoxic activities of new series of fused [1, 3, 4] thiadiazoles. *European journal of medicinal chemistry*, 63, 185-195.
- Elisabetsky, E., Tânia, A.A., Albuquerque, R.R., Nunes, D.S., Cavalho, A. (1995). Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R.&S.) Muell. Arg. alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*, 48(2), 77-83.
- El-Mougy, S., Abdel-Aziz, S., Al-Shanawany, M., Omar, A. (1991). The gonadotropic activity of *Palmae* in mature male rats. *Alexandria Journal Pharmacology Science*, 5, 156 – 159.
- El-Shenawy, N.S., Soliman, M.F.M., Abdel-Nabi, I.M. (2006). Does *Cleome droserifolia* have anti-schistosomiasis *mansoni* activity?. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48, 223–228.
- Estrada, A., Katselis, G.S., Laarveld, B., Barl, B. (2000). Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega L.* *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 23(1), 27-43.
- Farahpour, M. R., Dilmaghanian, A., Faridy, M., Karashi, E. (2016). Topical *Moltkia coerulea* hydroethanolic extract accelerates the repair of excision wound in a rat model. *Chinese Journal of Traumatology*, 19(2), 97-103.
- Farimani, M.M., Nazarianpoor, E., Rustaie, A., Akhbarib, M. (2016). Phytochemical constituents and biological activities of *Cleome iberica DC.* *Natural product research*, 31(11), 1329-1332.

- Farjam, M.H., Joukar, M., Ranjbar, F. (2014). Antimicrobial, Antifungal and Antioxidant Activity Evaluation of Various Organic Solvent Extracts of *Cleome Turkmena Bobrov*. *Advances in Environmental Biology*, 8(24), 152-155.
- Farkas, O., Jakus, J., Héberger, K. (2004). Quantitative structure- antioxydant activity relationship of flavonoid compounds. *Molecules*, 9(12), 1079-1088.
- Farnood-Shokouhi, S.J., Tajik, H., Mojtaba, H. (2012). Efficacy of topical application of alcoholic extract of yarrow in the healing process of experimental burn wounds in rabbit. *Comparative Clinical Pathology*, 21(2), 177-181.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Ferraq, Y. (2007). Développement d'un modèle de cicatrisation épidermique après une désépidermisation laser. Doctoral dissertation. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Forman, H.J., & Thomas, M.J. (1986). Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annual review of physiology*, 48(1), 669-680.
- Formica, J.V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoïds. *Food & Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
- Fosting, S. (2004). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Maerua angoensis* (Capridaceae). Thèse de doctorat. Bamako.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S, Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88, 587-605.
- Fushiya, S., Kishi, Y., Hattori, K., Batkhuu, J., Takano, F., Singab, A.N.B., Okuyama, T. (1999). Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production inactivated macrophages in vitro. *Planta Medica*, 65(05), 404-407.
- Geneviève B., Caporalino-Djian, C. (1994). Ethnobotanique à Vanuatu et substances naturelles nématocides. Rapport final du programme: substances naturelles nématocides. Rapport final du programme " substances naturelles nématocides".
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3(4), 162-169.
- Glomot, R. (1986). Etude toxicologique in vivo, dans Derache R. (1986). Toxicologie et sécurité des aliments. Ed: Lavoisier, p. 08.

- Gonzalez-Gallego, J., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Tunon, M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*, 104, S15-S27.
- Gosse, F., Guyot, S., Roussi, S., Labstein, A., Fisher, B., Seiler, N., Raul, F. (2005). Chemopreventive properties of apple procyanidins of human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of edon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26(7), 1291-5.
- Goudjala, Y., Toumatiaa, O., Yekkoura, A., Sabaoua, N., Mathieuc, F., Zitounia, A. (2014). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomatoplant growth by endophytic actinomycetes isolated from nativeplants of Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 169, 59– 65.
- Guo, S.A., DiPietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
- Guo-Xiang, Li., & Zai-Qun, Liu. (2008). The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food and chemical toxicology*, 46(3), 886-892.
- Gupta, N.K., & Dixit, V.K. (2009). Hepatoprotective activity of *Cleome viscosa Linn.* Extract against thioacetamide-induced hepatotoxicity in rats, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 23(14), 1289-1297.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxydants ; a personal view. *Nutrition Reviews*, 52(8), 253- 265.
- Halmi S, Madi A, Zaghed N, Berouel K, Lemoui R, Benlakssira B and Hamdi pacha Y. (2016). Phytochemical screening and analgesic activity of *Opuntia ficus indica* cladods extract in Wistar rats. *International Journal of Phytomedicine*, 8(2). 282-286.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850.
- Harborne, J. B., & Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoïd research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Harraz, F.M., Ulubelen, A., Öksüz, S., & Tan N. (1995). Dammarane triterpenes from *Cleome amblyocarpa*. *Plant chemistry*, 39 (1), 175-178.
- Hashim, F.J. (2014). Hemolytic activity of *Cicer arietinum l.* Extracts by two extraction techniques. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 7(1), 141-145.
- Hatz, R .A., Niedner, N., Vanscheidt, W., Westerhof, W. (1994). Wound healing and wound management- a guide for private practice. Springer Verlag, Berlin, 113.

