

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ferhat Abbas, Sétif

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie

Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister

En Biochimie

Option: Biochimie appliquée

Thème

**Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne
d'extraits d'*Artemisia campestris* L.**

Présenté par:
Boudjouref Mourad

Devant le jury:

Président:	Pr. Bouriche Hamama	U.F.A.Sétif.
Encadreur:	Dr. Belhattab Rachid	U.F.A.Sétif.
Examineur:	Pr. Khennouf Seddik	U.F.A.Sétif.
	Dr. Zerroug Mohamed Mihoub	U.F.A.Sétif.

Dédicaces

À mes chers parents

À la pensée de mes grands parents

À mon petit frère

À mes frères

À toute ma famille

À mes amis et mes collègues

À tous ceux qui aiment la science

Remerciement

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à M^r Bellhattab Rachid, maitre conférence à l'université Ferhat Abbas pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseil et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à M^{me} Bouriche Hamama, professeur à l'université Ferhat Abbas d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également mes vifs remerciements à M^r Khennouf Seddik, professeur à l'université Ferhat Abbaspour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

J'exprimemes vifs remerciements à M^r Zerroug Mohamed Mihoub, maitre conférence à l'université Ferhat Abbas pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.

Aux personnels du laboratoire de bactériologie de l'hôpital universitaire de Batna pour leur aide, en particulier Pr. Kasseh et à Taha pour leur aide.

Aux personnels de la bibliothèque centrale et la bibliothèque de la faculté de médecine surtout Ahmed et Belkassem.

À tous mes amis.

À tous les étudiants de magistère de la promotion 2008.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Première partie : Etude bibliographique	
Introduction.....	1
I- La plante <i>Artemisia campestris</i>	2
I -1-Généralités	2
I -2- Description botanique	2
I -3- Systématique de la plante.....	3
I -4- Origine et distribution	3
I -5- Composition chimique	3
I -6- L'utilisation traditionnelle d' <i>Artemisa campestris</i>	6
I -7- Activités biologiques	6
II- Les métabolites secondaires	9
II-1-Les polyphénols.....	9
II-1-1- Les flavonoïdes.....	9
II-1-1-1- Structure et classification.....	9
II-1-1-2- Localisation et distribution	10
II-1-1-3- Les principales classes de flavonoïdes	10
II-1-1-4- Activités biologiques des flavonoïdes	15
II-1-2- Les tanins.....	17
II-1-2-1-Localisation et distribution	17
II-1-2-2-Classification	17
II-1-2-3- Utilisation des tanins	19
III- Le stress oxydatif	20
III-1- Définition	20
III-2- Les radicaux libres	20
III-3- Les espèces réactives de l'oxygène.....	20
III-4- Les conséquences moléculaires du stress oxydatif	21
III-5- Les antioxydants.....	23
III-5-1-Les antioxydants endogènes.....	23
III-5-2- Les antioxydants exogènes.....	25

III-6- Les maladies liées au stress oxydatif	26
IV- Activité antimicrobienne.....	27
IV-1- Généralités	27
IV-2- Culture des bactéries	27
IV-3- Les antibiotiques	27
IV-4- Activité antimicrobienne des extraits des plantes.....	28
IV- 5- Description des bactéries étudiées	28

Deuxième partie : Etude expérimentale

I- Matériels et méthodes	30
I-1- Matériel végétal	30
I-2- Matériel de laboratoire.....	30
I-3- Extraction.....	31
I-3-2- Détermination du rendement.....	33
I-4- Analyses quantitatives des extraits	33
I-4-1-Dosage des polyphénols totaux.....	33
I-4-2-Dosage des flavonoïdes.....	33
I-4-3- Dosage des flavonols	34
I-5-Tests des activités biologiques.....	34
I-5-1- Test de l'activité antioxydante	34
a- Mise en évidence de l'activité antioxydante	34
b- Test de blanchissement du β -carotène.....	35
c- Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH.....	36
I-5-2-Test de l'activité antimicrobienne.....	37
I-6-Expressions des résultats	38
II- Résultats	39
II-1- Extraction	39
II-2- Résultats de l'étude quantitative.....	41
II-2-1- Dosage des polyphénols totaux	41
II-2-2- Dosage des flavonoïdes	41
II-2-3- Dosage des flavonols	41
II-3- Résultats des tests biologiques	45
II-3-1- Activité antioxydante.....	45
a- Test visuel de décoloration du β -carotène	45
b- Méthode de blanchissement du β -carotène	49

c- Méthode de réduction du radical libre DPPH.....	51
II-3-2- Activité antimicrobienne	54
III-Discussion	57
III-1- Analyses quantitatives des extraits.....	57
III-2-Activité antioxydante	58
III-2-1- Test visuel du β -carotène	58
III-2-2- Méthode de blanchissement du β -carotène	58
III-2-3- Méthode de réduction du radical libre DPPH	60
III-3- L'activité antimicrobienne	60
Conclusion.....	62
Références	64
Annexes	

Résumé

Artemisia campestris est une plante médicinale appartenant à la famille des *Astéracée*, cette espèce connue sous le nom de « Tgouft », est très répandue dans le sud algérien. Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant trois solvants: chloroforme, acétate d'éthyle et l'éthanol. Les rendements respectifs sont : 3.4% (m/m), 2.26% (m/m) et 0.48% (m/m). La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 178 - 91 et 102 mg EAC/g Ps dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$, leur teneur est de 16.88 - 19.47 et 21.33 mg EQ/g Ps dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement. Les flavonols sont estimées par une autre méthode utilisant $AlCl_3$. Leur teneur est de 31.13- 36.86 et 12.70 mg EQ/g Ps dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes: la technique de blanchissement du β -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH Pour le premier test elle a été estimée à 76,68% - 89,32% - 80,97% pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol respectivement, celle du BHT 99.94%. Pour le second test $L'CI_{50}$ a été estimée à 105.76 – 100.20 – 68.10 μ g/ml pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol respectivement. Alors que celle du témoin positif BHA est de 51.17 μ g/ml. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disque. La concentration minimale inhibitrice (CMI) manifestée par les trois extraits sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia Coli* est de 1.8 mg/ml et 0.5 mg/ml respectivement et sur *Proteus mirabilis* a été 0.75 mg/ml et 1.5 mg/ml pour les extraits de chloroforme et de l'acétate d'éthyle respectivement. Tous les extraits ont un effet sur les microorganismes testés sauf sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots clés : *Asteraceae*, *Artemisia campestris*, extraits organiques, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

المخلص

يعرف نبات *Artemisia campestris* بأنه نبتة طبية تنتمي إلى عائلة *Asteraceae*، تنتشر هذه النبتة المعروفة باسم "تقوفت" بصفة خاصة في منطقة الجنوب الجزائري. تم الحصول على المستخلصات العضوية بواسطة النقع و ذلك باستعمال ثلاث مذيبات عضوية: الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول فكان المردود (m/m) 3.4%، 2.26%، 0.48% (m/m) على الترتيب. تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي في المستخلصات باستعمال طريقة كاشف-Folin-Ciocalteu كانت النتائج كما يلي: 102 - 91 - 178 mg EAC/g Ps في مستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. تم تقدير الفلافونويدات باستعمال طريقة AICI3. كان تركيز هذه الاخيرة : 16.88 - 19.47 mg EQ/g Ps 21.33 في مستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. بينما قدرت الفلافونولات باستعمال طريقة اخرى تعتمد كذلك AICI3 وقد كان تركيزها كما يلي: 31.13 mg EQ/g Ps - 36.86 - 12.70 في مستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. قدرت النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال طريقتين مختلفتين: اختبار ابيضاض ال β -carotène وتقنية إرجاع الجذر الحر DPPH. أظهرت نتائج الاختبار الأول ان قيمة النشاطية كانت كما يلي : 76,68%، 89,32%، 80,97% بالنسبة لمستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب، بينما قيمتها كانت للشاهد الموجب BHT = 99.94%. أما فيم يخص الاختبار الثاني كانت IC_{50} للمستخلصات كما يلي : 68.10 - 100.20 - 105.76 μ g/ml بالنسبة لمستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. اما بالنسبة للشاهد الموجب BHA كانت IC_{50} = 51.17 μ g/ml حددت النشاطية المضادة للميكروبات والتركيز الأدنى للتثبيط لأربعة سلالات بكتيرية بطريقة الأقراص فكانت النتائج كما يلي: التركيز الأدنى للتثبيط (CMI) لسلالتي كل من *Staphylococcus aureus*، *E. Coli* قدر ب 0.5mg/ml - 1.8mg/ml، أما بالنسبة لسلالة *Proteus mirabilis* كانت قيمتها 0.75 - 1.5 mg/ml لمستخلصي كل من الكلوروفوم و اسيتات الايثيل على الترتيب. المستخلصات كلها كانت مؤثرة على كل السلالات المختبرة فيما عدى *Pseudomonas aeruginosa* التي كانت مقاومة.

كلمات مفاتيح : *Asteracea*، *Artemisia campestris*، المستخلصات العضوية، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للميكروبات.

Artemisia campestris is a medicinal plant belonging to the Asteraceae family, this species known as « Tgouft » is very widespread in the south of Algeria. Organic extracts were obtained by maceration with three solvents: chloroform, ethyl acetate and ethanol. The yields were: 3.4% (w/w), 2.26% (w/w) and 0.48% (w/w) respectively. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent, it was: 178- 91–102 mg CAE/g dw for the chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts respectively. The flavonoïd contents was determined using a method $AlCl_3$, it were respectively: 16.88 - 19.47 – 21.33 mg QE/g dw in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts. The flavonols contents were respectively: 31.13- 36.86- 12.70 mg QE/g dw in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts.

Antioxidant activity was evaluated using two different methods: β -carotene bleaching method and Free radical scavenging effects of the free radical DPPH. In former test, the percentage of inhibition was 76,68% - 89,32% and 80,97% for the chloroform, ethyl acetate and ethanol extracts respectively, whereas in the latter, the IC_{50} estimated for extracts was: 105.76 – 100.20 – 68.10 μ g/ml in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts, this effect seems to be weak when compared to BHA ($IC_{50} = 51.17\mu$ g/ml). Antimicrobial activity was determined using four bacterial strains according to the disk diffusion assay; the minimal inhibitory concentration (MIC) was 1.8 mg/ml and 0.5mg/ml for the three solvents when tested on *Staphylococcus aureus* and *E. coli* respectively, and was 0.75 mg/ml and 1.5mg/ml for chloroform and ethyl acetate extracts when tested against *Proteus mirabilis*. Despite *Pseudomonas aeruginosa*, all the microorganisms tested were sensitive to the extracts.

Key words: *Asteraceae*, *Artemisia campestris*, organic extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Liste des abréviations

AAR : Activité anti-radicalaire.

ABTS: 2, 2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid.

AMP: Adenosine monophosphate.

AMX: Amoxicilline

ATCC: American type culture collection.

ATM: Aztreonam

BHA: Butylated hydroxyanisole.

BHT: Butylated hydroxtoluène.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CFS: Cefsulodine

CI₅₀: Concentration inhibitrice à 50%.

DMSO: Diméthyl sulfoxyde.

CN: Gentamycine

CO: Cyclooxygénase.

DMSO: Diméthylsulfoxyde

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

Mg EAC/g Ps : Milligramme d'équivalent acide caféique par gramme du poids sec de la plante.

Mg EQ/g Ps: Milligramme d'équivalent quercétine par gramme du poids sec de la plante.

FEP: Céfépime

FOS: Fosfomycine

GPx: Glutathion peroxydases.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

HOCL: L'acide hypochloreux.

IPM: Imipénème

ITC: Ticarcilline

K: Kanamycine

LDL: Low density lipoprotein.

LO: Lipooxygénase.

MH: Mueller Hinton agar.

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NO: Nitric oxide.

O_2^{*-} : Radical superoxide.

*OH: Radical hydroxyle.

ONOO: Peroxynitrite.

OX: Oxacilline

P: Pénicilline

PIP: Pipéracilline

ROS: Reactive oxygen species.

SOD: Superoxyde dismutase.

TE: Tetracycline

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.

TIC: Ticacilline

W/W: Weight / Weight.

Listes des figures

Fig. 1: Photo d'*Artemisia campestris*2

Fig. 2: Structure de base des flavonoïdes**Erreur ! Signet non défini.**0

Fig. 3: Structure de base des flavones	Erreur ! Signet non défini.	2
Fig. 4: Structure de base des flavonols	Erreur ! Signet non défini.	2
Fig. 5: Structure de base des flavanones	Erreur ! Signet non défini.	2
Fig. 6: Structure de base des flavanols	Erreur ! Signet non défini.	2
Fig. 7: Structure de base des chalcones	Erreur ! Signet non défini.	4
Fig. 8: Structure de base des anthocyanidines	Erreur ! Signet non défini.	4
Fig. 9: Piégage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes	Erreur ! Signet non défini.	5
Fig. 10: Classification des tanins	Erreur ! Signet non défini.	8
Fig. 11: Extraction par les solvants organiques de la partie aérienne d' <i>A. campestris</i>		32
Fig. 12: Droite d'étalonnage des polyphénols totaux des extraits.....		42
Fig. 13 : Evaluation des polyphénols totaux des extraits		42
Fig. 14: Droite d'étalonnage des flavonoïdes des extraits.....		43
Fig. 15 : Evaluation des flavonoïdes des extraits.		43
Fig. 16: Droite d'étalonnage des flavonols des extraits.....		44
Fig. 17: Evaluation des flavonols des extraits		44
Fig. 18: Diamètre des halos oranges en présence de différentes concentrations d'extraits		46
Fig. 19: Diamètre des halos oranges en présence des témoins.....		47
Fig. 20: Cinétique de l'inhibition du blanchissement du β -carotène par extraits d' <i>Artemisia campestris</i> et du témoin positif BHT.....		50
Fig. 21: Activité antioxydante des extraits d' <i>Artemisia campestris</i>		52
Fig. 22: Activité antioxydante du standard BHA.		53

Liste des tableaux

Tab. I: Teneur en polyphénols chez <i>Artemisia campestris</i>	5
--	---

Tab. II: Principaux flavonoïdes rencontrés chez <i>Artemisia campestris</i>	5
Tab. III: Aspect, couleur et rendement de différents extraits d' <i>Artemisia campestris</i>	40
Tab. IV: Intensité de la couleur des halos autour des puits.....	48
Tab. V: L'activité antioxydante des extraits bruts et du témoin positif et négatif.....	50
Tab. VI: Valeurs des CI ₅₀ des extraits bruts et témoin déterminées par le test au DPPH.....	53
Tab. VII: Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques.....	54
Tab. VIII: Activité antibactérienne des extraits d' <i>A. campestris</i> exprimée en concentration minimale inhibitrice (mg/ml).....	56

Etude bibliographique

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse.

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc.

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Artemisia*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Artemisia campestris*. Cette plante largement utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères, les brûlures, la diarrhée,...etc. a constitué le sujet de plusieurs études qui ont déterminé leurs compositions chimiques (De Pascual et al., 1984 ; Rauter et al., 1989 ; Joao et al., 1998 ; Akrouit et al., 2001), ainsi que les propriétés biologiques (Memmi et al., 2007 ; Sefi et al., 2010 ; Akrouit et al., 2011).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes des différents extraits organiques d'*A. campestris*. La majorité des recherches ont étudié les huiles essentielles, alors que certaines d'entre elles ont étudié les extraits organiques et aqueux.

Le présent travail a pour objectif d'extraire les molécules bioactives, avec la détermination de la concentration de certains groupes, comme il vise à tester les activités biologiques des différents extraits organiques surtout l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne.

I- La plante *Artemisia campestris*

I -1-Généralités

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées: c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces (Mucciarelli and Maffei., 2002).

Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquinic, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (Kundan et Anupam., 2010).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mirjalili et al ., 2007).

I -2- Description botanique

Artemisia campestris est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (David, Hervé., 1994 ; Ozenda, 1983 ; Quezel et Santa., 1962).



Fig. 1: Photo d'*Artemisia campestris*.

I -3- Systématique de la plante

Selon Caratini (1971), la plante *Artemisia campestris* est classée dans:

Règne: *Plantae*

Sous règne: *Tracheobionta*

Embranchement: *Spermatophyta*

Sous embranchement: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Sous classe: *Asteridae*

Ordre: *Asterales*

Famille: *Asteraceae*

Sous famille: *Asteroideae*

Tribu: *Anthemideae*

Sous Tribu: *Artemisiinae*

Genre: *Artemisia*

Espèce: *Artemisia campestris* L.

I -4- Origine et distribution

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen, et s'étendent jusqu'à l'Himalaya (Vernin et al., 1995), dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud, d'après Kyeong (2007), *Artemisia campestris* est originaire de l'Asie.

I -5- Composition chimique

L'utilisation des solvants à polarité différente, suivie par des étapes de fractionnements et l'emploi de différentes techniques de chromatographie permettent d'extraire, séparer et identifier les différents composés présents dans les extraits de plantes.

De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (Joao et al., 1998 ; Juteau et al., 2002).

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré (Bruneton, 1999), elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, hauteur, direction du vent, heures de soleil, etc.), et selon la phase de développement de la plante (Jerkovic et al., 2003).

Plusieurs études (Akrouit et al., 2001 ; Juteau et al., 2002) ont rapporté la composition des huiles essentielles d'*Artemisia campestris*, l'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), Juteau et al (2002) ont identifié dans une espèce de Camargue (Marseille, France) 51 composés et caractérisés, les plus abondants sont : γ -terpinène, capillène, 1-phenyl-2,4-pentadiyne, spathulenol, méthyleugenol, p-cymène et β -pinène.

D'après Akrouit et al (2001) les constituants les plus abondants d'une espèce de Tunisie sont : β -pinène (24,2-27,9 %), p-cymène (17.4–22.3%) et α -pinène (4.1–11.0%), ces constituants représentent plus de 45 % de l'huile totale.

Le contenu phénolique total, les flavonoïdes, les dérivés hydroxycinnamiques, les dérivés hydrox benzoïques de l'extrait éthanolique (80%) de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques (Tab. I).

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apégénine), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Tab. II) (Valant et al., 2003).

Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, des saponines. (Naili et al., 2010).

Tab. I: Teneur en polyphénols, de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (Djeridane et al., 2007).

Plante	Phénols totaux ^a	Flavonoïdes ^b	Dérivés hydroxycinnamiques ^c	Dérivés hydroxybenzoïques ^d
<i>Artemisia campestris</i>	103.4	5	95	0

a: mg EAG/g ps, **b :** EQ(m/m), **c :** EAC (m/m), **d :** EAG (m/m).

Tab. II: Principaux flavonoïdes rencontrés chez *Artemisia campestris*

Flavonoïdes	Références
- Flavanone: 5, 8, 4'-trihydroxyflavanone.	- Rauter et al., 1989.
- Acétophénone: 3-acetyl-4-hydroxyacétophénone.	- Hurabielle et al., 1982.
- Flavones: 5, 7-dihydroxy-3, 4'-diméthoxyflavone.	- Ferchichi et al., 2006.
- Flavonol: Kaempférol-7méthyl.	- Valant-V et al., 2003.
- Dihydroflavonol: 7-méthyl aromadendrin.	- Hurabielle et al., 1982.

I -6- L'utilisation traditionnelle d'*Artemisa campestris*

Artemisia campestris est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies:

En usage local *Artemisia campestris* est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles (Dob et *al.*, 2005). Elle est également utilisée dans le traitement de diabète (Sefi et *al.*, 2010).

La partie aérienne est utilisée dans le traitement de brûlures, de la diarrhée, les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme, elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux (Ben Sassi et *al.*, 2007).

Selon Saoudi et *al* (2010) la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des tiges et feuilles d'*A. campestris* permet de réduire les symptômes digestifs.

I -7- Activités biologiques

En plus de leurs utilisations traditionnelles, *Artemisia campestris* possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on cite les plus importantes :

a- Activité antioxydante

La partie aérienne d'*Artemisia campestris* possède des activités antioxydantes significatives. En effet cette plante est riche en composés doués d'activité antioxydante tels que: les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins, ces différents constituants exercent ses actions antioxydantes en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, comme ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (Bruneton, 1999).

Dans une étude faite par Aniya et *al* (2000) l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*Artemisa campestris* a été testée par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-1-1-picrylhydrazyl), les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux possède une activité antioxydante élevée.

De leurs coté Akrouit et *al* (2011) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique 50%) en utilisant trois méthodes différentes: la méthode de DPPH, la technique de décoloration du β -carotène et la méthode d'ABTS (2,2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ils ont trouvé que l'huile d'*Artemisia campestris* possède une faible activité antioxydante, alors que les extraits aqueux et organique montrent une activité antioxydante importante en comparaison à celle de l'huile essentielle.

b-activité antibactérienne

Artemisia campestris est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaire. Naili et al (2010) ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris*, ils ont trouvé que l'activité de cet extrait a été plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que les bactéries gram négatif (*Escherichia coli*).

Ben Sassi et al (2007) ont étudié l'activité antibactérienne de quatre extraits organiques (méthanol, acétate éthyle, acétone, chloroforme) de 23 plantes médicinales dont *Artemisia campestris* contre 14 bactéries gram positif et gram négatif. Les résultats ont montré que l'extrait d'acétone est le seul qui montre une action inhibitrice contre trois types de bactéries: *S. epidermidis*, et *S. saprophiticus*, *S. aureus*.

En outre *Artemisia campestris* possède des propriétés antifongiques, Kyeong et ses collaborateurs (2007) ont étudié l'effet antifongique de l'extrait aqueux des racines d'*Artemisia campestris* sur des champignons de mycorhize, les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux possède un potentiel antifongique.

Les plantes du genre *Artemisia* contiennent un sesquiterpène lactone appelé: Artemisinine, ce composant constitue le métabolite secondaire le plus important chez toutes les espèces *Artemisia*, il est considéré comme une drogue antimalariale très efficace contre le parasite qui cause la malaria: le *Plasmodium falciparum* (Donrop et Day., 2007). L'artemesinine possède également plusieurs activités, il est efficace contre les maladies infectieuses telle que l'hépatite B (Rmoero et al ., 2005).

c- Effets insecticide

Une étude récente a été réalisée par Pavela (2009), où l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été testé pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique *Culex quinquefasciatus*, cet extrait a montré un degré de répulsion très intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria.

d- Propriétés allélopathiques

Les plantes du genre *Artemisia* possèdent des propriétés allélopathiques par inhibition de la croissance et la germination de certaines plantes de l'entourage, Ces propriétés sont dues probablement à la présence d'acide phénolique, et d'autres composants polaires (Kyeong et al., 2007).

e- Activité hypoglycémiante

Sefi et *al* (2010) ont trouvé que l'extrait aqueux des feuilles d'*Artemisia campestris*, diminue le taux de glucose dans le plasma des rats chez lesquels le diabète est induit par l'alloxane monohydrate, ils ont trouvé également que la diminution de la concentration de glucose s'accompagne d'une part d'une diminution des taux de triglycérides et des lipoprotéines de faibles densité (LDL), et d'autre part d'une augmentation du niveau de l'insuline, ce qui peut prévenir les complications du diabète.

f- Effets antipoison

Les extraits d'acétate d'éthyle, éthanol, méthanol et de dichlorométhane, des feuilles d'*Artemisia campestris* ont été testés pour ses capacités de neutralisation de venin de scorpion et de vipère, les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique, inhibe l'activité de dégradation des globules rouges contre le venin du scorpion *Androctonus australis garzonii*, des résultats similaires ont été obtenus pour l'extrait de dichlorométhane pour la neutralisation de venin de la vipère *Macrovipera lebetina* ([Memmi et al., 2007](#)).

II- Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Lutge et *al.*, 2002 ; Abderrazak et Joël., 2007).

II-1-Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (Bruneton, 1999 ; Lugasi et *al.* , 2003).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (Lugasi et *al.* , 2003).

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (King et Young., 1999 ; Tapiero et *al.*, 2002). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (Boizot et Charpentier., 2006).

II-1-1- Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et *al.*, 2006), ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem et *al.*, 2001; Bruneton, 1999).

Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams., 2000).

II-1-1-1- Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne (Skerget et *al.*, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphényl propane à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux

noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Dacosta, 2003).

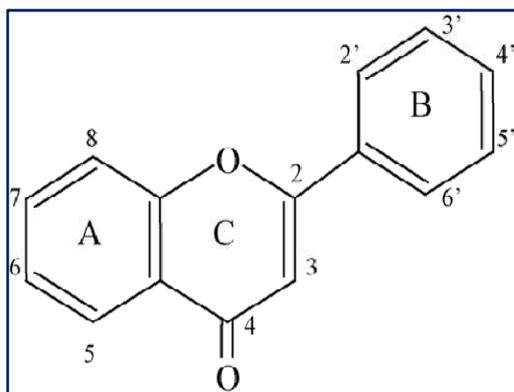


Fig. 2: Structure de base des flavonoïdes (Di Carlo et *al.*, 1999).

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins (Effendi et *al.*, 2008).

II-1-1-2- Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (Medic et *al.*, 2003).

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (Bruneton, 1999).

II-1-1-3- Les principales classes de flavonoïdes

a- Les flavones et les flavanols

Les flavones et les flavanols représentent la majorité des flavonoïdes connus, dans plus de 90% des cas. Chez ces molécules le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. D'autres substitutions peuvent intervenir avec des

fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-6 et/ou en C-8, isoprénylation ou méthylation en C-6 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre.

Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C-4', peut être disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) comme ils peuvent être des méthoxyles (OCH₃). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

Les principales flavones sont l'apéginine et la lutéoline, alors que les principaux flavonols sont la quercétine, kaempférol, et la myricétine (Bruneton, 1999).

b- Les flavanones et les dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Ces flavonoïdes semblent un peu moins fréquents que leurs homologues insaturés rassemblant les flavones et flavonols.

La principale flavanone est la naringénine, alors que la dihydroflavonols la plus rencontré est la catéchine (Bruneton, 1999).

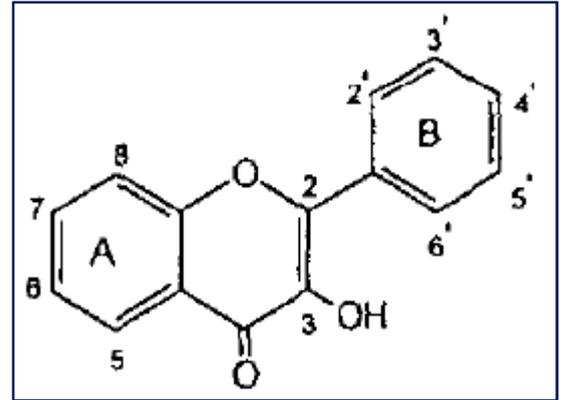
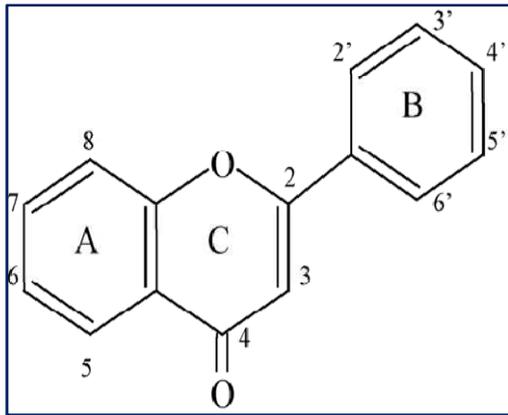


Fig. 3: Structure de base des flavones (Giulia et al., 1999) **Fig. 4:** Structure de base des flavanols

	5	6	7	4'
Apigénine	OH	-	OH	OH
Lutéoline	OH	-	OH	-

	5	7	3'	4'	5'
Quercétine	OH	OH	OH	OH	-
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH

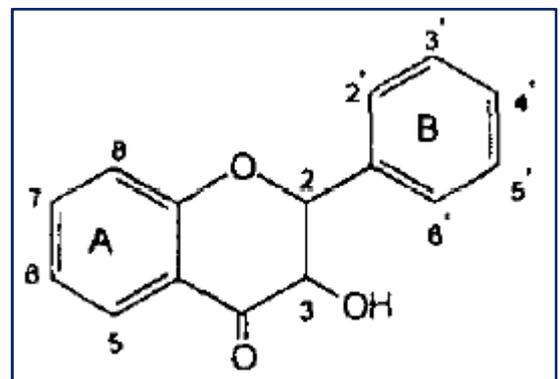
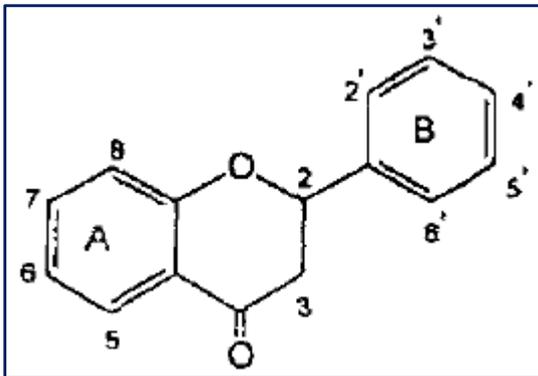


Fig. 5: Structure de base des flavanones

Fig. 6: Structure de base des flavanols

	5	7	4'
Naringénine	OH	OH	OH

	5	7	3'	4'
Catéchine	OH	OH	OH	OH

c- Les chalcones

Les chalcones, dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique, α , β -insaturé. Si les substitutions sur le noyau A sont le plus souvent identiques à celle des autres flavonoïdes, le noyau B est assez fréquemment non substitué. Pour ce type de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes. Les chalcones les plus importants sont: la butéine et la phlorétine (Bruneton, 1999).

d- Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont toujours hydroxylés en position 3, elles se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle à la position 4.

Les anthocyanidines les plus abondants sont: la pélargonidine, la cyanidine et la péonidine (Bruneton, 1999).

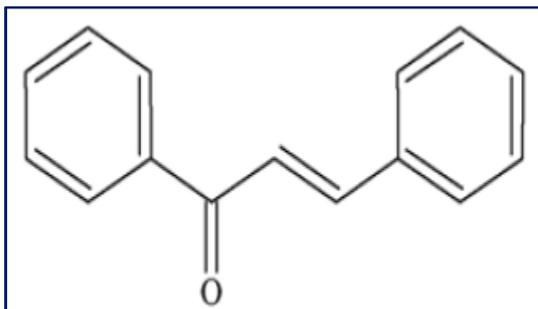


Fig. 7: Structure de base des chalcones (Giulia et al ., 1999)

	3	4	2'	4'	6'
Butéine	OH	OH	OH	OH	H
Phlorétine	H	OH	OH	OH	OH

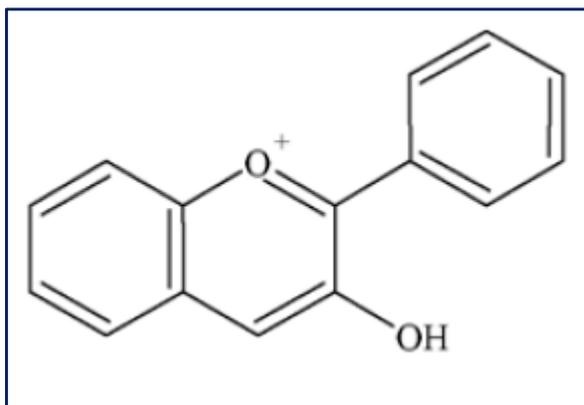


Fig. 8: Structure de base des anthocyanidines (Giulia et al ., 1999)

	3'	5'
Pélargonidine	H	H
Cyanidine	OH	H
Péonidine.	OCH ₃	H

II-1-1-4- Activités biologiques des flavonoïdes

II-1-1-4-1-Activité antioxydante

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. (Fuhrman et *al.*, 1995).

L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001).

À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (FI-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (FL-o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable (Jovanovic et *al.*, 1994).

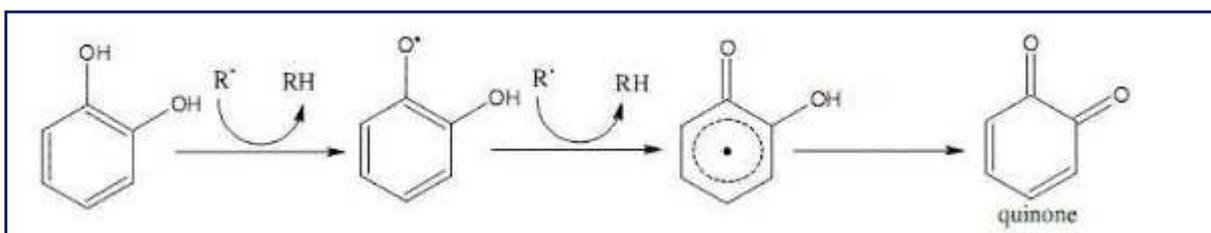


Fig. 9: Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (Marfak, 2003).

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown, 1998 ; Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



II-1-1-4-2- Activité antibactérienne

Il a été rapporté que les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont possédé une activité antimicrobienne (Tim et *al.*, 2005).

Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams., 2000).

De nombreuses études ont rapporté les activités antimicrobiennes des flavonoïdes. (Haraguchi et *al.*, 1998 ; Iinuma et *al.*, 1994 ; Iniesta et *al.*, 1990). De même ces propriétés détectées chez

la propolis, sont attribuées à leur teneur élevée en flavonoïdes, en particulier le galangin et le pinocembrin (Tim et *al.*, 2005).

L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie, une étude faite sur *Dianthus caryophyllus* a montré l'efficacité de flavonoïde glycoside, sur des souches fongiques (Galeotti et *al.*, 2008).

Un nouveau flavanone prénylé isolé à partir de l'arbuste *Eysenhardtia texana*, et un flavane 7-hydroxy-3,4- méthylendioxy flavane isolé à partir des fruits de *Terminalia bellerica*, ces deux flavonoïdes montrent une activité contre le microbe pathogène opportuniste : *Candida albicans* (Wachter et *al.*, 1999 ; Valsaraj et *al.*, 1997).

Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi*, ont été rapportés exhibé une activité contre *Aspergillus flavus* (Zheng et *al.*, 1996). Le Galangin est un flavonol, qui se trouve généralement dans des échantillons de propolis, il a montré une activité inhibitrice contre *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (Afolayan et Meyer., 1997).

Récemment des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Mahmoud et *al.*, 1993).

Le mécanisme d'action de polyphénols est sans doute très complexe, parmi les hypothèses avancées:

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- La séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer,
- L'inhibition du métabolisme microbien (Mila et Scalbert., 1994).

II-1-1-4-3- Effets antiallergiques

Les effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, ces deux dernières sont responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles.

Di Carlo (1999) a étudié les effets antiallergiques de la quercétine, il a trouvé que ce flavonoïde exerce ses effets, en inactivant l'enzyme ATPase Ca²⁺dépendante, de même

l'action de la quercétine est supérieure à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament antihistaminique.

II-1-1-4-5- Autres activités des flavonoïdes

À côté des activités citées précédemment, les flavonoïdes possèdent d'autres activités:

Les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton et Elliott., 1996), ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Mookerjee et *al.*, 1986 ; Namgoong et *al.*, 1994).