- Heim, K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoïd antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Heisey, R.M., Gorham, B.K. (1992). Antimicrobial effects of plant extracts on *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and other microorganisms. *Letters in Applied Microbiology*, 14, 136–139.
- Hemingway, R.W., Karchesy, J.J. (2012). Chemistry and significance of condensed tannins. Springer Science & Business Media.
- Hider, R.C., Liu, Z.D., Khoder, H.H. (2001). Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology*, 335, 190-203.
- Hirose, K., Jyoama, H., Kojima, Y., Eigyi, M., Hatakeyama, H. (1984). Pharmacological properties of a new anti-inflammatory agent drug. *Neuroscience Research*, 34, 280-286.
- Hodge, H.C., & Sterner, J.H. (1943). Determination of substance acute toxicity by LD50. *Am Ind Hyg Assoc*, 10, 93. In Ilboudo, S., Ouedraogo, M., Some, N., Guissou, P.I., (2009). Criblage phytochimique et evaluation de la toxicite aigue de *Pisolithus tinctorius* (Basidiomycète). *Journal of Science*, 10(2), 6-13.
- Horn, J., Hayes, J., Lawless, H.T. (2002). Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chemical Senses*, 27(7), 653- 659.
- Horton, J.W. (2003). Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicol*, 189, 75-88.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 444, 860-867.
- Intan, S.I., Hideyuk, I., Laid, S., Bouriche, H., Takashi, Y. (2005). Constituents of *Cleome arabica* Leaves and Twigs. *Natural medicine*, 59(1), 53.
- Jarrige, R., & Ruckebusch, Y. (1995). Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion. Editions Quae, 57.
- Jordheim, M., Andersen, O.M., Nozzolillo, C., Treyvaud Amiguet, V. (2009). Acylated anthocyanins in inflorescence of spider flower (*Cleome hassleriana*). *Phytochemistry*, 70, 740–745.
- Joseph, M., Ramani Vincent, A., Charles, A. (2014). The anticancer activity of ethanolic extract of *Cleome felina linn*. *Journal of Pharmacy Research*, 8(9), 1223-1225.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), 4846-4851.

- Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., & Prior, R.L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4638–4644.
- Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Oyugbuaja, V.O. (2004). Identification of active principals of *M. Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *Journal of Medicinal Science*, 4(3), 179-182.
- Kasangana, P.B., Haddad, P.S., Stevanovic, T. (2015). Study of polyphenol content and antioxydant capacity of *Myrianthus Arboreus* (Cecropiaceae) root bark extract. *Antioxydant*, 4, 410-426.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557.
- Khafagi, I.K., & Dewedar, A. (2000). The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 365–376.
- Kirtikar, K.R., & Basu, B.D. (1975). *Indian medicinal plants*, I, 2nd edition. Pal Singh, Dehra Dun: Bishen Singh Mahendra.
- Koffi, N., Beugré, K., Guédé, N.Z., Dossahoua, T., Laurent, A. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d’Ivoire). *Sciences et Nature*, 6(1), 1-15.
- Konig, M., Seholz, E., Hartmann, R., Lehmann, W., Rimpler, H. (1994). Ellagitannins and complex tannins from *Quercus patroae* bark. *Journal of Natural Product*, 57, 1411-15.
- Koyama, J., Morita, I., Tagahara, K., Ogata, M., Mukainaka, T., Tokuda, H., Nishino, H. (2001). Inhibitory effects of anthraquinones and bianthraquinones on Epstein- Barr virus activation. *Cancer Letters*, 170, 15 -18.
- Krishnappa, P., Venkatarangaiah, K., Rajanna, S.K.S., Balan, R.K. (2016). Wound healing activity of *Delonix elata* stem bark extract and its isolated constituent quercetin-3-rhamnopyranosyl-(1-6) glucopyranoside in rats. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(6), 389-395.
- Kumar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R., Pushpangadan, P. (2007) Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. *Journal Ethnopharmacological*. 114(2), 103-113.
- Ladhari A, Laarif A, Omezzine F, Haouala R. (2013). Effect of the extracts of the spiderflower, *Cleome arabica*, on feeding and survival of larvae of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Science*, 13, 61.

- Ladhari, A., Omezzine, F., DellaGreca, M., Zarrelli, A., Zuppolini, S., Haouala, R. (2013). Phytotoxic activity of *Cleome arabica* L and its principal discovered active compounds. South African Journal of Botany, 88, 341–351.
- Laghari, A.Q., Memon, S., Nelofar, A., & Laghari, A.H. (2013). *Tecomella undulata* G. Don: a rich source of flavonoids. Industrial crop and products, 43, 213- 217.
- Lambert, J. D., & Elias, R.J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. Archives of Biochemistry and Biophysics, 501, 65–72.
- Laouini S.E. (2014). Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). These doctorat en science, université Mohamed Khider Biskra.
- Laouini, S.E. (2014). Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf).
- Laplante, A.F., Germain, L., Auger, F.A., Moulin, V. (2001). Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. The FASEB Journal, 15(13), 2377-2389.
- Lapointe, N., St-Hilaire, M., Martinoli, M. G., Blanchet, J., Gould, P., Rouillard, C., Cicchetti, F. (2004). Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. The FASEB journal, 18(6), 717-719.
- Latte, L.P., & Kolodziej, H. (2000). Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. Zeitschrift für Naturforschung C, 55(5-6), 467-472.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W. (2001). Animal models of nociception. Pharmacological Reviews, 53, 597-652.
- Le Bars, D., Gozarium, M., Cadden, S.W. (2001). Evaluation de la douleur aiguë chez l'animal d'expérience. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation. Elsevier, 20(4), 347-365.
- Leitao, D.P., Polizello, A.C., Ito, I.Y., Spadaro, A.C. (2005). Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. Journal of Medicinal Food, 8 (1), 36-40.
- Lenoir, L. (2011). Effet protecteur des polyphenols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Thèse de Doctorat : Université D'Auvergne.

- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Tian, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771-776.
- Link, A., Balaguer, F. & Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1771-1792.
- Maameri, Z., Beroual, K., Djerrou, Z., Habibatni, S., Benlaksira, B. Serakta, M. Mansour-Djaalab, H., Kahlouche-Riachi, F., Bachtarzi, K., Hamdi Pacha, Y. (2012). Preliminary study to assess cicatrizing activity of honey and *Pistacia lentiscus* fatty oil mixture on experimental burns in rabbits. . *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2(3), 476-480.
- Macheix, J.J., Fleuriet, F. & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, 134.
- Marieb, E.N. (2008). *Biologie humaine: principes d'anatomie et de physiologie*. Pearson Education France, 117-118
- Markham, K.R. (1982). *Technics of flavonoïds identification*. Edition Academic press (London), 113.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, C.F.R.I. (2016). Antioxidant potential of two Apiaceae plant extracts: A comparative study focused on the phenolic composition. *Industrial Crops and Products*, 79, 188–194.
- Maurin, Leslie. (2005). *Le porc : modèle animal de cicatrisation cutanée*. Thèse doctorat en vétérinaire. Université Claude-Bernard-Lyon I, 138.
- Médart, J. (2009). *Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative*. Editions De Boeck Supérieur, 49. *Médecine*, 3, 357-362.
- Mendoza-Wilson, A. M., & Glossman-Mitnik, D. (2006). Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 761, 97-106.
- Miller, L.C., & Tainter, M. (1944). Estimation of the ED50 and Its Error by Means of Logarithmic-Probit Graph Paper. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, 57(2), 261-264.
- Molgaard, P., Chihaka, A., Lemmich, E., Furu, P., Windberg, C., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B. (2000). Biodegradability of the molluscicidal saponins of *Phytolacca dodecandra*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(3), 248-255.

- Molla, S.G.E., Motaal, A.A., Hefnawy, H.E., Fishawy, A.E. (2016). Cytotoxic activity of phenolic constituents from *Echinochloa crus-galli* against four human cancer cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 62-67.
- Montagnier, L., Olivier, R., Pasquier, C. (1998). *Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases*. New York : Marcel Dekker.
- Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W., Blake, D.R. (1995). Reactive oxygen species and iron—a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 27(2), 109-122.
- Moulin, Y. (2001). Comprendre le processus de cicatrisation. *Linfirmière du Québec*, 9(1), 37-40.
- Moyo, M., Amoo, S.O., Ncube, B., Ndhlala, A.R., Finnie, J.F., Van Staden, J. (2013). Phytochemical and antioxidant properties of unconventional leafy vegetables consumed in southern Africa. *South African Journal of Botany*, 84, 65–71.
- Mulvihill, E.E., & Huff, M.W. (2010). Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. *Canadian Journal of Cardiology*, 26, 17A-21A.
- Nagaya, H., Tobita, Y., Nagae, T., Itokawa, H., Takeya, K., Halim, A. F., & Abdel-Halim, O. B. (1997). Cytotoxic triterpenes from *Cleome africana*. *Phytochemistry*, 44(6), 1115-1119.
- Nagendran, B., Kalyana S., Samir, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99, 191–203.
- Naima, S., Khan, R.M., Shabbir, M. (2012). Antioxydant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla L.* *BMC complementary and alternative medicine*, 12, 221.
- Narendhirakannan, R.T., Subramanian, S., Kandaswamy, M. (2007). Anti-inflammatory and lysosomal stability actions of *Cleome gynandra L.* studied in adjuvant induced arthritic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45 ,1001-1012.
- Ncube, B., Finnie, J.F., Van Staden, J. (2012). Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 2, 11–20.
- Ndungu, M., Lwande, W., Hassanali, A., Moreka, L., Chhabra, S.C. (1995). *Cleome monophylla* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) and maize weevil (*Sitophilus zeamais*) repellents, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 76, 217–222.

- Nene BI, S.A., Traore, F., zahoui, O.S, Soro, T.Y. (2008). Composition chimique d'un extrait aqueux de *Bridelia ferruginea benth.* (euphorbiaceae) et études de ses effets toxicologique et pharmacologique chez les mammifères. *Afrique Science*, 4(2), 287-305.
- Nève, J. (2002). Nutrition et stress oxydant : Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants. Optimisation of dietary intake of anti-oxidants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 292-300.
- Nguyen, H., Lemberkovics, E., Tarr, K., Mathe, I., Petri, G. (1993). A comparative study on formation of flavonoid, tannin, polyphenol contents in ontogenesis of *Ocimum basilicum L.* (Part II). *Acta Agronomica Hungarica*, 42, 41-50.
- Nkhili, Ez-zohra. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. These doctorat en co-tutelle. Université Cadi Ayyad et université D'Avignon et Des Pays De Vaucluse, 08.
- Notomo, H., Ligo, M., Hamada, H., Kojima, S., Isuda, H. (2004). Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutrition and cancer*, 49(1), 81-88.
- Nsonde-Ntandou, G.F., Banzouz, J.T., Mbatchi, B., Elion-Itou, R.D.G., Etou-Ossibi, A.W., Ramos, S., Benoit-Vical, F., Abena, A.A., Ouamba, J.M. (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea Lam.* Stem bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 108-111.
- Okolo, C.O., Johnson, P.B., Abdurahman, E.M., Abdu-Aguye, I., Hussaini, I.M. (1995). Analgesic effect of *Irvgia gabonensis* stem bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 45, 125-129.
- Olugbenga Morebisea, E.O. Aweb, J. Modupe Makindec, Olumayokun A. Olajided. (2001). Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chasmanthera dependens* leaf methanol extract. *Fitoterapia*, 72, 497-502.
- OMS. (2000). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. Département Médicaments essentiels et politiques pharmaceutiques (EDM) Organisation mondiale de la Santé.
- OMS. (2004). Questions fréquemment posées à propos de l'utilisation du DDT pour la lutte antivectorielle. WHO/CDS/WHOPES/2002.5 Rev.1.
- Osorio-Esquivel, O., Ortiz-Moreno, A., Garduño-Siciliano, L., Álvarez, V. B., Hernández-Navarro, M. D. (2012). Antihyperlipidemic effect of methanolic extract from *Opuntia joconostle* seeds in mice fed a hypercholesterolemic diet. *Plant foods for human nutrition*, 67(4), 365-370.