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhry, 1983). Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (Ong et Khoo., 2000).

II-1-2- Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (Paris et Hurabielle., 1981).

II-1-2-1-Localisation et distribution

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les Rosacées (Ghesterm et *al.*, 2001). Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (Khanbabae et Ree., 2001).

II-1-2-2-Classification

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 1999).

a-Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques (Paris et Hurabielle., 1981).

a-1-Tanins galliques (Gallo tanins)

Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

a-2- Tanins ellagiques (Ellagitanins)

Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (Paris et Hurabielle., 1981).

b-Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine (Khanbabaea et Ree., 2001).Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (Paris et Hurabielle., 1981).

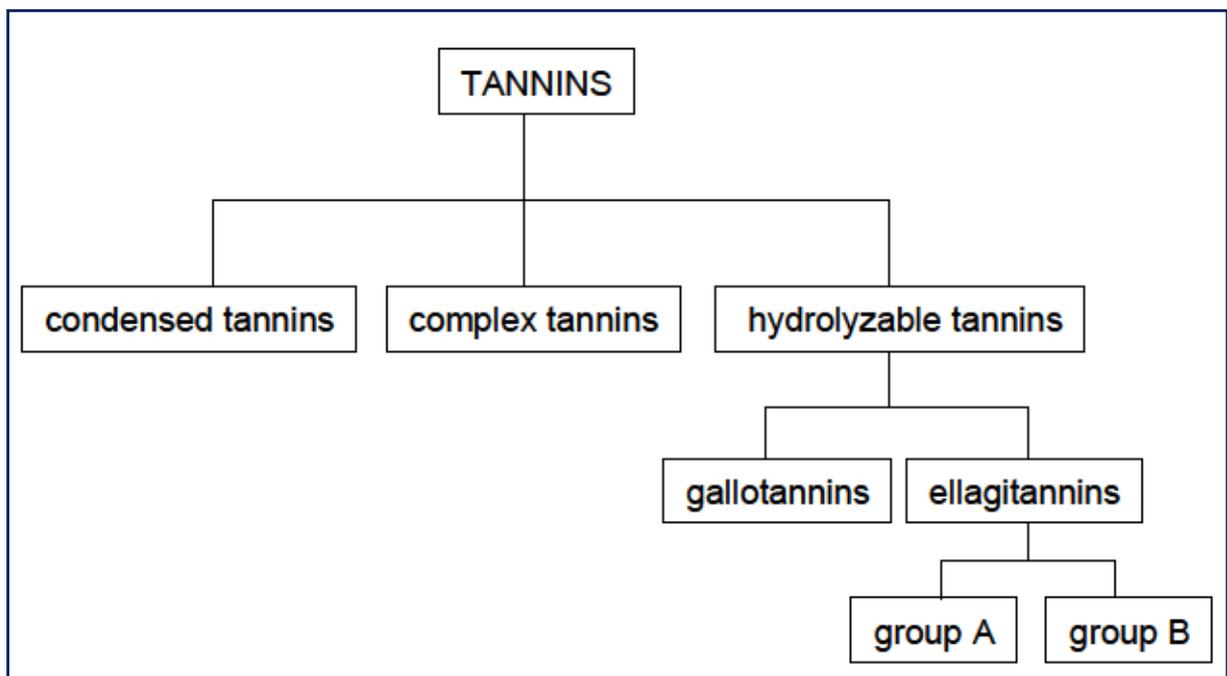


Fig. 10: Classification des tanins (Wilfred et Ralph., 2006).

II-1-2-3- Utilisation des tanins

a)- En pharmacie

Grâce à leurs astringente les tanins sont utilisés comme antidiarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes (Paris et Hurabielle., 1981).

b)- Dans l'industrie

Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et peintures (Paris et Hurabielle., 1981).

III- Le stress oxydatif

III-1- Définition

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd et *al.*, 2003).

III-2- Les radicaux libres

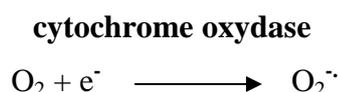
Un radical libre est définies comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (Jacques et André., 2004), cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

III-3- Les espèces réactives de l'oxygène

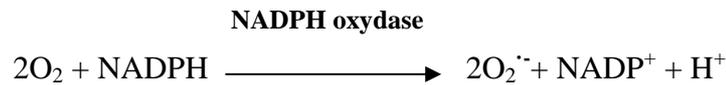
Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Jacques et André., 2004 ; Gutteridge, 1993).

III-3-1- Le radical superoxyde

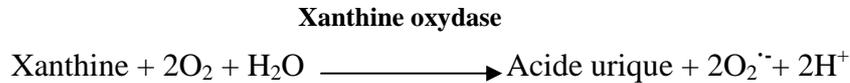
L'origine principale du radical superoxyde est sans conteste la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, ce système permet la production du radical superoxyde par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial:



Le radical superoxyde peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes :



Une autre source possible est la xanthine oxydase. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique.



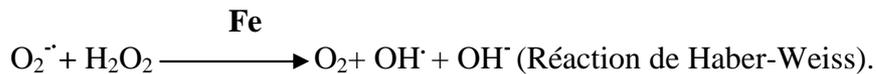
Le radical superoxyde est peu réactif, mais il entre comme agent oxydant dans la majorité des réactions (Marfak, 2003 ; Antwerpen, 2006).

III-3-2- Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est une espèce radicalaire hautement réactive. Il est principalement formé lors de réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont décrites sous le nom de réactions de Fenton:



Le fer peut également catalyser la transformation de l'anion superoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène avec production de radical hydroxyle selon la réaction dite Haber-Weiss. Cette réaction est relativement lente et moins courante que la précédente dans les tissus vivants (Jacques et André., 2004).



III-3-3- Le peroxyde d'hydrogène

Il se forme par une réaction de dismutation du radical superoxyde, catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).



Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante (Jacques et André., 2004).

III-4- Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés

notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003). Les principales cibles radicalaires sont:

III-4-1- L'oxydation de l'ADN

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN protéines (Krippel-Drews et *al.*, 1994). L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, ce qui donne naissance à un grand nombre de bases modifiées.

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés.

Les radicaux libres peuvent aussi attaquer les protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines. comme ils peuvent attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Favier, 2003 ; Rehman et *al.*, 1999).

III-4-2- L'oxydation des protéines

L'action des radicaux libres a lieu sur les chaînes latérales de certains acides aminés comme le thiol des cystéines. A proximité des sites de liaison d'ions métalliques peuvent se dérouler des réactions d'oxydation qui produisent des acides aminés anormaux. Les radicaux libres sont également responsables de la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport) (Jacques et André., 2004).

III-4-3-L'oxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique se déroule en plusieurs étapes:

a- L'initiation

Dans cette étape un acide gras polyinsaturé est attaqué au niveau d'un carbone situé entre deux doubles liaisons par un radical hydroxyle avec arrachement d'un atome d'hydrogène qui laisse un électron non apparié. L'acide gras subira alors une suite de réarrangements des doubles liaisons (Jacques et André., 2004).

b- La stabilisation

Dans l'étape de la stabilisation, il se produit une formation d'un diène conjugué RO_2^* par coordination avec une molécule d'oxygène (Jacques et André., 2004).

c- La propagation

Les alkoxy et peroxy-radicaux propagent l'oxydation par l'intermédiaire de RO_2^* (Jacques et André., 2004).

d- La terminaison

Les hydroperoxydes subissent plusieurs transformations, ils sont soit réduits par la glutathion peroxydase, soit ils l'oxydation continue et dans ce cas ils se fragmentent en aldéhydes toxiques. Cette réaction en chaîne se termine soit par l'intervention d'un composé antioxydant, soit par l'interaction de deux radicaux pour former une molécule stable (Jacques et André., 2004 ; Hennebelle et *al.*, 2004).

III-5- Les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (Favier, 2003).

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule:

III-5-1- Les antioxydants endogènes

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Avissar et *al.*, 1989).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Marfak, 2003).

III-5-1-1- La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD), est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène.

Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (CuZnSOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (MnSOD) (Jacques et André., 2004).



III-5-1-2- La catalase

Le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction de dismutation peut subir une réaction de Fenton. Il ne faut pas donc qu'il s'accumule, c'est le rôle de la catalase, elle transforme deux molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui sont des composés stables (Jacques et André., 2004).



III-5-1-3- La glutathion peroxydase

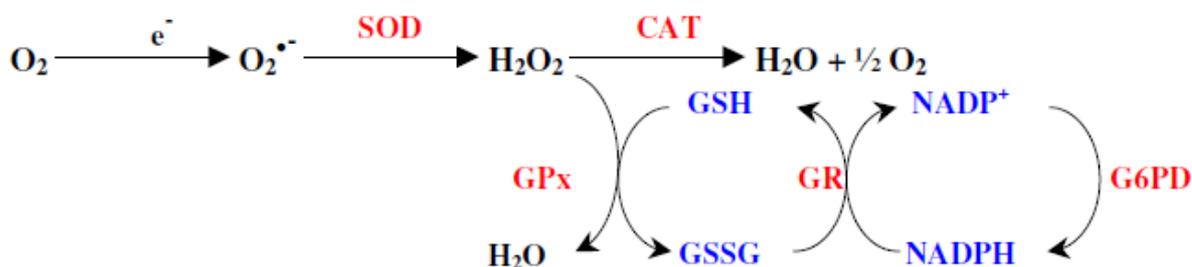
La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (Ganther, 1999).

La glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries, elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants: le glutathion réduit et le sélénium.

En présence de deux molécules de glutathion sous forme réduites, la glutathion peroxydase catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau.

Au fur et à mesure de sa consommation par la glutathion peroxydase, le glutathion doit être régénéré, cela est rendu possible par une glutathion réductase qui consomme une molécule de NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (Jacques et André., 2004).

Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le schéma suivant:



III-5-1-4- Les chélateurs de métaux

Plusieurs protéines qui circulent dans le sérum peuvent prendre en charge des ions métalliques libres qui sont potentiellement toxiques, il s'agit de la transferrine et de la lactoferrine pour le fer et la céruléoplasmine pour le cuivre. Elles agissent comme des chélateurs et maintiennent les ions métalliques sous forme inactive par rapport à la combinaison possible avec le peroxyde d'hydrogène (Jacques et André., 2004).

III-5-2- Les antioxydants exogènes

De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines, nutriments, composés naturels,...etc. sont considérés comme des antioxydants. Notons à titre d'exemples, les plus courants:

III-5-2-1- Les vitamines

a- La vitamine E

La vitamine E ou α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines. Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques RO_2^{\bullet} qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice. Celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde. De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée HO_2^{\bullet}), les radicaux hydroxyles $^{\bullet}OH$, ainsi que l'oxygène singulet 1O_2 .

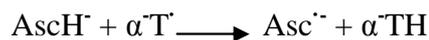
Bien que la concentration d' α -tocophérol soit relativement faible in vivo, le recyclage de ce dernier par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate, lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (Gardès-Albert et *al.*, 2003).



b- La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$. En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. En réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'ascorbate est oxydé en radical ascorbyle ($\text{Asc}\cdot$) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques.

L'ascorbate possède une propriété importante qui est la réparation possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol à partir de leurs formes radicalaires. Il est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (Gardès-Albert et *al.*, 2003).



III-5-2-2- Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

III-6- Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (Atawodi, 2005 ; Georgetti et *al.*, 2003).

IV- Activité antimicrobienne

IV-1- Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique. (Nauciel et Vildé., 2005).

IV-2- Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (Nauciel et Vildé., 2005).

IV-3- Les antibiotiques

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) (Elghozi et Duval., 1992).

* Classification des antibiotiques

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière celle-ci est la plus fréquemment rencontrée.

Les principales familles chimiques des antibiotiques sont: Bêtalactamines: pénicilline et céphalosporines; Aminosides: streptomycine, gentamycine; Chloramphénicol et thiamphénicol; Cyclines: tétracyclines, doxycycline. Macrolides et apparentés : érythromycine, oléandomycine. (Cohen et Jacquot., 2001).

IV-4- Activité antimicrobienne des extraits des plantes

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveau agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sue la santé humaine) (García-Ruiz et *al.*, 2008 ; Kempf et Zeitouni., 2009). Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fennel (*Foeniculum vulgare*), peppermint (*Mentha piperita*), thyme (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mai aussi contre les champignons, les levures et les virus (Jürgen et *al.* , 2009)

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industries pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (Huang et *al.*, 2008).

IV- 5- Description des bactéries étudiées

a- *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif (Patrick et *al.* , 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (Steven et *al.*, 2004).

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines

espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (Patrick et *al.*, 1988).

b- *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm . Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (Patrick et *al.*, 1988).

S. aureus représente est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (Steven et *al.*, 2004).

c- *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 μm de long et 0.5 à 0.8 μm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ».

P. aeruginosa ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3^{ème} rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires (Richard et Kiredjian., 1995).

Matériels et méthodes

I- Matériels et méthodes

I-1- Matériel végétal

La plante d'*Artemisia campestris* a été collectée au mois de novembre 2009 dans la région de Boussaâda (wilaya de Msila).

La partie aérienne de la plante a été séchée à l'ombre pendant quinze jours avant utilisation. L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département d'écologie et de biologie et physiologie végétale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Un échantillon de référence est conservé au niveau du laboratoire.

I-2- Matériel de laboratoire

- ✓ Spectrophotomètre (spectronic20genesys TM).
- ✓ Etuve.
- ✓ Rotavapeur (Büchi).
- ✓ Balance de précision.
- ✓ Agitateur.
- ✓ Autoclave.

***Produits chimiques**

Les sels et les produits chimiques de grade analytique proviennent tous de Sigma, alors que les solvants sont obtenus auprès de Biochem, Fluka.

***Souches microbiennes utilisées**

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC), il s'agit de : *Escherichia coli* (ATCC25922) : *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) en plus d'une souche isolée, *Proteus mirabilis*.

Toutes ces souches sont aimablement fournies par le Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Batna.

I-3- Extraction

I-3-1- Extraction par les solvants

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération successive par trois solvants organiques de polarité croissante; il s'agit du chloroforme, acétate d'éthyle, et de l'éthanol.

La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale à extraire. Dans notre cas 50 g de la plante sont broyés et extraits par 150 ml de chloroforme. L'extraction est effectuée sous agitation continue et à une température ambiante, pendant 4 à 5 heures. Après filtration sur un papier Wattman contenant du sulfate de sodium anhydre $\text{Na}_2(\text{SO}_4)_2$, le matériel végétal est encore extrait par le même solvant et la même façon, les filtrats sont additionnés et concentrés à sec par un évaporateur rotatif de type « Büchi » (Fig. 10).

Le matériel végétal est ensuite soumis à une autre extraction dans les mêmes conditions mais avec d'autres solvants, il s'agit de l'acétate d'éthyle et de l'éthanol.

Cette série d'extraction a permis d'obtenir trois extraits organiques bruts: extrait de chloroforme (Chl), extrait d'acétate d'éthyle (AcEt), extrait d'éthanol (EtOH), qui seront récupérés dans des flacons en verre puis conservés à 4° C jusqu'à utilisation.

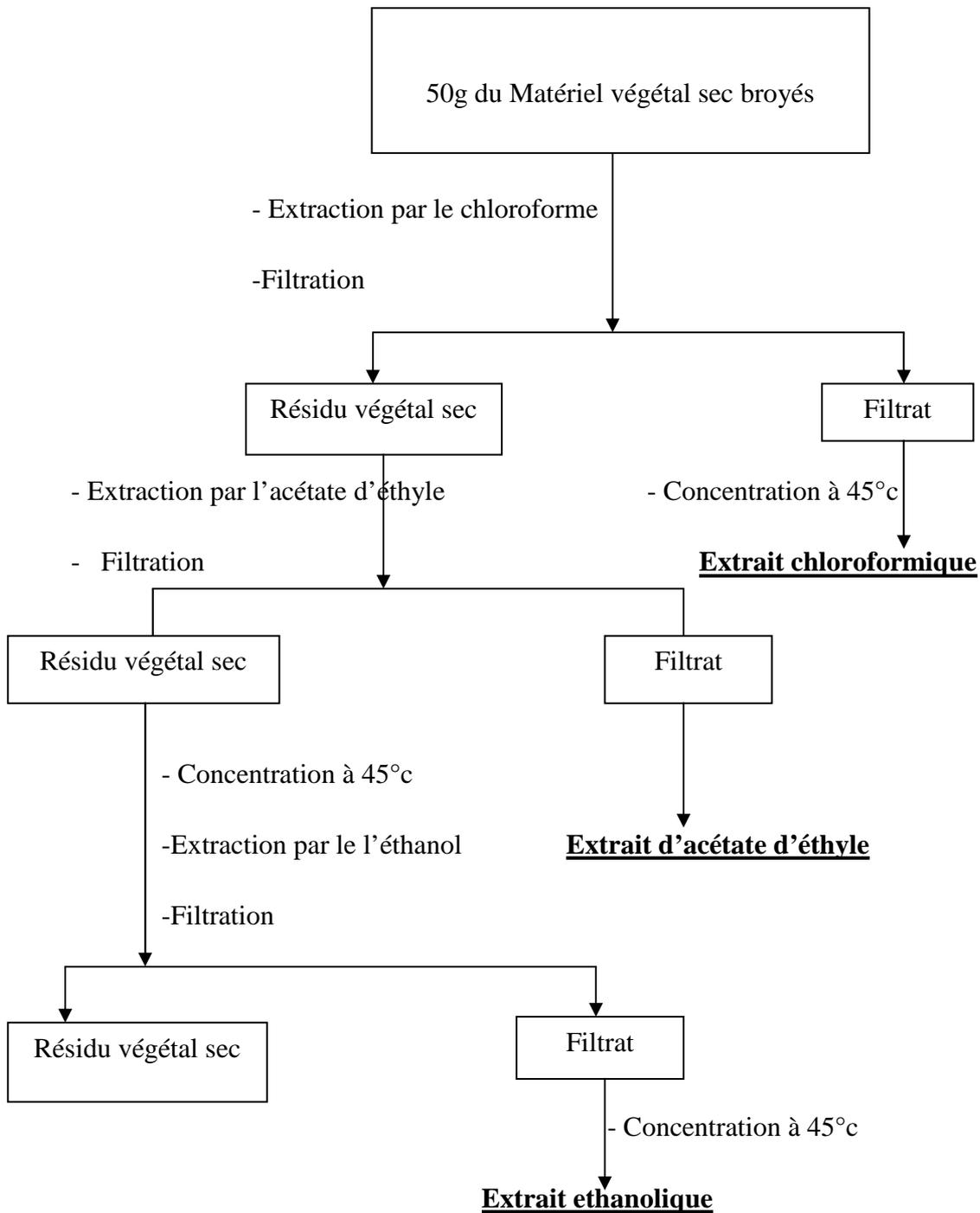


Fig. 11: Extraction par les solvants organiques de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*.