- Ouedraogo, y., Nacoui, MA., Guissou, I.P., Guede, Gulna F. (2001). Evaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* (wilid).o.ktz (rubiacées). Pharmacopée et médecine traditionnelle Africaine, 11, 13-29.
- Ozenda, P. (1991). Flore et végétation du Sahara. Edition CNRS (Paris), 662.
- Papazian, L., & Roch, A. (2008). Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Edition Springer, 153.
- Parimala devi, B., Boominathan, R., Mandal, S. C. (2002). Evaluation of anti-diarrheal activity of *Cleome viscosa* L. extract in rats. Phytomedicine, 9(8), 739-742.
- Parimala Devi, B., Boominathan, R., Mandal, S.C. (2003). Evaluation of antipyretic potential of *Cleome viscosa* Linn. (Capparidaceae) extract in rats. Journal of Ethnopharmacology, 87, 11-13.
- Parimala devi, B., Boominathan, R., Mandal, S.C. (2003). Studies on analgesic activity of *Cleome viscosa* in mice. Fitoterapia, 74, 262-266.
- Pénicaud, C. (2009). Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de Montpellier II.
- Peynet, J., Beaudoux, J., Legrand, A. (2005). Stress oxydant et athérosclérose. Radicaux libres et stress oxydant, pages 311 -351. In: Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont- Rousselot D. (2005). Aspects biologiques et pathologiques, 45-86.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products, 63(7), 1035-1042.
- Poirier, J. (2004). L'indispensable pour vivre en santé, Edition Merlin, 72.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290-4302.
- Pulido, R., Bravo, L., Sauro-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, Journal of agricultural and food chemistry, 48, 3396-3402.
- Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed Centre National de la recherche scientifique. Tome 1, 386.
- Reichel, J., Benecke, N., Eckert, K.G., Erber, B., Golly, I.C., Kreppel, H., Liebel, B., Mukte, H., Szinicz, L., Zilker, T. (2004). Guide pratique de toxicologie. Ed: DeBoeck, 04.
- Rizk, A.M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia, 35-42.

- Robert, D., & Catesson, A.M. (2000). *Biologie végétale : caractéristiques et stratégie évolutives des plantes. Organisation végétative*. Wolters Kluwer France Edition, 2, 320.
- Rosa, R.M., Melecchi, M.I., Halmenschlager, R.D.C., Abad, F.C., Simoni, C., Caramao, E.B., Henriques, J.A., Saffi, J., de Paula Ramos, A.L. (2006). Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus tiliaceus* methanolic extract. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 7324–7330.
- Roux, D., & Catier, O. (2007). *Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie*. Wolters Kluwer France Edition, 74.
- Sahib, A.S., Al-Jawad F.H., Alkaisy, A.A. (2010). Effect of Antioxidants on the Incidence of Wound Infection in Burn Patients. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 23(4), 199–205.
- Samout, N., Bouzenna, H., Ettaya, A., Elfeki, A., Hfaiedh, N. (2015). Antihypercholesterolemic effect of *Cleome arabica L.* on high cholesterol diet induced damage in rats. *EXCLI journal*, 14, 791.
- Samout, N., Bouzenna, H., Ettaya, A., Elfeki, A., Hfaiedh, N. (2015). Antihypercholesterolemic effect of *Cleome arabica L* on high cholesterol diet induced damage in rats. *Excli journal*, 14, 791-800.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B. (2007). Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 394-405.
- Santos-buelga, C., & scalbert, A. (2000) proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition health. *Journal of the science of food and agriculture*, 80(7), 1094-1117.
- Sarmi, M.P., Cheymer, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed Lavoisier. 2 -10.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., & Boudoukha, C. (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54(4), 313-318.
- Selloum, L., Reichl, S., Müller, M., Sebihi, L., & Arnhold, J. (2001). Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Archives of biochemistry and biophysics*, 395(1), 49-56.
- Selloum, L., Sebihi, L., Mekhalfia, A., Mahdadi, R., Senator, A. (1997). Antioxidant activity of *Cleome arabica* leaves extract. *Biochemical Society Transactions*, 25, 608.
- Sharaf, M., El-Ansari, M. A., Saleh, N. A. (1997). Flavonoids of four *Cleome* and three *Capparis* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(2), 161-166.

- Sharma, S., Chattopadhyay, S.K., Yadav, D.K., Khan, F., Mohanty, S., Maurya, A., Bawankule, D.U. (2012). QSAR, docking and in vitro studies for anti-inflammatory activity of cleomiscosin a methyl ether derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, 952–964.
- Simoes, C., Bizarri, C.H.B., Cordeiro, L.D.S., Carvalho de Castro, T., Coutada, L.C.M., Ribeiro da Silva, A.J., Albarello, N., Mansur, E. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 895–903.
- Simoes, C., De Mattos J.C. P., Sabino, K.C.C., Caldeira-de-Araújo, A., Coelho, M.G.P., Albarello, N., Figueiredo, S.F.L. (2006). Medicinal potential from in vivo and acclimatized plants of *Cleome rosea*. *Fitoterapia*, 77, 94–99.
- Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Geerts, S., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D.A. (1998). Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *Journal of Natural products*, 61(5), 585-590.
- Singer, A.J., & Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10), 738-746.
- Singh, H., Ali, S.S., Khan, N.A., Mishra, A., Mishra, A.K. (2017). Wound healing potential of *Cleome viscosa* Linn. seeds extract and isolation of active constituent. *South African Journal of Botany*, 112, 460-465.
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C. (2002). Mechanism of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free radical biology and Medicine*, 33(5), 575 - 586.
- Songsak, T., & Lockwood, G.B. (2002). Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand. *Fitoterapia*, 73(3), 209-216.
- Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- Spiller, G., & Spiller, M. (2007). *Tout savoir sur les fibres*. Editions le mieux-etre, 27.
- Srivastava, S.K., Srivastava, S.D. (1979). Eriodictyol-5-rhamnoside from *Cleome viscosa*. *Indian journal of chemistry section b-organic chemistry including medicinal chemistry*, 18(1), 86-87.
- Stagos, D., Amoutzias, G. D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A. M. & Kouretas, D. (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2155–2170.

- Stashak, T.S. (1984). Wound healing. In : The practice of large animal surgery (Jennings PB ed). W.B. Saunders Company Philadelphia, 1, 277-294.
- Sudha, G., Sangeetha, M.P., Indhu, R.S., Vadivukkarasi, S. (2011). invitro free radical scavenging activity of raw Pepino fruit (*Solanum muricatum*). International journal of current pharmaceutical research, 3, 137-140.
- Sudhakar, M., Rao, Ch.V., Rao, P.M., Raju, D.B. (2006). Evaluation of antimicrobial activity of *Cleome viscosa* and *Gmelina asiatica*. Fitoterapia 77 47– 49.
- Sukma, M., Chaichantipyuth, C., Murakami, Y., Tohda, M., Matsumoto, K., Watanabe, H. (2002). CNS inhibitory effects of barakol, a constituent of *Cassia siamea Lamk*. Journal of Ethnopharmacology, 83, 87–94.
- Sy, G.Y., Fall, A.D., Diatta, W., Gueye, M., Badji Bassène, E., Faye, B. (2009). Analgesic and anti-inflammatory activity of aqueous root extract of *Cassia sieberiana D. C.* (Caesalpinaceae) Afr. J. Pharm. Pharmacol, 651-653.
- Takhi, D., Ouinten, M., & Yousfi, M. (2011). Study of Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites Extracted From spontaneous Plants from the Area of Laghouat, Algeria. Advances in Environmental Biology, 5(2), 469-476.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chemistry, 104, 1372–1378.
- Teixeira, S., Siquet, C., Alves, C., Boal, I., Marques, M. P., Borges, F., Lima, L.F.C., Reis, S. (2005). Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. Free Radical Biology and Medicine, 39, 1099-1108.
- The Wealth of India, Raw Materials; CSIR: New Delhi, (1950), 2C, 231; (a) (First Suppl. Ser.)The Wealth of India, Raw Materials. (2001) CSIR: New Delhi., 2, 66.
- Tian, Y., Liimatainen, J., Alanne, A.L., Lindstedt, A., Liu, P., Sinkkonen, J., Yang, B. (2017). Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food chemistry*, 220, 266-281.
- Tigrine, C., Bulzomi, P., Leone, S., Bouriche, H., Kameli, A., Marino, M. (2013). *Cleome arabica* leaf extract has anticancer properties in human cancer cells. Pharmaceutical Biology, 51(12), 1508–1514.
- Torres, N., Hilbert, G., Luquin, J., Goicoechea, N., Antolín, M.C. (2017). Flavonoid and amino acid profiling on *Vitis vinifera L. cv* Tempranillo subjected to deficit irrigation under elevated temperatures. Journal of Food Composition and Analysis, 62, 51-62.

- Tortora, Derrickson. 2007. Principes d'anatomie et de physiologie. 4e édition. Ed: deboek, 176-177.
- Touil, A., & Rhouati, S. (1998). Flavonol glycosides from *Cleome arabica*. Journal de la société algérienne de chimie, 8, 117-120.
- Trease, E.G., & Evans, W.C. (1978). Pharmacognosy. 11th Edition, Balliere Tindall. London, 115-222.
- Trouillas, P., Marsal, P.D. Lazzaroni, S.R., Duroux, J. L. (2006). A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. Food Chemistry, 97, 679-688.
- Tsichritzis, F., Abdel-Mogip, M., & Jakupovic, J. (1993). Dammarane triterpènes from *Cleome africana*. Phytochemistry, 33, 423-5.
- Türkan, K., Kasim, T., Bircan, Ç., Murat, K. (2014). DNA damage protecting activity and in vitro antioxidant potential of the methanol extract of Cherry (*Prunus avium L.*). Journal of medicinal plant research, 8(19), 715-726.
- UICNR. (2005). A guide to medicinal plants in North Africa. Union internationale pour la conservation de la nature et ses ressources, Centre for mediterranean cooperation, Malaga, 256.
- Uzilday, B., Turkan, I., Sekmen, A.H., Ozgur, R., Karakaya, H.C. (2012). Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. Plant Science, 182, 59– 70.
- Van Acker, S.A., Tromp, M.N., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine, 20(3), 331-342.
- Vandenbussche, F. (1983). Histoire naturelle de la cicatrisation retardée. NPN Médecine, 3, 357-362.
- Vaz, Z.R., Yunes, R.A., Calixto, J.B. (1996). Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4, 6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 278(1), 304-312.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2008). Phenolic compound biochemistry. Springer, 7-15.
- Visioli, F., Borsani, L. & Galli, C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. Cardiovascular Research, 47, 419 - 425.