I-3-2- Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

I-4- Analyses quantitatives des extraits

Des déterminations quantitatives des principaux groupes de métabolites secondaires ont été effectuées sur les extraits d'*Artemisia campestris*.

I-4-1-Dosage des polyphénols totaux

a- Principe:

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999): ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et charpentier, 2006).

b-Mode opératoire:

Dans un tube à essai introduire 1,580 ml d'eau distillée, 20 µl d'extrait et 0,1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Agiter vigoureusement puis, une minute après, ajouter 0,3 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 : 7,5 %) et incubé à l'ombre et à la température ambiante pendant 2 heures. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide caféique comme standard, les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide caféique par gramme de poids sec de la plante (mg EAC/g Ps).

I-4-2-Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium AlCl_3 (Kosalec et *al.*, 2004) légèrement modifiée a été adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits d'*Artemisia campestris*.

Mode opératoire:

1 ml de la solution d'extraits (préparés dans l'éthanol) est ajouté à 1 ml d'AlCl₃ à 2% dans le méthanol, le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est lue à 430 nm.

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g Ps).

I-4-3- Dosage des flavonols

La méthode du trichlorure d'aluminium AlCl₃ (Kosalec et *al.*, 2004) avec quelques modifications est utilisée pour quantifier les flavonols dans les différents extraits d'*Artemisia campestris*.

Mode opératoire:

Dans un tube à essai sont introduits: 2,8 ml d'eau distillée, 0,1ml d'AlCl₃, 0,1 ml de CH₃COOK (1 M), 0,5 ml de l'extrait, le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 415 nm.

La quantification des flavonols se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine.

La teneur en flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g Ps).

I-5-Tests des activités biologiques

I-5-1- Test de l'activité antioxydante

a- Mise en évidence de l'activité antioxydante

Principe:

Dans le test du β-carotène l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, et des hydroperoxydes conjugués (Kaur et Kapoor., 2002), ces radicaux vont par la suite oxyder le β-carotène hautement insaturé, ce qui entraîne la perte de ses doubles liaisons, et par conséquent la disparition de sa couleur rouge. Cependant la présence d'un antioxydant (extraits, témoins positif) permet de neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide

linoléique, et donc la prévention de l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Yanishlieva et al., 1995 ; Belhattab, 2007 ; Yang et al., 2008).

Mode opératoire:

On introduit 1.125g d'agar dans un erlenmeyer auquel est ajoutée 150 ml d'eau distillée. Après chauffage sur une plaque chauffante, la solution est refroidie à 50°C avant d'ajouter une émulsion de β -carotène / acide linoléique préalablement préparée par solubilisation de 7.5 mg de β -carotène dans 7.5 ml d'acétone et de 7.5 μ l d'acide linoléique dans 1,5 ml de méthanol. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée à froid, puis distribuée dans des boîtes de pétri. À l'intérieur des puits creusés dans la gélose, 30 μ l d'extrait ou de témoin sont déposés. La lecture se fait après 4-5 heures d'incubation à 45°C.

Le BHT est utilisé comme témoin positif. L'expérience est réalisée en duplicata (Belhattab, 2007).

b- Test de blanchissement du β -carotène

Principe:

L'activité antioxydante de trois extraits d'*Artemisia campestris* est mesurée selon la méthode de Tepe et al (2005). L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

Mode opératoire:

La méthode décrite par Tepe et al (2005) a été employée avec une légère modification. Une émulsion β -carotène / acide linoléique préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, a été additionnée de 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après évaporation complète du chloroforme au rotavapeur, 100 ml d'eau saturée en oxygène sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

Dans des tubes à essai 2,5 ml du mélange précédant sont additionnés de 350 μ l d'extrait puis incubés à l'obscurité à la température du laboratoire.

Deux tubes contrôles ont été aussi préparés avec la même procédure: l'un contenant un antioxydant de référence BHT (témoin positif) et l'autre sans antioxydant (témoin négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 µl de méthanol.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures.

L'activité antioxydante des extraits (AA %) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AA \%} = \text{Abs}_{48\text{h}} [(\text{échantillon}) / \text{Abs}_{48\text{h}} (\text{BHT})] \times 100$$

c- Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH

Principe:

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où: (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Brand-William et *al.*, 1995).

Mode opératoire:

1ml de solution méthanolique de DPPH (8%) est ajouté à 1ml de la solution d'extraits, le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes.

Le blanc est représenté par le méthanol, Le témoin négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol, Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard: le BHA.

La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 515 nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité antiradicalaire} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

Les résultats sont la moyenne de deux mesures séparées \pm écart type.

La CI₅₀ a été déterminée pour chaque extrait, elle est définie comme étant la concentration qui donne la diminution de la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 48 heures d'incubation (Wan et *al.*, 1998 ; Canillac et Mourey, 2001).

I-5-2-Test de l'activité antimicrobienne

Les souches utilisées pour déceler l'activité antibactérienne des extraits d'*Artemisia campestris* font partie de quatre genres de microorganismes, dont trois sont des souches référentielles de l'American Type Culture Collection (ATCC), il s'agit de: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), la quatrième souche, *Proteus mirabilis*, est une souche clinique isolée de patients hospitalisés (au centre hospitalier universitaire de Batna (CHU)).

a- Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

b- Les milieux de culture

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants:

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits d'*Artemisia campestris*.

c- Préparation de précultures

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.5 McFarland et été préparées, pour chaque microorganisme, dans 5 ml d'eau distillée stérile.

d- Tests antimicrobiens

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de la plante, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme), celle-ci permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait.

Application:

Des disques de papier filtres stériles Whatmann de 6 millimètres de diamètre sont imprégnés de différentes solutions des extraits préalablement dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

À l'aide d'une pince stérile les disques sont déposés à la surface d'un milieuensemencé (étalé) par une suspension microbienne d'une densité optique de 0.5 McFarland. Après diffusion, les boites sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C. Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi et *al.*, 2006).

Les tests ont été répétés deux fois, des disques imprégnés de DMSO et d'éthanol sont aussi utilisés (témoins négatifs). Toutes les déterminations sont faites en duplicata.

I-6-Expressions des résultats

Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD).

Résultats

II- Résultats

Artemisia campestris est une plante médicinale de la famille des Astéracées (composés), elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter les troubles digestives, la diarrhée, le rhumatisme,...etc.

De nombreuses études phytochimiques de cette espèce (De Pascual et al., 1984 ; Rauter et al., 1989 ; Joao et al., 1998 ; Akrouf et al., 2001), ont révélé la présence de polyphénols, flavonoïdes, tanins, les huiles essentielles; ce qui confère à cette plante de nombreuses propriétés biologiques (Akrouf et al., 2011).

II-1- Extraction

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été effectuée par des solvants à polarité croissante il s'agit de chloroforme, acétate d'éthyle et l'éthanol.

Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts: L'extrait chloroformique (Chl), l'extrait d'acétate d'éthyle (AcEt), l'extrait d'éthanol (EtOH).

Exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante fraîche, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait de chloroforme (3.4 % m/m), suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (2.26 % m/m), et enfin l'extrait éthanolique possède le plus faible rendement avec (0.48 % m/m). Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents (Tab. III).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et al., 2003).

Tab. III: Aspect, couleur et rendement de différents extraits d'*Artemisia campestris*

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
Chl	Pâteux	Brune	3,4%
AcEt	Pâteux	Verte	2,26%
EtOH	Pâte collante	Verte foncée	0.48 %

II-2- Résultats de l'étude quantitative

II-2-1- Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide caféique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

$$Y = 0,001x - 0,008 \quad R^2 = 0,993$$

La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide caféique par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EAC/mg Ps).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des polyphénols totaux est : 178- 91–102 mg EAC/g Ps, pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol respectivement.

II-2-2- Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), la quercétine a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

$$Y = 0,031x + 0,100 \quad R^2 = 0,995$$

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercétine par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EQ/mg Ps).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonoïdes est : 16.88 - 19.47 –21.33 mg EQ/g Ps, pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol respectivement.

II-2-3- Dosage des flavonols

Le dosage des flavonols a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et l'étalon été la quercétine, l'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 415 nm.

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

$$Y = 0,008x - 0,016 \quad R^2 = 0,998$$

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonols est : 31.13- 36.86 - 12.70 mg EQ/g Ps, pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol respectivement.

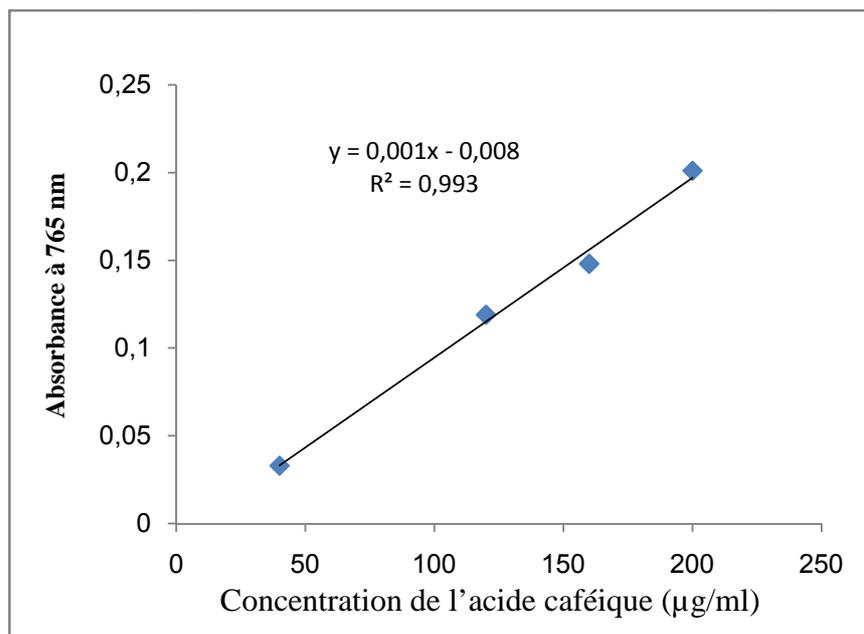


Fig. 12: Droite d'étalonnage des polyphénols totaux des extraits.

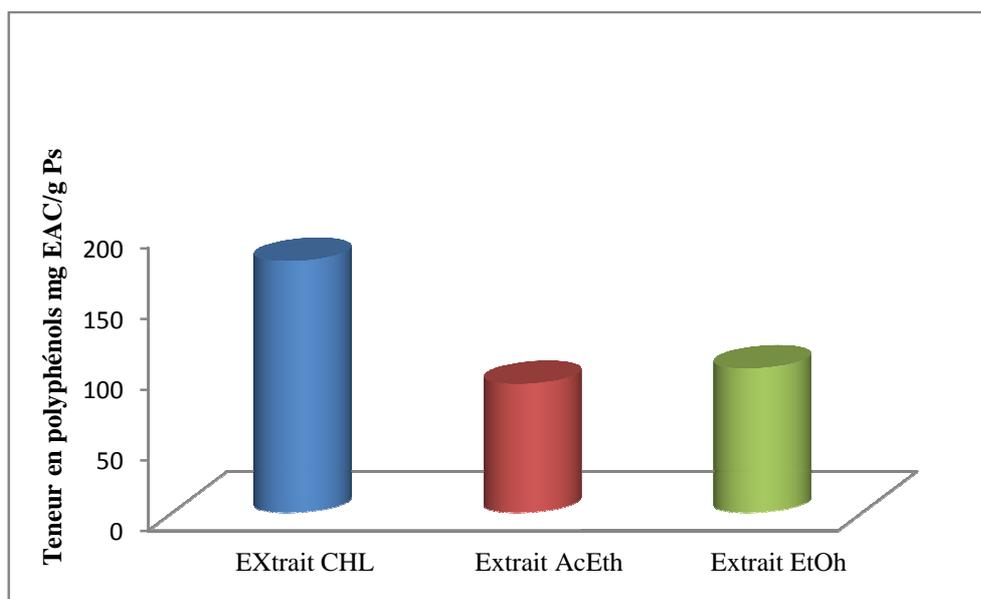


Fig. 13 : Evaluation des polyphénols totaux des extraits.

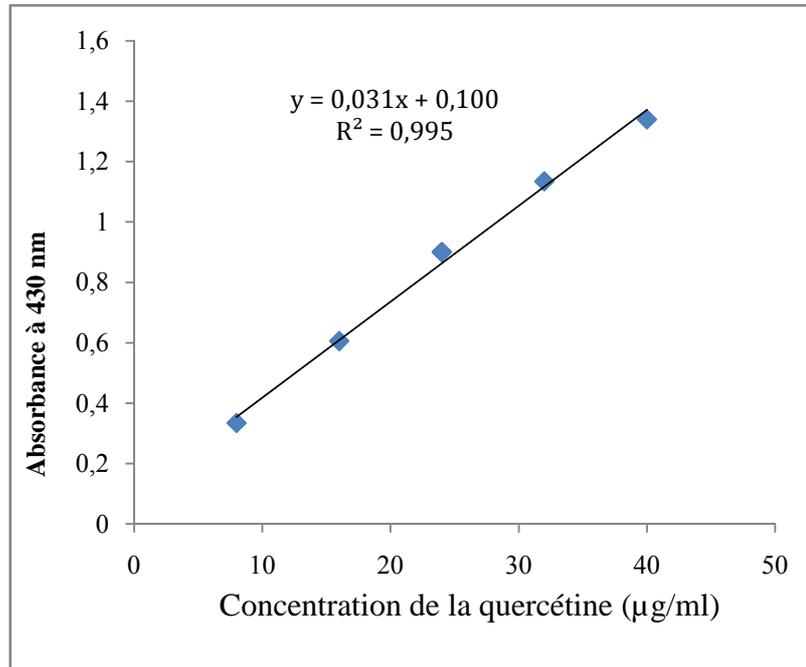


Fig. 14: Droite d'étalonnage des flavonoïdes des extraits.

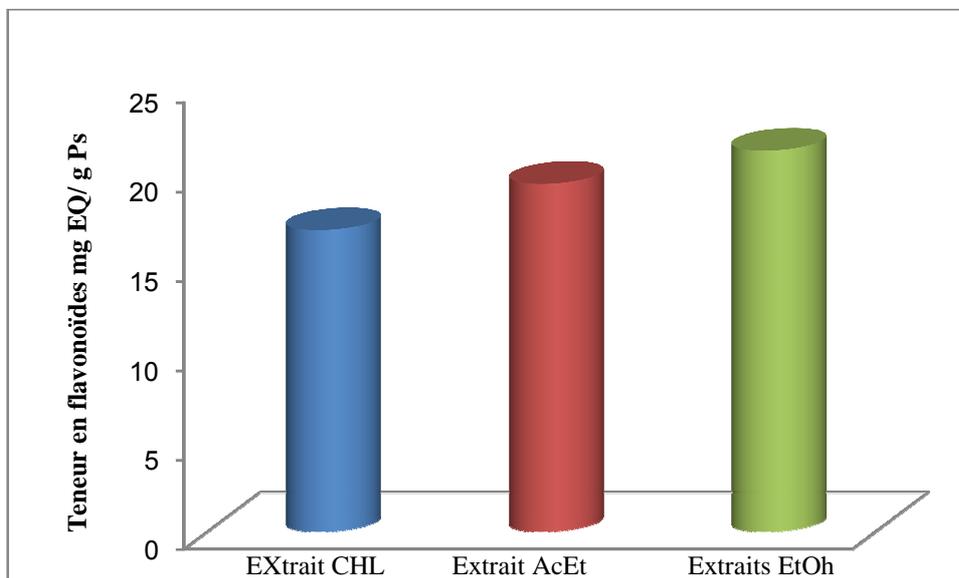


Fig. 15 : Evaluation des flavonoïdes des extraits.

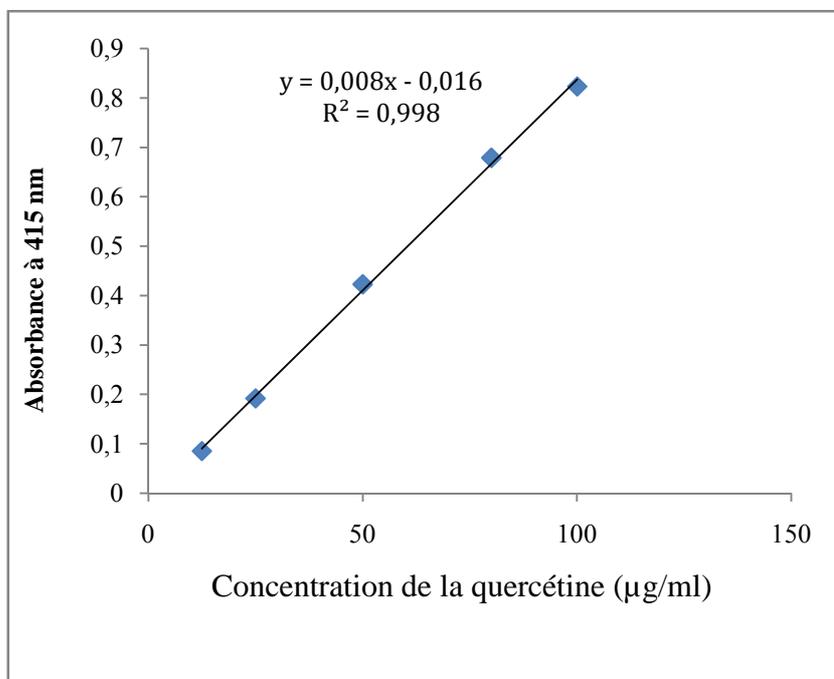


Fig. 16: Droite d'étalonnage des flavonols des extraits.

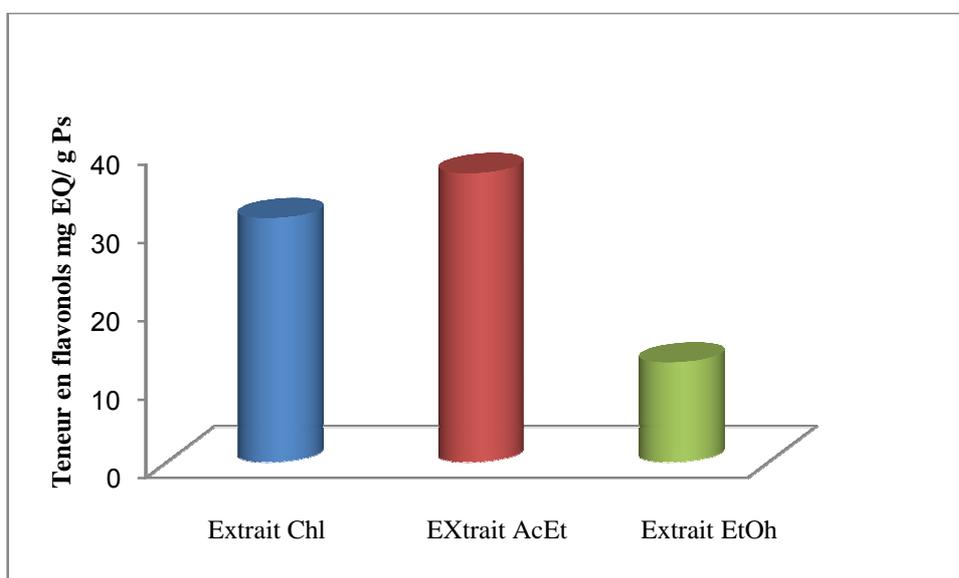


Fig. 17: Evaluation des flavonols des extraits.

II-3- Résultats des tests biologiques

II-3-1- Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée in vitro par deux méthodes différentes : la technique de décoloration du β -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH.

a- Test visuel de décoloration du β -carotène

Après un temps d'incubation en présence des extraits d'*Artemisia campestris*, et du témoin positif BHT, un halo de couleur orange persiste autour des puits (Fig. 18), alors que la surface de la gélose perd sa couleur orange suite à l'oxydation du β -carotène. Le diamètre et l'intensité de la couleur des disques reflètent le pouvoir antioxydant (Tab. IV).

Bien que tous les extraits aient donné des halos de couleur orange nettement visibles, il convient de mentionner que l'extrait chloroformique exhibe les moins intenses pour toutes les concentrations testées par rapport aux autres extraits. Le BHT a donné lieu à des halos relativement meilleurs que ceux des extraits (Fig. 19).



Fig. 18.1: Extrait d'acétate d'éthyle



Fig. 18.2: Extrait de chloroforme

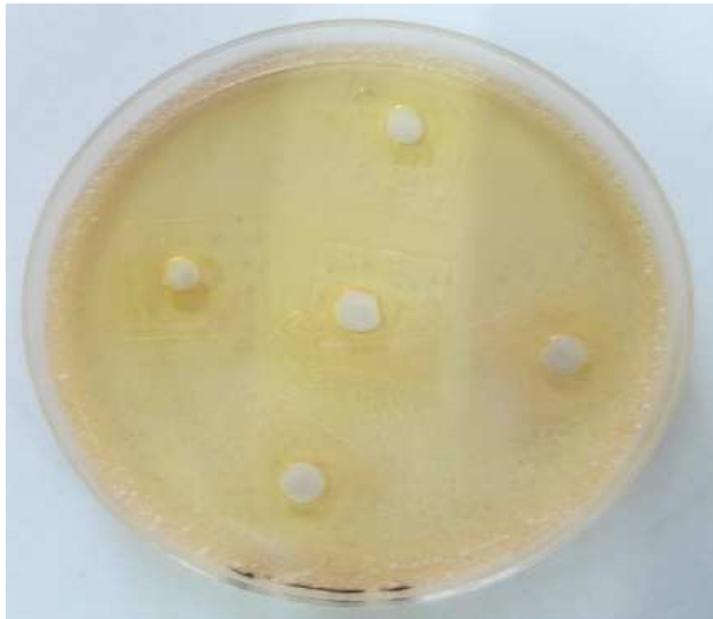


Fig. 18.3: Extrait d'éthanol

Fig. 18: Diamètre des halos oranges en présence de différentes concentrations d'extraits

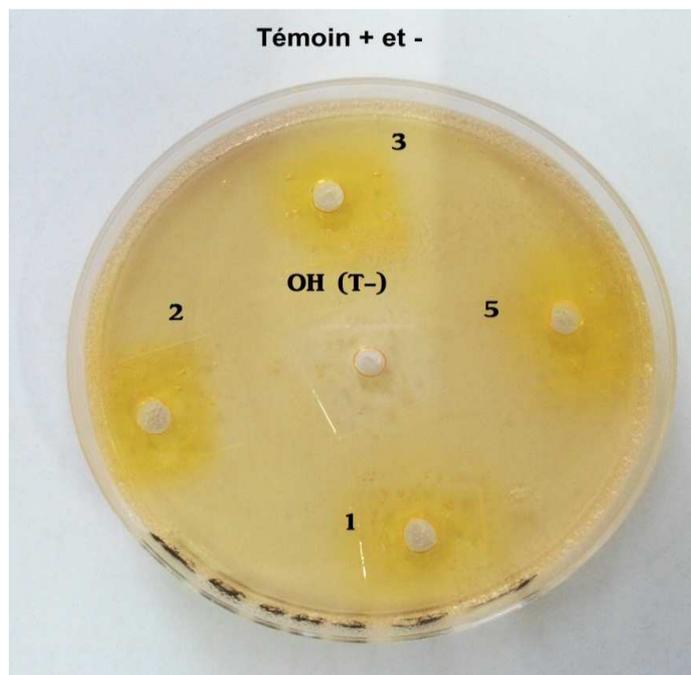


Fig. 19: Diamètre des halos oranges en présence des témoins positifs (BHT et Quercétine) et témoin négatif (méthanol).

Tab. IV : Intensité de la couleur des halos autour des puits.

Extrait	potentiel antioxydant
Chl	+
AcEt	++
EtOh	++

+ : Activité faible. ++ : Activité forte.

b- Méthode de blanchissement du β -carotène (BCB)

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits, nous avons utilisé la méthode de blanchissement du β -carotène. Un suivi de la réaction de l'oxydation du β -carotène en présence des extraits et ou des témoins (négatif et positif), a été effectué en mesurant l'intensité de la couleur de β -carotène à une longueur d'onde de 470 nm, permet de tracer une courbe (Fig. 9). À partir de cette dernière on a remarqué que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse, mais cette diminution reste moins rapide par rapport à celle de la solution témoin (-), et devient sable dans un temps prolongé pour les extraits d'acétate et d'éthanol, et dans un temps assez prolongé pour l'extrait de chloroforme, ainsi la couleur de la solution change de l'orange au blanc.

Le tableau ci-dessous (Tab. VIII) rapporte les valeurs moyennes de trois mesures d'AA % (coefficient d'activité antioxydante) \pm SD calculés à partir de la formule :

$$\% \text{ Activité antioxydante} = (\text{Abs contrôle}_{48\text{h}} - \text{Abs échantillon}_{48\text{h}} / \text{Abs contrôle}_{48\text{h}}) \times 100.$$

Ces valeurs facilitent des comparaisons de l'activité relatives des différents extraits, du témoin positif (BHT) et du témoin négatif.

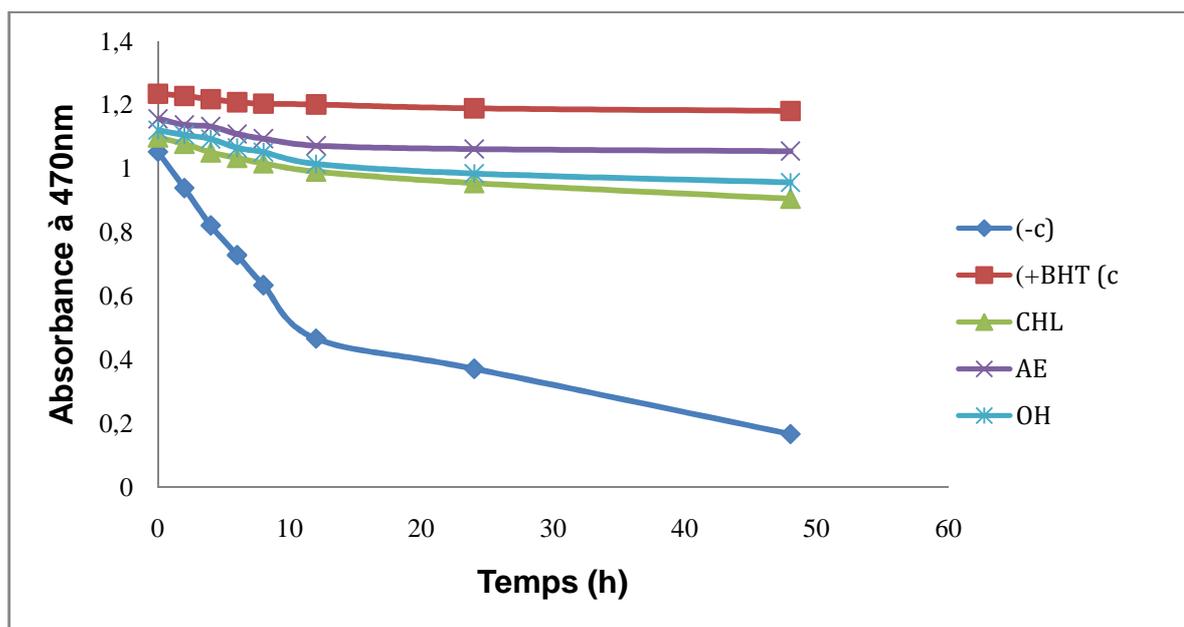


Fig. 20: Cinétique de l'inhibition de blanchissement du β -carotène par extraits d'*Artemisia campestris* et du témoin positif BHT.

Tab. V: L'activité antioxydante des extraits bruts et du témoin positif et négatif.

Extraits et control	AcEt	Chl	EtOH	Témoin+	Témoin -
AA %	89,32% \pm	76,68% \pm	80,97% \pm	99,94% \pm	14,17% \pm

c- Méthode de réduction du radical libre DPPH

Les activités antiradicalaires des extraits d'*Artemisia campestris* et du témoin positif BHA ont été déterminées par la méthode au DPPH. Les résultats obtenus sont représentés sous forme de droites (Fig. 17) dont les équations sont les suivantes:

$$\text{Extrait chloroformique : } Y = 0,482x - 0,981 \quad R^2 = 0,989$$

$$\text{Extrait d'acétate d'éthyle : } Y = 0,523x - 2,408 \quad R^2 = 0,968$$

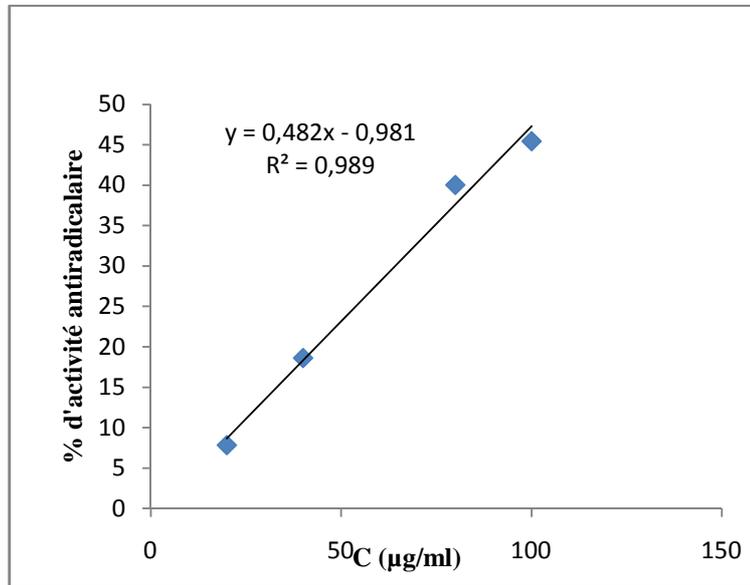
$$\text{Extrait d'éthanol : } Y = 0,748x - 0,942 \quad R^2 = 0,998$$

$$\text{BHA : } Y = 0,493x + 24,77 \quad R^2 = 0,935$$

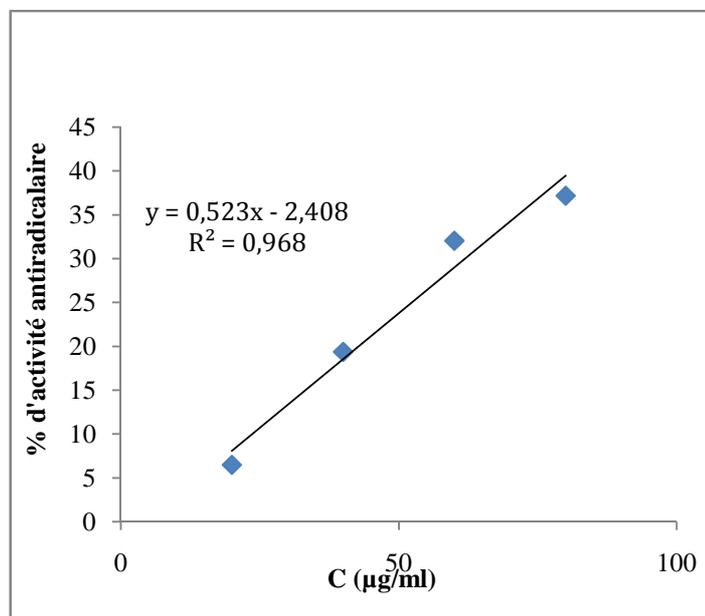
L'activité anti radicalaire de nos extraits est exprimée en CI_{50} . Pour chaque extrait la CI_{50} est déduite de la droite d'étalonnage correspondante.

Comme figurant dans le tableau ci-dessus l'antioxydant standard BHA a montré une activité antioxydante puissante avec une CI_{50} de l'ordre de 51.17 μ g/ml.

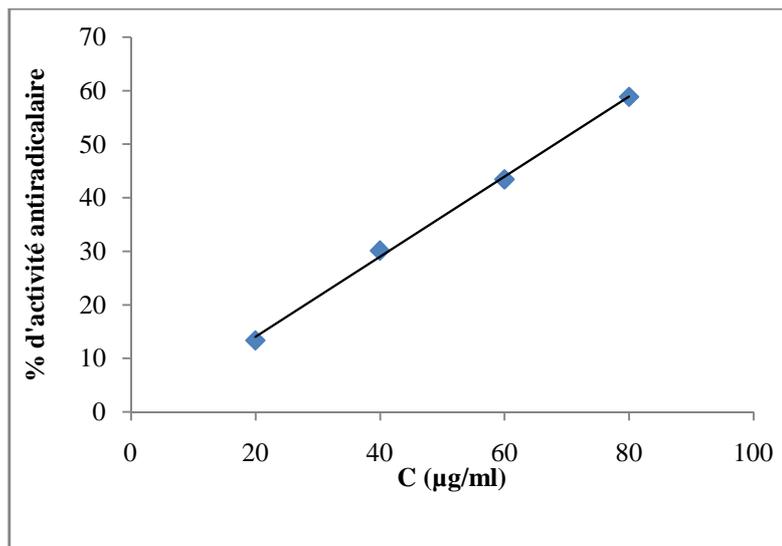
Parmi les trois extraits d'*Artemisia campestris*, l'extrait éthanolique représente l'extrait le plus actif avec une CI_{50} de l'ordre de 68.10 μ g/ml, par contre les deux autres extraits montrent une très faible activité anti-radicalaire avec 100.20 et 105.76 μ g/ml pour les extraits de l'acétate d'éthyle et le chloroforme respectivement. L'activité de l'extrait éthanolique est inférieure à celle du BHA (57.41 μ g/ml.) (Tab. VI).



(1)



(2)



(3)

Fig. 21: Activité antioxydante des extraits d'*Artemisia campestris*

(1): l'extrait chloroformique, (2): l'extrait de l'acétate d'éthyle, (3): l'extrait de l'éthanol.