- Vogel, A. (1820). De l'existence de l'acide bezoïque dans la feve de tonka et dans les fleurs de mélilot (On the existence of benzoic acid in the tonka bean and in the flowers of melilot). *Journal de Pharmacie*, 6, 305-09.
- Vowden, K. (1994). Common problems in wound care: wound and ulcer measurement. *British journal of nursing* (Mark Allen Publishing), 4(13), 775-779.
- Wang, H.X., & Ng, T.B. (1999). Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life sciences*, 65(25), 2663-2677.
- Wei, Q.Y., Chen, W.F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L. (2006). Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. *BBA - General Subjects*, 1760, 70-77.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.
- Woff, K.L.T. & Liu, R.H. (2008). Structure–activity relationships of flavonoids in the cellulaire antioxidant activity assay .*J.Agriculture .Food chem.* , 56, 8404- 8411.
- Woldemichael, G.M., Wink, M. (2001). Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *J Agric Food Chem*, 49, 2327-2332.
- Wollenweber, E. & Dorr, M. (1992). Flavonoïd aglycones of *Cleome spinosa* (Cleomaceae). *Phytochemical Bulletin*, 24, 2-4.
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, 423 - 447.
- Xie, F., Mian Zhanga, B., Zhanga, C.F., Wanga, Z.T., Yua, B.Y., Koua, J.P. (2008). Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from *Melia toosendan* fruit. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 463–466.
- Yamamoto, N., Nambu, M., Azuma, R., & Kiyosawa, T. (2006). Dermal neoformation during partial-thickness skin wound healing. *Annals of plastic surgery*, 56(2), 182-185.
- Yamanaka, N., Samu, O., Nagao, S. (1996). Green tea catechins such as (-) epicatechin and (-) epigallocatechin accelerate Cu⁺² induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Lett*, 401, 230-4.
- Yang, C.S., Li, G., Yang, Z., Guan, F., Chen, A. & Ju, J. (2013). Cancer prevention by tocopherols and tea polyphenols. *Cancer Letters* 334, 79–85.

Zahouani, H., Assoul, M., Janod, P., Mignot, J. (1992). Theoretical and experimental study of wound healing: application to leg ulcers. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 30(2), 234-239.

Zani, C. L., Chaves, P. P. G., Queiroz, R., De Oliveira, A. B., Cardoso, J. E., Anjos, A. M. G., Grandi, T. S. M. (1995). Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine*, 2(1), 47-50.

Zeghad, N., Madi, A., Helmi, S., Belkhiri, A. (2016). In vivo analgesic activity and safety assessment of *Vitis vinifera L* and *Punica granatum L* fruits extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* September, 15(9), 1915-1921.

Zhang, D., Liu, Y., Le, C., Wei, Y., Wang, D., Cai, S., Zhou, F., & Ji, B. (2013). Relationship between the structures of flavonoids and oxygen radical absorbance capacity values. A quantum chemical analysis. *Journal Physical Chemistry*, 117, 1784–1794.

Zheng, W., & Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.

Résumé

Cleome arabica ssp arabica a fait l'objet d'une étude phytochimique et pharmacologique dont l'objectif ultime est la valorisation de cette espèce désertique menacée.

Les différentes parties végétatives (feuilles, graines et racines) de *C. arabica* ont subi une extraction hydroalcoolique. Les extraits préparés ont été évalués pour leurs activités antioxydante, antalgique et cicatrisante, ainsi que leur potentiel toxique.

En parallèle, une évaluation quantitative a été faite du contenu des extraits des différentes parties végétatives en phénols totaux, flavonoïdes et anthocyanidines, complétée par une analyse chromatographique (HPLC/DAD/MS). Ces derniers examens ont révélé, d'une part que les extraits des feuilles sont les plus riches en ces composés phénoliques par rapport aux autres parties de la plante, et d'autre part, que les extraits hydroalcooliques des trois parties sont marqués par la présence des flavonoïdes principalement du type flavonol à diverses génines (quercétine, keampférol, et isorhamnetine). Des acides phénols ont également été identifiés dans les extraits des graines, principalement les acides ferulique, para-hydroxybenzoïque, et para-coumarique, et dans les racines des dérivés des acides tricaffeoylquinique, gallique, ferulique et de l'acide vanillique.

L'évaluation du potentiel antioxydant par les trois tests *in vitro* (DPPH, FRAP et Phosphomolybdenum) a montré un pouvoir antioxydant important de l'extrait des feuilles, comparé à ceux des graines et des racines avec une corrélation positive vis-à-vis de leurs contenus en phénols totaux et flavonoides.