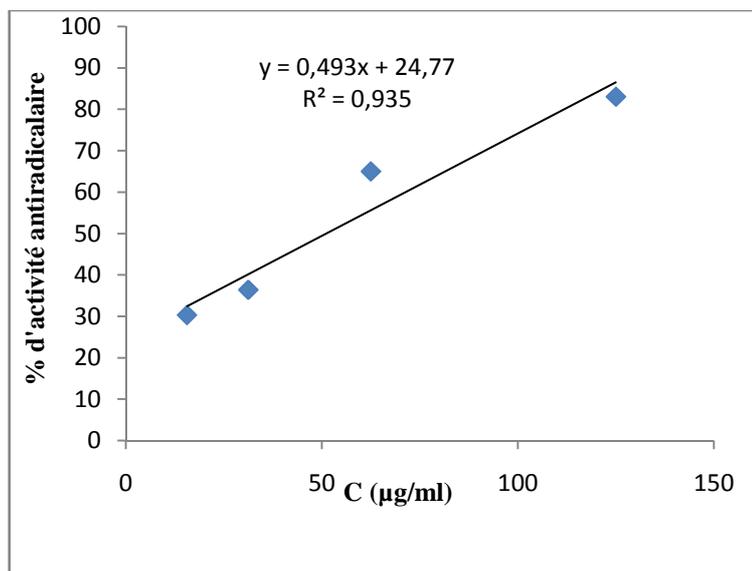


Fig. 22: Activité antioxydante du standard BHA.

Tab. VI: Valeurs des CI_{50} des extraits bruts et témoin déterminées par le test au DPPH.

Extraits	BHA	Chl	AcEt	EtOH
CI_{50} (µg/ml)	51.17	105.76	100.20	68.10

II-3-2- Activité antimicrobienne

a- Sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques, le tableau ci-dessous rapporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions manifestées par les antibiotiques sur les différentes souches étudiées.

Tab. VII: Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

Souches ATB	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Céfépime (FEP)	-	16,975±0,318	-
Amoxicilline (AMX)	-	24,775±1,237	-
Ticarcilline (ITC)	-	23,75±0,353	-
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	-	24,15±0,07	-
Oxacilline (OX)	0	-	-
Kanamycine (K)	14,625±0,035	-	-
Fosfomycine (FOS)	24,875±0,176	-	-
Gentamycine (CN)	10,775±0,035	-	-
Tetracycline (TE)	11,35±0,353	-	-
Pénicilline (P)	24,475±0,247	-	-
Pipéracilline (PIP)	-	-	23,7±2,474
Imipénème (IPM)	-	-	27,625±0,247
Ticacilline (TIC)	-	-	29,65±0,424
Pipéracilline + Tazobactam	-	-	27,7±0,141
Aztreonam (ATM)	-	-	30,845±0,7
Cefsulodine (CFS)	-	-	30,725±0,035

16 antibiotiques standards sont testés sur 3 souches bactériennes gram (+) et gram (-), on observe que les différents types de souches réagissent différemment aux antibiotiques étudiés.

À l'exception de l'oxacilline, la souche *S. aureus* a manifesté une sensibilité vis-à-vis tous les antibiotiques, sauf cet effet est plus faible pour les antibiotiques: K- TE- CN.

De même pour *E. coli*, l'antibiotique FEP possède un effet faible. Quand *P. aeruginosa* elle est sensible aux antibiotiques utilisés (Tab. VII).

La méthode de disque a permis de déterminer l'action des extraits de la plante dissouts dans le DMSO sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

Tous les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées ce qui confirme que la plante d'*Artemisia campestris* est douée de propriétés antimicrobiennes.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* se révèle la plus résistante pour tous les extraits. La souche de *Staphylococcus aureus* est plus résistante que les souches d'*E. Coli* et *Proteus mirabilis*.

La CMI a été déterminée pour les différentes souches microbiennes (Tab.VII): la souche de *P. aeruginosa* ne montre aucune sensibilité pour tous les extraits, La souche d'*E. Coli* a été la plus sensible aux extraits de la plante avec une CMI de 0.5 mg/ml, tandis que les deux autres souches *S. aureus* et *P. mirabilis* semblent plus résistantes que la souche d'*E. Coli* avec des CMI de 1.8 mg/ml et 0.75, pour l'extrait de chloroforme et 1.8 mg/ml et 1.5 mg/ml pour l'extrait d'acétate d'éthyle respectivement.

Tab. VIII: Activité antibactérienne des extraits d'*A. campestris* exprimée en concentration minimale inhibitrice (mg/ml).

Extrait Souche	CHL	AE	OH
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.8	1.8	1.8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	/	/	/
<i>E.coli</i> ATCC25922	0.5	0.5	0.5
<i>P. mirabilis</i> <i>Ssp</i>	0.75	1.5	/

Discussion

III-Discussion

III-1- Analyses quantitatives des extraits

L'étude quantitative des extraits bruts d'*Artemisia campestris*, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des flavonols.

La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribués.

Les polyphénols sont estimés par plusieurs méthodes, comme la méthode de bleu de Prusse (Graham, 1992), mais la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Boizot et Charpentier., 2006).

En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleue, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à longueur d'onde de 765 nm (Huang et al., 2005).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que l'extrait de chloroforme représente l'extrait le plus riche avec: 178 mg EAC/g d'extrait, suivi de l'extrait éthanolique 102 mg EAC/g d'extrait. L'extrait d'acétate d'éthyle avec 91 mg EAC/g d'extrait représente la fraction qui contient la plus faible teneur en polyphénols.

Dans une étude faite sur onze plantes médicinales dont *Artemisia campestris*, Djeridane et al., (2006) ont déterminé la teneur en polyphénols totaux de la partie aérienne d'un extrait éthanolique 70% (v/v), ils ont trouvé que la teneur des polyphénols totaux est de 20.38 mg EAG/g Ps, cette teneur est relativement élevée.

Dans une autre étude, Djeridane et al., (2007) ont dosé les polyphénols totaux dans un extrait éthanolique (80%), la teneur trouvée était 103.4 mg EAG/g Ps, ce résultat est relativement très élevé, il est 5 fois supérieur à celui trouvé dans l'étude précédente. Cette teneur peut atteindre plus de 450 mg EAG/g d'extrait quand l'extraction est réalisée avec une solution alcoolique à 50 % (Akrouf et al., 2011).

Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques et période de collecte ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions expérimentales.

La détermination quantitative des flavonoïdes s'effectue par la méthode de trichlorure d'aluminium, celle-ci est la plus employée, elle se base sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 430 nm. La quercétine est utilisée comme standard, les résultats du dosage des flavonoïdes sont: 16.88 - 19.47- 21.33 mg EQ/g d'extrait dans les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol respectivement.

Djeridane et *al.*, (2006) et (2007), ont déterminé la concentration des flavonoïdes dans deux extraits éthanoliques 70 % et 80 % (v/v). Cette teneur a été estimée à 7.46 et 5 mg ER/g Ps dans les deux extraits respectivement. Cependant, Akrouit et *al* (2011) ont estimé cette valeur à 56,31 mg ER/g d'extrait quand l'extraction est réalisée avec une solution alcoolique à 50 %.

Alors que Saoudi et *al.*, (2010) ont trouvé une teneur de 131,89 mg EQ/g d'extrait de feuilles aqueux.

La teneur en polyphénols totaux des extraits d'*A. campestris* sont relativement identiques à ceux trouvés par d'autres auteurs sur des plantes de la même espèce obtenus d'autres sites (Algérie et Tunisie). Alors que la teneur en flavonoïdes de l'espèce étudiée semble légèrement inférieure à celles trouvées par d'autres auteurs pour la même espèce (Saoudi et *al.*, 2010 ; Akrouit et *al.*, 2011), toutefois la teneur en flavonols, à notre connaissance, n'a pas encore fait l'objet de déterminations sur cette espèce.

III-2-Activité antioxydante

III-2-1- Test visuel du β -carotène

La présence ou l'absence de l'activité antioxydante d'un extrait peut être mise en évidence par un test simple et relativement rapide. Le potentiel antioxydant est estimé par la taille et l'intensité de la couleur orange qui persistent autour des puits contenant l'extrait de la plante. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en substances antioxydantes des extraits déposés. En effet, en absence de substances antioxydantes la gélose de couleur orange due au β -carotène blanchit.

Les extraits d'éthanol et d'acétate d'éthyle ont manifesté des activités relativement élevées par rapport à celle manifestée par l'extrait de chloroforme, mais qui restent inférieures à celle du BHT.

III-2-2- Méthode de blanchissement du β -carotène

L'aptitude des extraits bruts d'*A. campestris* à inhiber la peroxydation des lipides a été évaluée par la technique de décoloration du β -carotène. En effet, toute substance chimique qui retarde

ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être considérée comme antioxydant (Liyana-Pathirana et *al.*, 2006).

Pour se renseigner sur la puissance de nos extraits à ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides, nous avons réalisé un suivi de la réaction de l'oxydation de l'acide linoléique par mesure de l'abaissement de l'absorbance dans le temps.

Les résultats obtenus montrent que le BHT et les extraits testés inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. En effet, l'extrait d'acétate d'éthyle montre la plus grande activité inhibitrice (89,32 %), il est suivi par l'extrait d'éthanol (80,97%), mais cette activité reste significativement inférieure à celle du BHT (99,94 %) qui est utilisé comme témoin positif. Une activité intermédiaire est obtenue avec l'extrait chloroformique (76,68 %).

Akrouit et *al.*, (2011) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits: huile essentielle, éthanol (50%), et extrait aqueux des plantes d'*A. campestris* et *Thymelaea hirsuta* par plusieurs méthodes dont celle de décoloration du β -carotène. Ils ont trouvé pour l'extrait éthanolique de la plante *A. campestris* une valeur de 34 %, celle-ci est relativement faible, elle est deux fois plus inférieure à celle trouvée pour notre extrait. Cependant, cette activité a été élevée pour l'extrait aqueux (88.7 %). De même leur témoin positif BHT a montré une valeur égale à celle de notre extrait acétate d'éthyle, donc inférieure à la valeur que nous avons trouvée (99,94 %).

En comparant les résultats des deux plantes, les extraits de notre plante possèdent une activité antioxydante supérieure à celle étudiée par Akrouit et *al.*, (2011), ceci s'explique par le fait que nos extraits contiennent des quantités supérieures en composés antioxydants.

Dans une étude réalisée sur l'extrait aqueux de la partie aérienne de 11 plantes médicinales algériennes dont *Artemisia campestris*, Djeridane et *al* (2006-2007) ont évalué l'activité antioxydante par la méthode de l'ABTS⁺, ils ont trouvé la valeur de 25 mmol TEAC/g Ps (teneur en polyphénols totaux de 20,38 mg EAG/ g Ps, teneur en flavonoïdes de 7,47 mg ER/g Ps) , et la valeur de 0.573 mmol TEAC/g Ps(teneur en polyphénols totaux 103,4mg EAG/ g Ps, teneur en flavonoïdes de 5,47 mg ER/g Ps) pour les plantes collectées dans la région de Laghouat au cours des années 2002, 2007 respectivement. De ces résultats il ressort d'une part que l'activité antioxydante est inversement proportionnelle à la teneur en polyphénols, et d'autre part elle est proportionnelle à la teneur en flavonoïdes. Ce qui explique à l'opposé des flavonoïdes, toutes les molécules de polyphénols ne participent pas à cette activité.

III-2-3- Méthode de réduction du radical libre DPPH

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al., 2008).

Parmi les trois extraits d'*Artemisia campestris*, l'extrait éthanolique représente l'extrait le plus actif avec une CI_{50} de l'ordre de 68.10 $\mu\text{g/ml}$, par contre la capacité antiradicalaire des autres extraits est plus faible (Tab. IX). Pour les trois extraits la capacité antioxydante estimée par le test au DPPH est relativement faible, alors que dans le test de blanchissement de β - carotène ces extraits montrent une activité antioxydante modérée.

Akrout et al., (2011) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits d'*Artemisia campestris*, ils ont trouvé une valeur de CI_{50} de 2.053 mg / ml pour l'extrait de l'éthanol 50% , cette valeur est relativement très faible si elle est comparée à celle de notre extrait éthanolique (68.10 $\mu\text{g/ml}$)

Lopes-Lutz et al., (2008) ont confirmé dans une étude faite sur quelques espèces d'*Artemisia* que l'activité antioxydante de ces plantes est faible.

Kang et al., (2003) ont suggéré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité antiradicalaire élevée.

III-3- L'activité antimicrobienne

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 48 heures d'incubation (Wan et al., 1998 ; Canillac et Mourey, 2001).

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpénoïdes (Rojas et al., 1992), le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques.

Très peu de recherche se sont intéressées à l'étude de l'activité antimicrobienne d'*Artemisia campestris* (Ben Sassi et al., 2007 ; Naili et al., 2010).

Tous les extraits d'*A. campestris* se sont révélés actifs envers toutes les souches bactériennes testées mais avec des degrés différents ce qui s'est traduit par la différence des CMI, toutefois la souche *P. aeruginosa* n'a montré aucune sensibilité pour ces extraits.

Les trois extraits possèdent la même CMI pour les souches de *S. aureus*, *E. coli*, alors que pour la souche de *P. mirabilis*, la valeur de la CMI de l'extrait de chloroforme est deux fois plus inférieure à celle de l'extrait d'acétate d'éthyle.

Ben Sassi *et al.*, (2007), ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de la partie aérienne de 23 plantes médicinales dont *A. campestris*, ils ont trouvé que seul l'extrait d'acétone exerce un effet inhibiteur parmi les trois extraits (acétone, hexane, méthanol).

Naili *et al* (2010), ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. campestris*. Ils ont utilisé plusieurs souches dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats obtenus dans cette étude ont montré que cet extrait possède un effet inhibiteur sur toutes les bactéries étudiées.

Aliyiannis *et al* (2001) ont établi une classification de l'efficacité de l'inhibition des extraits des plantes selon les valeurs de CMI comme suit: inhibition modérée: varie de 600 µg/ml à 1500 µg/ml, faible inhibition: CMI supérieure à 1600 µg/ml. D'après cette classification, nos extraits exercent une inhibition modérée sur les souches *E. coli* et *P. mirabilis*, et une faible activité sur la souche *S. aureus*.

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Dans le présent travail, différents aspects d'*Artemisia campestris* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimique et activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits bruts.

L'extraction de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes et flavonols était conséquente.

L'activité antioxydante des différents extraits d'*Artemisia campestris* a été évaluée par deux méthodes: le test blanchissement du β -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH. Pour le premier test les résultats ont montré que l'oxydation du β -carotène est efficacement inhibée par les extraits testés. En effet, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans les extraits les plus polaires, il s'agit en occurrence de l'éthanol et de l'acétate d'éthyle. Pour le test de réduction du radical libre DPPH, l'activité antiradicalaire est élevée dans l'extrait le plus polaire (extrait éthanolique), par contre elle est faible pour les deux autres extraits.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion disque, Les résultats indiquent que les trois extraits possèdent une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées sauf la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui manifeste une résistance pour tous les extraits.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est

souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de cette plante.

Références bibliographiques

Références

- Abderrazak M. et Joël R.** (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- Afolayan A.J., and Meyer J.J.** (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7- trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* **57**:177–81.
- Akrout A., Chemli R.C., Chrief., and Hammami M.** (2001). Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *J. Flavour Fragr.* **16**: 337–339.
- Akrout A., Gonzalez L.A., El Jani H.J., and Madrid P.C.** (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaeahirsuta* from southern of Tunisia. *J. Food. Chem. Tox.* **49**: 342–347.
- Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., and Chinou I. B.** (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 4168-4170.
- Aniya Y., Shimabukuro M., Shimoji M., Kohatsu M., Gyamfi M.A., and Miyagi C.** (2000). Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. *J. Biol. Pharm. Bull.* **23 (3)**:309–312.
- Antwerpen P.V.** (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système Myeloperoxydase/ Peroxyde d'hydrogène/ Chlorure. Thèse de doctorat. Université libre de Bruxelles. pp: 3-5.
- Atawodi S. E.** (2005). Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotech.* **4 (2)**: 128-133.
- Avissar N., Whitin J.C., and Allen P.Z.** (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **2**: 15850-15855.
- Belhattab R.** (2007). Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et antiaflatoxinogène d'extraits de *Origanum glandulosum* Desf et *Marrubium vulgare* L (Famille des Lamiaceae). Thèse de Doctorat d'état, UFA-Sétif, Algérie.
- Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., and Aouni M.** (2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J. Pharmaco. Bio.* **45 (5)**: 421–428.

Boizot N., and Charpentier J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. **4 (6):7**.(cited in Mohammedi Z, 2005).

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and BersetC. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**: 25-30.

Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., and Rice-Evans C. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **330**: 1173-1178.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3^{ème} Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

Canillac N., and Mourey A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and *coliform* bacteria. *Food Microbiol.* **18**: 261– 268.

Caratini R. (1971). Bordasencyclopedia. Ed Bodas. Belgique. **23**: 137-195

Chaudhry P.S., Cabrera J., Juliani H.R., and Varma S.D. (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.* **32**: 1995.

Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., and Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT.* **39**:756-761.

Cohen Y et Jacquot C. (2001). Pharmacologie. 5^{ème} Ed. Masson. Paris. 350p.

Cotelle N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**:569-590. (cited in Yakhlaf G, 2009).

Dacosta Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

David A., Hervé M. (1994). Flore de la suisse. Ed Du Griffon Neuchâtel. Suisse. 428p.

De Pascual J.T., Gonzalez M.S., Muriel M.R and Bellid I.S. (1984). Phenolic derivatives from *Artemisia campestris Subsp Glutinosa*. *Phytochemistry.* **23 (8)**: 1819-1821.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., et Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life. Sci.* **65 (4):** 337-53.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J. Food Chem.* **97:** 654–660.