Les doses effectives obtenues par les trois tests de douleur sont, pour tail flick (ED50 291,84mg/Kg P.C), plaque chauffante (ED50 848,53mg/Kg P.C) et test de torsion (ED50 683,52mg/Kg P.C). L'effet analgésique de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *C. arabica* s'est révélé dose-dépendant.

Ce même extrait est doué également d'une activité cicatrisante chez le lapin dans le cas de plaies d'excision et thermique. Cet effet cicatrisant de l'extrait de *C. arabica* s'est montré significativement plus important que la pommade commercialisée (Cicatryl[®]) utilisée comme témoin.

Les essais de toxicité (toxicité aigue, effet hémolytique) ont montré que l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de *C. arabica* est dénué de toxicité aux doses maximales prescrites.

Mots clés : *Cleome arabica ssp arabica*, HPLC/DAD/MS, phénols totaux, flavonoïdes, bioactivité, toxicité.

Abstract

Cleome arabica ssp arabica, a threatened desert plant, has been subjected to the phytochemical and pharmacological screening.

Hydroalcoholic extracts from different parts (leaves, seeds and roots) of *C. arabica* have been tested for their antioxidant, analgesic and wound healing activities, as well as their toxic potential.

Quantitative evaluation of the total phenols, flavonoids and anthocyanidins contents of the different extracts were made and completed with chromatographic HPLC/DAD/SM analysis. The obtained results revealed that leaves extract was characterized by a highly content in phenolic compounds, compared to other extracts.

Hydroalcoholic extract of the three parts of plant were marked by the presence of flavonoids, specially of flavonols type (quercetin, keampferol, and isorhamnetin). Phenolic acids content is marked by the presence in the seeds extract of ferulic acid, para-hydroxybenzoic acid, and para-coumaric acid, and in the roots extract of tricaffeoylquinic, gallic, ferulic, and vanillic acids.

Evaluation of antioxidant effect made by the three *in vitro* tests (DPPH, FRAP and Phosphomolybdenum) showed a highly antioxidant activity of the leaves extract compared to those of seeds and roots. A direct correlation was found between phenol total and flavonoids contents and antioxidant activity.

The effective doses obtained by three pain tests, namely tail flick, hot plate and acetic acid test were 291,84mg/Kg, 848,53mg/Kg and 683,52mg/Kg respectively. Analgesic activity of the aerial part of *C. arabica* was found to be dose-dependent.

The Hydroalcoholic extract displayed on excision and thermal healing activities wounds. The wound healing effect of *C.arabica* was significantly more important than that of a commercial ointment used as a positive control (Cicatryl[®]).

Toxicity assays (acute toxicity, and hemolytic effect) have showed that Hydroalcoholic extract of aerial part of *C. arabica* is safe at the maximal described doses.

Key words: *Cleome arabica ssp arabica*, HPLC/DAD/MS, total phenols, flavonoids, bioactivity, toxicity assays.

المخلص

أجريت هذه الدراسة على نبتة طبية توجد في الصحراء *Cleome arabica ssp arabica* و قد اهتمت بدراسة تركيبها الكيميائي للمستخلص الكحولي و خصائصها البيولوجية (المضادة للاكسدة، النشاط المسكن للالم، التئام الجروح، بالإضافة إلى تقييم درجة السمية).

التحليل الفيتوكيميائية الكمية بواسطة الطرق الطيفية مكنت من تقدير كمية الفينولات و الفلافونيدات الموجودة في المستخلص الكحولي لكل من الأوراق ، البذور و الجذور للنبتة *Cleome arabica* . هذه الدراسة دعمت بطريقة التحليل الكروماتوغرافي HPLC /DAD/MS التي مكنت من تحديد نوع الفلافونيدات الموجودة في كل المستخلصات ، حيث بينت وجود نوع أساسي هو الفلافنول (quercetine, keampferol, isorhamnetine). كذلك تم اثبات وجود احماض فينولية و تحديد نوعها في كل من مستخلص البذور (حمض tricafeoylquinic, gallic, حمض ferulic, para-hydroxybenzoic para-coumaric و الجذور) (ferulic, vanillic).

دراسة النشاط المضاد للاكسدة لمستخلص كل من الأوراق، البذور و الجذور *C. arabica* بثلاث اختبارات (DPPH, FRAP و Phosphomolybdenum) مكنت من إثبات ان المستخلص الكحولي للأوراق له قدرة مضادة للاكسدة عالية بالمقارنة مع المستخلصين الآخرين. و هذه الخاصية لها علاقة مباشرة مع كمية الفينولات و الفلافونيدات الموجودة في المستخلصات.

تم تقييم قدرة تسكين الألم لمستخلص النبتة *C. arabica* (بدون الجذور) بثلاث طرق غمر الذيل، و اختبار الالتواء، و قد أظهرت النتائج أن استهلاك مستخلص النبتة قادر على تخفيف الألم بصفة معتبرة. قدر التركيز الفعال (ED50) ب 291,84 م غ/كغ لاختبار غمر الذيل، 848,53 م غ/كغ لاختبار اللوحة الساخنة و 683,52 م غ/كغ لاختبار الالتواء.

نفس المستخلص اختبر بطرق مختلفة لتقييم قدرته على التئام الجروح، و قد أظهرت نتائج التجارب التي أجريت على جلد الأرنب ان هذا المستخلص له قدرة فعالة على التئام الجيد و للجروح بالمقارنة بمرهم يدعى Cicatryl®.

على مستوى تجارب السمية و الاختبار الانحلالي على الكريات الحمراء ، اتضح ان مستخلص النبتة *C. arabica* غير سام من أجل أعلى التركيزات المستعملة.