Djeridane A., Yousfi M., Najemi B., Vidal N., Lesgards JF., and Stocker P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic Compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* **224:** 801-809.

Dob T., Dahmane D., Berramdane T., and Chelghoum C. (2005). Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *J. Pharm. Bio.* **43(6):** 512–514.

Donrop A.M., Day N.P. (2007). The treatment of severe malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101:** 633-634.

Effendi L., Yajun Y. et al., (2008). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **8:** 172-181.

Elghozi J.L., Duval D. (1992). Pharmacologie 2^{ème} Ed : Médecine Flammarion. Paris. 289p.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* pp: 108-115.

Ferchichi L., Merza J., Landreau A., Le Ray A.M., Legseir B., Seraphin D., and Richomme P. (2006). Occurrence of isocoumarinic and phenolic derivatives in *Artemisia campestris* L. subsp. *campestris*. *Biochem Syst. and Ecol.* **34:** 829-832.

Fuhrman B., Lavy A., and Aviram M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61:**549-554. (cited in Yakhlaf G, 2009).

Galeotti F., Barille E., Curir P., Dolci M., and Lanzotti V. (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry. letters.* **1:** 44-48.

Ganther H.E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.* **20 (19):** 1657- 1666.

Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. **19**: 835–841.

Gardès-Albert M, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. pp: 91-96.

Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescencemedhod. *AAPS Pharm Sci*. **5 (2)**:5p.

Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème}Ed TEC&DOC. Paris. pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Giulia Di Carlo, Nicola Mascolo, Angelo A. Izzo, and FrancescoCapasso. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. **65 (4)**: 337-353.

Graham H.D. (1992). Stabilisation of the Prussian blue colourin the determination of polyphenols.*J. Agric. Food Chem.***40**:801-805.

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

Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants.*Nutr.Rev.***52**:253-265.(cited in Yakhlaf G, 2009).

Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., MizutaniK.,andKinoshito T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhizainflata*. *Phytochemistry*. **48**: 125-129.

Harborne J.B., and Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992 *Phytochemistry*. **55**: 481-504.

Hennebelle T., Sahpaz S. and Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér.***1**: 3-6.

Huang D., OuB. and Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays.*J of Agr Food chem.***53**:1841-1856.

- Huang Guangrong., Jiang Jiaxin.,and Dai Dehui.** (2008). Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.***7 (9):** 1335-1338.
- Hurabielle M., and Eberle J.** (1982). Flavonoids of *Artemisia campestris ssp. glutinosa*. *Planta Med.* **46 (2):**124–125.
- Iniesta-Sanmartin E., Barberan F.A.T., Guirado A.,and Lorents F.T.**(1990). Antibacterial flavonoids from *Helichrysumpicardii* and *H. italicum*. *Planta Medica.* **56:** 648-649.
- Iinuma M., Tsuchiya H., Sato M., Yokoyama J., Ohyama M., Ohkawa Y., Tanaka T., Fujiwara S., and Fujii T.** (1994). Flavanones with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.*J. Pharm. Pharmacol.* **46:** 892-895.
- Jacques B, and André R.** (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.
- Jerkovic J., Mastelic M. Milos., Juteau F., Masotti V and VianoJ.** (2003). Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia *Flavour. Fragr. J.* **(18):** 436–440
- Joa O.M., Vasconcelos.,Artur M.S.S and Jose A.S.C.** (1998). Chromones and flavones from *Artemisia campestrisSubspMaritima*. *Phytochemistry.* **49 (5):** 1421-1424
- Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B.,and Simic M.G.** (1994). Flavonoids asantioxidants.*J. Am. Chem. Soc.***116:** 4846-4851.
- Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S.** (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed.***16:** 79–90.
- Juteau F., Masotti V., Bessière J-M., Viano J.** (2002). Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris var. glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol.* **(30):** 1065-1070.
- Kang D.G., Yun C.K., and Lee H.S.** (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacol.* **87:**231-236.
- Khanbabae K and Ree T.R.** (2001). Tannins:Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry.* **18:** 641-649.(cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Kaur C and Kapoor H.C. (2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables *.Food. Sci.Technol.* **37**: 153-161. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

Kempf S. Zeitouni. (2009). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie : *article in press.*

King A., and Young G. (1999). characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.*Jof the American dietetic association.***99**:213-218. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008

Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Knez EICS. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.* **54**: 65-72.

Krippel-Drews P., Lang F., Haussinger D. and Drews G. (1994). H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells *.Pflugers Arch.* **426**:552-554.

Kundan S., and Anupam S. (2010). The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *J. Pharm. Biol.*pp:1-9.

Kyeong W.Y., Anwar M., and Jong H.K. (2007). Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp. *caudata* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology.* **50 (3)**: 358-361.

Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. and Lee C. Y. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7292-7295.

Liyana-Pathirana C. M., and Shahidi F. (2006). Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *J. Sci. of Food and Agriculture.* **86**: 477-485.

Lopes-Lutz D., Alviano D., Alviano C. S. and Kolodziejczyk P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry.* **69**:1732-1738.

Lugasi A., Hovari J., Sagi K., and Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J. Acta biologica. szegediensis.* **47 (1-4)**:119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005)

Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002). Botanique 3^{ème} Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.

- Mahmoud N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., and Hay A.J.** (1993). Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir.Res.* **46(7)**: 1257-71.
- Marfak A.** (2003). Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. pp: 6-7-10-
- Martinez-Cayuella M.** (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.***77**: 147-161.
- Medic–Saric M., Jasprica I., SmolcicBubaloA., and Momar A.** (2003). Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids.*CroaticaChemicaActa* .**77 (1-2)**:361-366. (cited in Mohammedi Z, 2005).
- Memmi A., Sansa G., Rjeibi I., El ayeub M., Srairi-Abid N., Bellasfer Z.,and Fekhih A.** (2007). Use of medicinal plants against *scorpionic* and *ophidian*venoms.*Arch. Inst. Pasteur. Tunis.* **84 (1-4)**: 49-55.
- Middleton and Elliott J.** (1996). Biological properties of plant flavonoids an overview. *Int. J. Pharmacol.* **34 (5)**: 344-348.
- Mila I., and Scalbert A.** (1994). Tannin antimicrobial properties through iron deprivation a new hypothesis.International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance. **381(2)**: 749-755.
- Mirjalili. M.H., Tabatabaei S.M.F., Hadian J., Nejad S.E.,and Sonboli. A.** (2007). Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia*from Iran. *J. Essent. OilRes.* **19** : 326–329
- Mookerjee B.K., Lee T.P., Logue G.P., Lippes H.A., and Middleton E.** (1986). The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo. Res.* **213**: 511-20.
- Mucciarelli M and Maffei M.** (2002). *Artemisia*: Introduction to the Genus Vol. 18 Ed Colin W.W. in Taylor & Francis. Ed. London and New York. pp: 10-16.
- Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y.** (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* **3**: 79–84.

- Namgoong S.Y., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., and Kim H.P.** (1994). Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* **54 (5)**: 313-20.
- Nauciel. C., and Vildé J.L.** (2005). Bactériologie médicale, 2^{ème}Ed. Masson . Paris. pp: 5-10.
- Ong K.C., and Khoo H.E.** (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life. Sci.* **67**: 1695-1705.
- Ozenda P.** (1983). Flore du Sahara Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique -Paris- 441p.
- Paris M et Hurabielle.** (1981). Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.
- Patrick B., Jean L., and Michel S.** (1988). Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{er} Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274.
- Pavela R.** (2009). Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culexquinquefasciatus*Say larvae (Diptera: Culicidae). *J. Parasitol Res.***105**: 887–892.
- Quezel et Santa.** (1962). Nouvelle flore de l’Algérie Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique .Paris. Tome I. 990p.
- Rauter A.P., Branco I., TostaoZ ., Pais M.S., Gonzalez A.G et Bermejo J.B.** (1989). Flavonoids from *Artemisia campestris Subsp Maritima*. *Phytochemistry.* **28 (8)**: 2173-2175.
- Rehman A., Nourooz J., Moller W. et al.** (1999). Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett.* **448**: 120-122.
- Richard C et Kiredjian M.,** (1995). Méthodes de laboratoire pour l’identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucelle, Bordetella. 2^{ème} édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. **pp**: 42-43.
- Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., and Mata R.** (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **35**: 275-283.
- Romero M.R., Efferth T., Serrano M.A., Castano B., Macias R.I., Briz O, and Marin .J.** (2005). Effect of artemisininartesanate as inhibitors of hepatitis B virus production in an “in vitro” system.*Antivir Res.* **68**: 75-83.

Sanchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of Foods Sci. Tech.* **8**: 121-137.

Saoudi M., Allagui M.S., Abdelmouleh A., Jamoussi K., and El Feki A. (2010). Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol.***62**: 601–605.

Sefi M., Fetoui H., Makni M., and Najiba Zeghal N. (2010). Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Food. Chem.Toxicol.***48**: 1986–1993.

Seyoum A., Asres K., and El-Fiky F.K. (2006). Structure - radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry.* **67**: 2058–2070

Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method.Enzymol.* **299**: 152-178.

Skerget M., Kotnik P., Hadolin.M.,Hras A.R., and SimonicM., Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* **89**: 191-198.

Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J. (2004). *Microbiology of Waterborne Diseases.* Ed Elsevier Academic Press. pp71-132

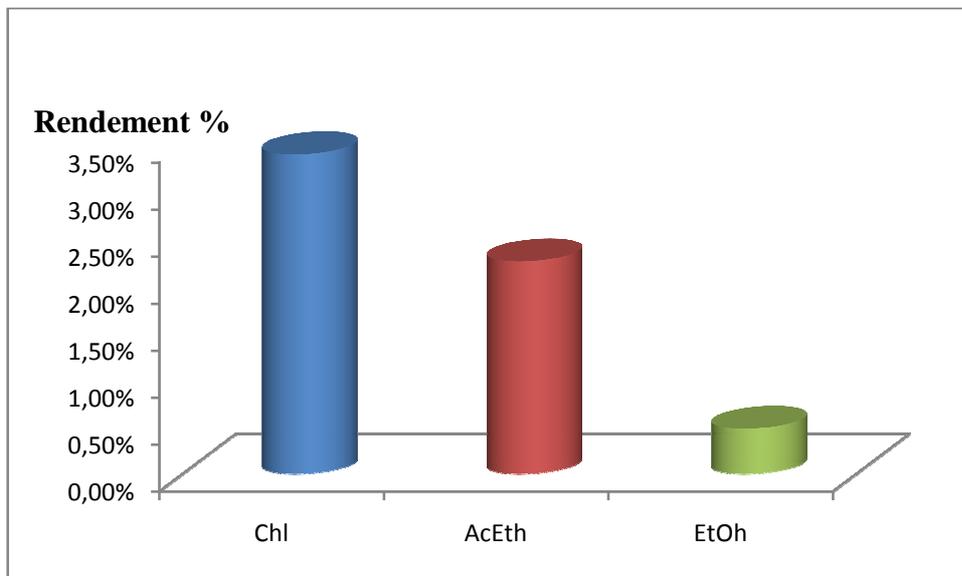
Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G. (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother.* **56**: 200-207.(cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., SokmenM.,andPolissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food. Chemistry.* **90**: 333-340. (cited in Yakhlaf G, 2009).

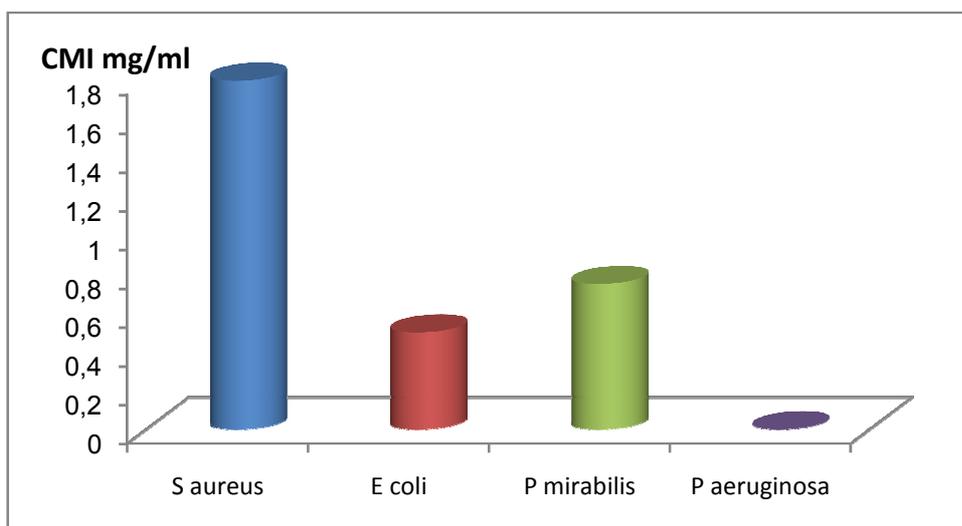
Tim C.T.P, and Andrew J. L. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids.*Int. J. Antimicrob. Ag.* **26**:343–356.

- Valant-Vetschera K.M., Fischer R., and Wollenweber E.** (2003). Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol.* **31**: 487-498.
- Valsaraj .R., Pushpangadan.P., Smitt.U.W., et al.,** (1997). New anti-HIV-1, Antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod.* **60**: 739-742.
- Vernin G., Merad O., Vernin G.M.F., Zamkotsian R.M. and Parkanyi C.** (1995). GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from Algeria. *Dev. Food Sci.* **37A**: 147-205.
- Wachter G.A., Hoffmann.J.J., Furbacher.T., Blake.M.E., and Timmermann.B.N.** (1999). Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry.* **52**: 1469-1471.
- Wan J., Wilcock A., and Coventry M.J.** (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 152-158.
- Wilfred .V et Ralph .N.** (2006). Phenolic compound biochemistry Ed Springer .USA. 24p.
- Yang J., Guo J., and Yuan J.** (2008). In vitro antioxidant properties of rutin .LWT. **41**: 1060-1066. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Yanishlieva N.V.I et Marinova E.M.** (1995). Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry.* **54**: 337-382. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Yi Z., Yan Y., Liang Y., and Zeng B.** (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. LWT, **41**: 597-603.
- Zheng W.F., Tan R.X., Yang L., and Liu Z.L.** (1996). Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Med.* **62**: 160-162.

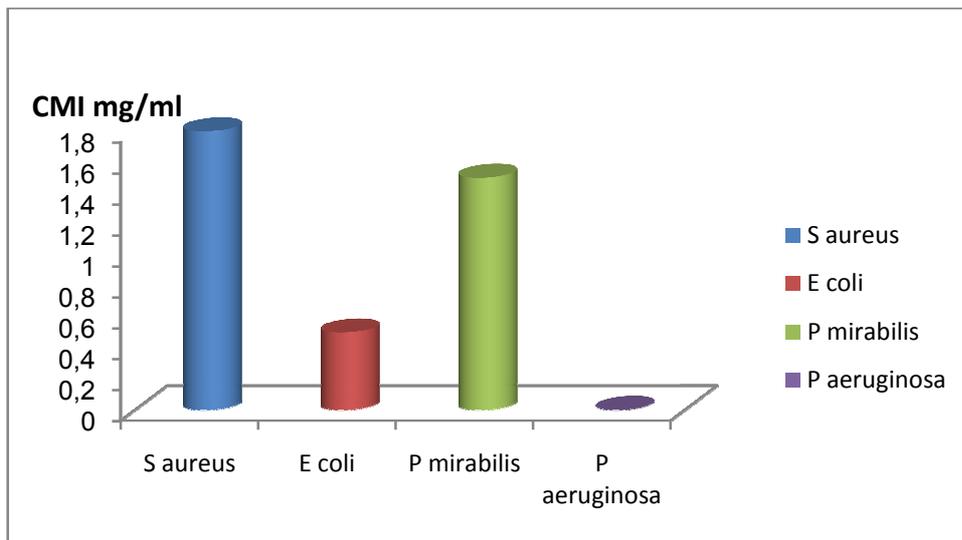
Annexes



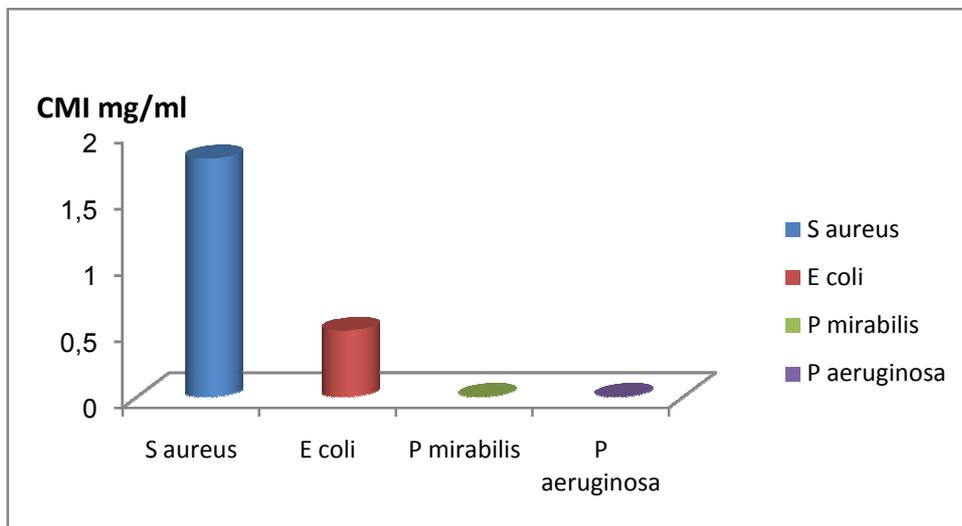
Annexes 1: Les rendements des extraits



Annexes 2: La concentration minimale inhibitrice manifestée par l'extrait de chloroforme.