الكلمات المفتاحية : *Cleome arabica ssp arabica*, HPLC/DAD/MS , الفينولات , الفلافونيدات ,

النشاط البيولوجي, تجارب السمية.

Nom : Madi Prénom : Aicha	Date de soutenance : 31 / 01/ 2018																					
Titre : Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques de <i>Cleome arabica</i>																						
Nature du diplôme : Thèse doctorat en sciences. Option : biotechnologie végétale																						
<p>Résumé</p> <p><i>Cleome arabica ssp arabica</i> fait l'objet d'une étude phytochimique et pharmacologique dont l'objectif ultime est la valorisation de cette espèce désertique menacée.</p> <p>Les différentes parties végétatives (feuilles, graines et racines) de <i>C. arabica</i> ont subi une extraction hydroalcoolique. Les extraits préparés ont été évalués pour leurs activités antioxydante, antalgique et cicatrisante, ainsi que leur potentiel toxique.</p> <p>En parallèle, une évaluation quantitative a été faite du contenu des extraits des différentes parties végétatives en phénols totaux, flavonoïdes et anthocyanidines, complétée par une analyse chromatographique (HPLC/DAD/MS). Ces derniers examens ont révélé, d'une part que les extraits des feuilles sont les plus riches en ces composés phénoliques par rapport aux autres parties de la plante, et d'autre part, que les extraits hydroalcooliques des trois parties sont marqués par la présence des flavonoïdes principalement du type flavonol à diverses génines (quercétine, keampférol, et isorhamnetine). Des acides phénols ont également été identifiés dans les extraits des graines, principalement les acides ferulique, para-hydroxybenzoïque, et para-coumarique, et dans les racines des dérivés des acides tricaffeoylquinique, gallique, ferulique et de l'acide vanillique.</p> <p>L'évaluation du potentiel antioxydant par les trois tests <i>in vitro</i> (DPPH, FRAP et Phosphomolybdenum) a montré un pouvoir antioxydant important de l'extrait des feuilles, comparé à ceux des graines et des racines avec une corrélation positive vis-à-vis de leurs contenus en phénols totaux et flavonoïdes.</p> <p>Les doses effectives obtenues par les trois tests de douleur sont, pour tail flick (ED50 291,84mg/Kg P.C), plaque chauffante (ED50 848,53mg/Kg P.C) et test de torsion (ED50 683,52mg/Kg P.C). L'effet analgésique de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de <i>C. arabica</i> s'est révélé dose-dépendant.</p> <p>Ce même extrait est doué également d'une activité cicatrisante chez le lapin dans le cas de plaies d'excision et thermique. Cet effet cicatrisant de l'extrait de <i>C. arabica</i> s'est montré significativement plus important que la pommade commercialisée (Cicatryl[®]) utilisée comme témoin.</p> <p>Les essais de toxicité (toxicité aigue, effet hémolytique) ont montré que l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de <i>C. arabica</i> est dénué de toxicité aux doses maximales prescrites.</p>																						
Mots clés : <i>Cleome arabica ssp arabica</i> , HPLC/DAD/MS, phénols totaux, flavonoïdes, bioactivité, toxicité.																						
Laboratoire de recherche : Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. Institut des sciences Vétérinaires. Université Constantine 1. Algérie																						
Jury : <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">Président : KHELIFI DOUADI</td> <td style="width: 33%;">Prof</td> <td style="width: 33%;">Université Des Frères Mentouri. Constantine1</td> </tr> <tr> <td>Encadreur : BELKHIRI ABDELMALIK</td> <td>Prof</td> <td>Université Salah Boubnider. Constantine 3</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Examineurs :</td> </tr> <tr> <td>AKKAL SALAH</td> <td>Prof</td> <td>Université Des Frères Mentouri. Constantine1</td> </tr> <tr> <td>YAHIA ABDELOUAHEB</td> <td>Prof</td> <td>Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf. Mila</td> </tr> <tr> <td>ZELLAGUI AMAR</td> <td>Prof</td> <td>Université Larbi Ben M'hidi. Oum El Bouaghi</td> </tr> <tr> <td>MOUAS TOUMA NARDJES</td> <td>MCA</td> <td>Université Des Frères Mentouri. Constantine1</td> </tr> </table>		Président : KHELIFI DOUADI	Prof	Université Des Frères Mentouri. Constantine1	Encadreur : BELKHIRI ABDELMALIK	Prof	Université Salah Boubnider. Constantine 3	Examineurs :			AKKAL SALAH	Prof	Université Des Frères Mentouri. Constantine1	YAHIA ABDELOUAHEB	Prof	Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf. Mila	ZELLAGUI AMAR	Prof	Université Larbi Ben M'hidi. Oum El Bouaghi	MOUAS TOUMA NARDJES	MCA	Université Des Frères Mentouri. Constantine1
Président : KHELIFI DOUADI	Prof	Université Des Frères Mentouri. Constantine1																				
Encadreur : BELKHIRI ABDELMALIK	Prof	Université Salah Boubnider. Constantine 3																				
Examineurs :																						
AKKAL SALAH	Prof	Université Des Frères Mentouri. Constantine1																				
YAHIA ABDELOUAHEB	Prof	Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf. Mila																				
ZELLAGUI AMAR	Prof	Université Larbi Ben M'hidi. Oum El Bouaghi																				
MOUAS TOUMA NARDJES	MCA	Université Des Frères Mentouri. Constantine1																				