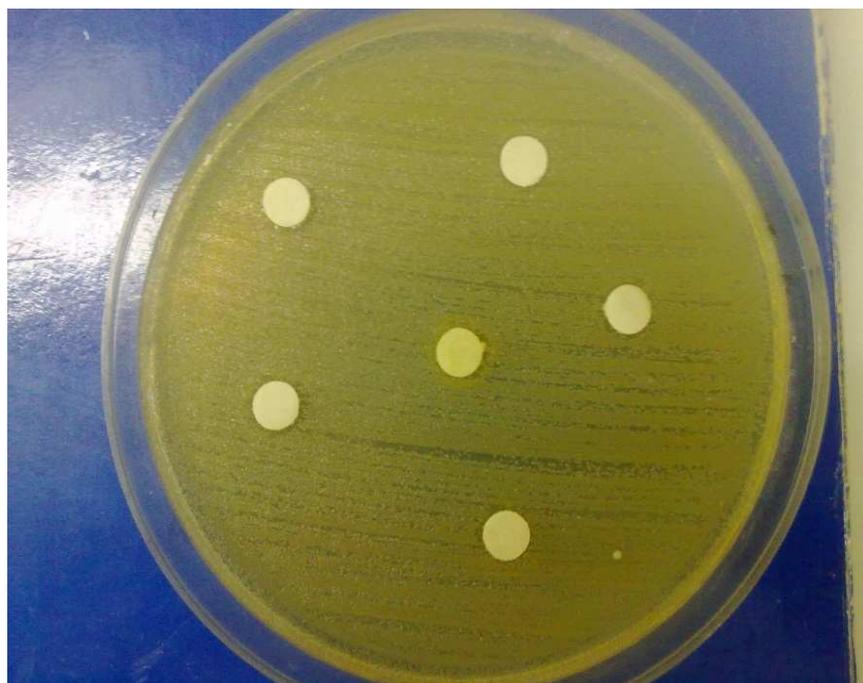
Annexes 3: La concentration minimale inhibitrice manifestée par l'extrait de l'acétate d'éthyle



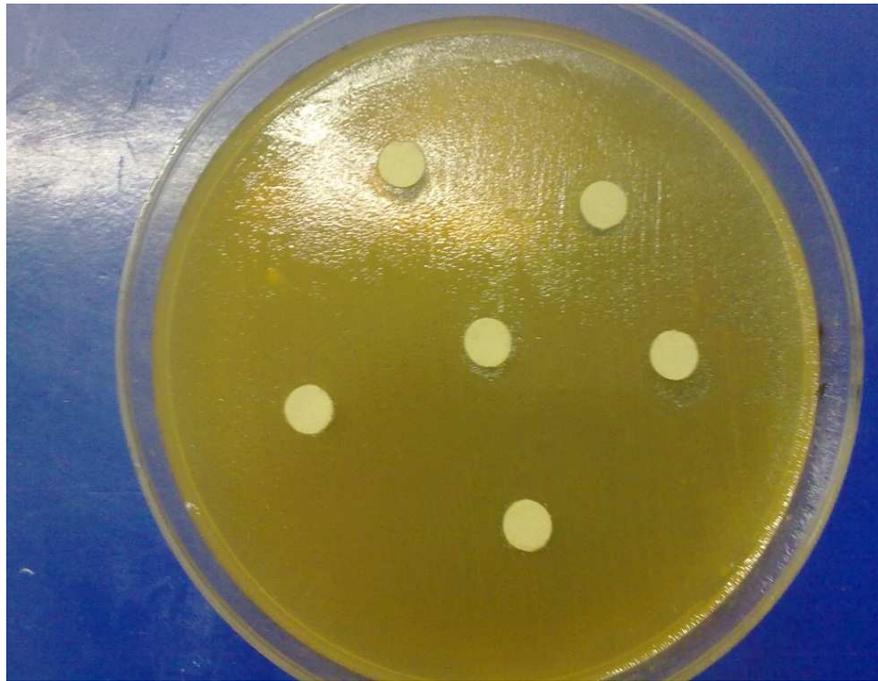
Annexes 4: La concentration minimale inhibitrice manifestée par l'extrait de l'éthanol



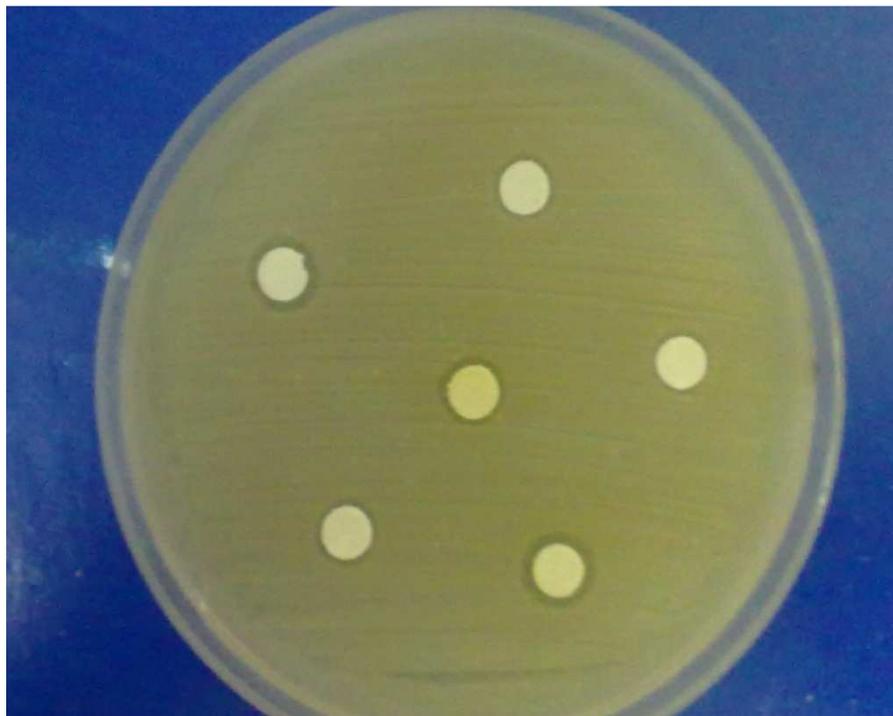
Annexes 5.1 : *E. coli*: Extrait chloroformique



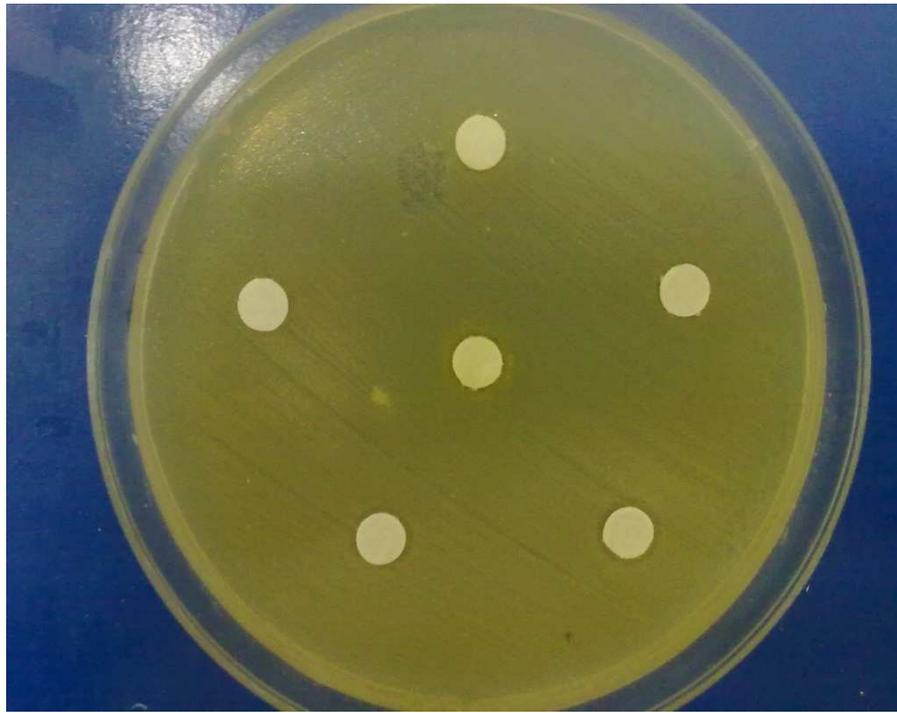
Annexes 5.2 : *E. coli*: Extrait éthanolique



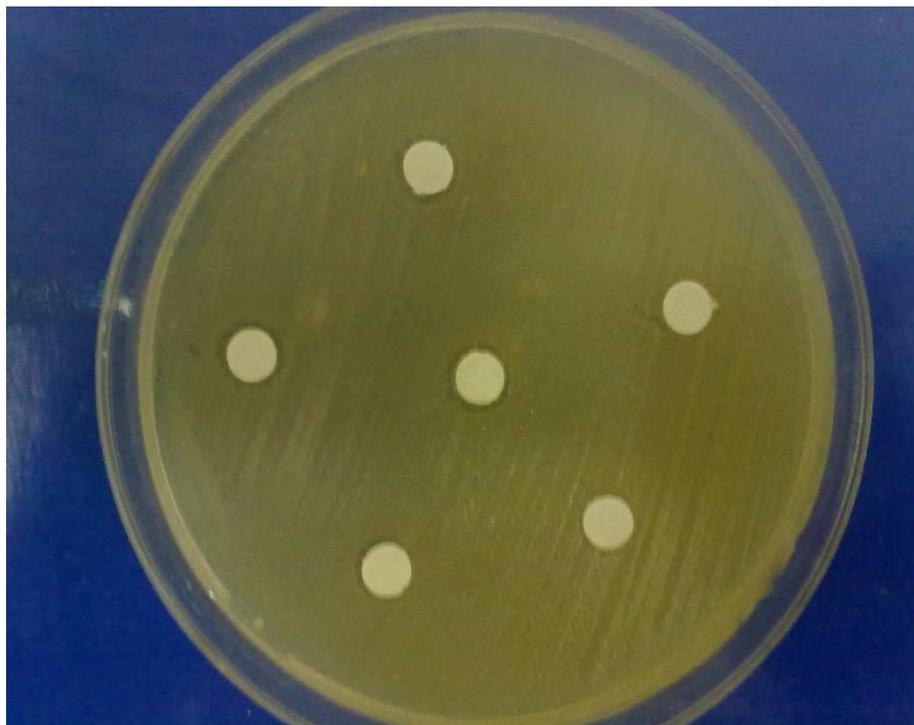
Annexes 5.3: *P. mirabilis*: Extrait d'acétate d'éthyle



Annexes 5.4: *S. aureus*: Extrait chloroformique

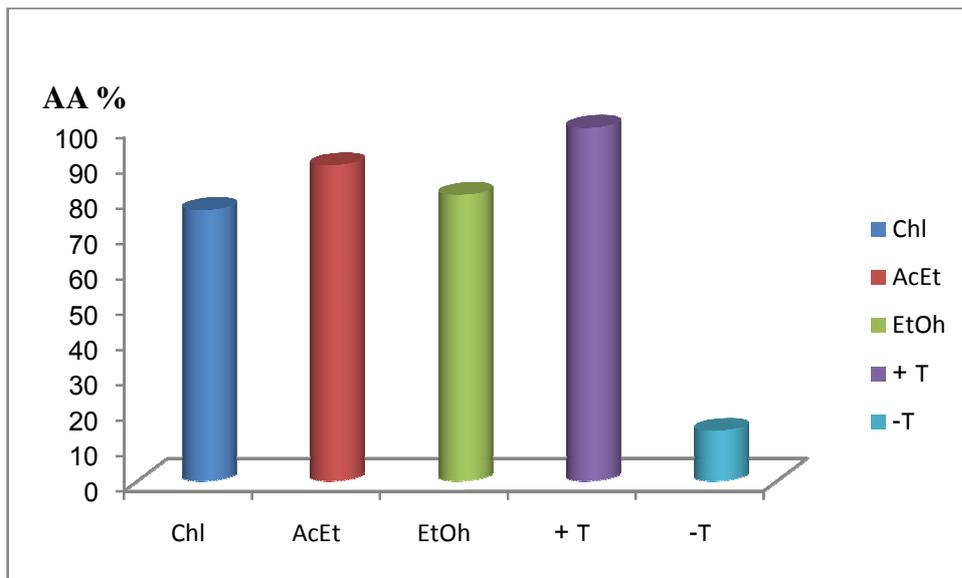


Annexes 5.5: *S. aureus*: Extrait éthanolique

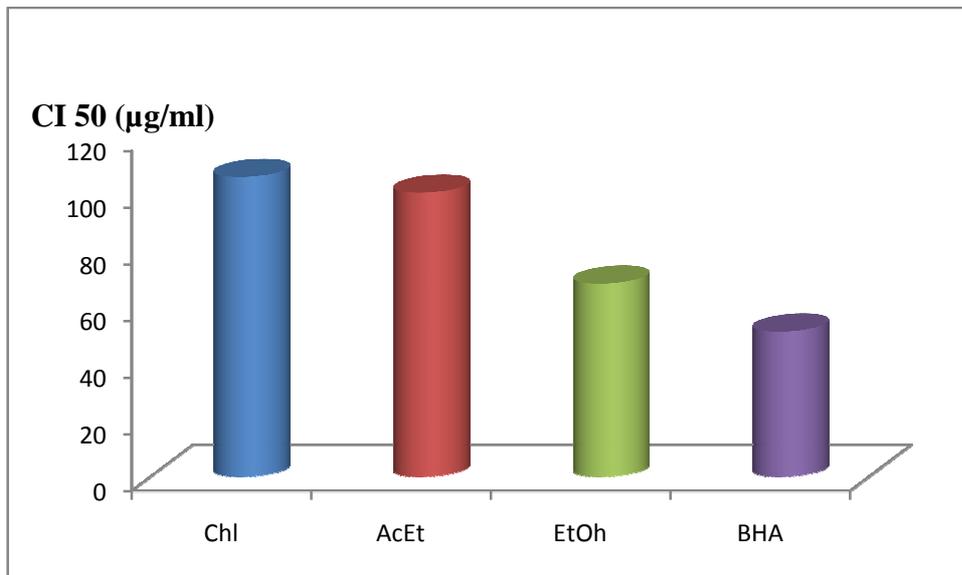


Annexes 5.6: *S. aureus*: Extrait d'acétate d'éthyle

Annexes 5: Les zones d'inhibition trouvées pour les souches testées.



Annexes 6: L'activité antioxydante des extraits et des témoins (positif et négatif) évaluée par le test de blanchissement du β - carotène.



Annexes 7: L'activité antiradicalaire des extraits et du témoin positif.

Résumé

Artemisia campestris est une plante médicinale appartenant à la famille des Astéracées, cette espèce connue sous le nom de « Tgouft », est très répandue dans le sud algérien. Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant trois solvants: chloroforme, acétate d'éthyle et l'éthanol. Les rendements respectifs sont : 3.4% (m/m), 2.26% (m/m) et 0.48% (m/m). La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 178 - 91 et 102 mg EAC/g Ps dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode AICI3, leur teneur est de 16.88 - 19.47 et 21.33 mg EQ/g Ps dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement. Les flavonols sont estimés par une autre méthode utilisant AICI3. Leur teneur est de 31.13- 36.86 et 12.70 mg EQ/g Ps dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes: la technique de blanchissement du β -carotène et la méthode de réduction de radical libre DPPH. Pour le premier test elle a été estimée à 76,68% - 89,32% - 80,97% pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol respectivement, celle du BHT 99,94%. Pour le second test L'CI50a été estimée à 105.76– 100.20 – 68.10 μ g/ml pour les extraits de chloroforme, acétate d'éthyle et éthanol respectivement. Alors que celle du témoin positif BHA est de 51.17 μ g/ml. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disque. La concentration minimale inhibitrice (CMI) manifestée par les trois extraits sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia Coli* est de 1.8 mg/ml et 0.5 mg/ml respectivement et sur *Proteus mirabilis* a été 0.75 mg/ml et 1.5 mg/ml pour les extraits de chloroforme et de l'acétate d'éthyle respectivement. Tous les extraits ont un effet sur les microorganismes testés sauf sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots clés : Asteraceae, *Artemisia campestris*, extraits organiques, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

المخلص

يعرف نبات *Artemisia campestris* بأنه نبتة طبية تنتمي إلى عائلة *Asteraceae*, تنتشر هذه النبتة المعروفة باسم "تغوفت" بصفة خاصة في منطقة الجنوب الجزائري. تم الحصول على المستخلصات العضوية بواسطة النقع وذلك باستعمال ثلاث مذيبات عضوية: الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول فكان المردود 3.4% (m/m)، 2.26% (m/m) و 0.48% (m/m) على الترتيب. تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي في المستخلصات باستعمال طريقة كاشف Folin-Ciocalteu. كانت النتائج كما يلي: 178- 91-102 mg EAC/g Ps في المستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. تم تقدير الفلافونويدات باستعمال طريقة AICI3. كان تركيز هذه الأخيرة : 16.88 - 19.47 - 21.33 mg EQ/g Ps في مستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. بينما قدرت الفلافونولات باستعمال طريقة اخرى تعتمد كذلك AICI3 وقد كان تركيزها كما يلي: 31.13- 36.86- 12.70 mg EQ/g Ps في مستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. قدرت النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال طريقتين مختلفتين: اختبار ابيضاض ال β -carotène وتقنية إرجاع الجذر الحر DPPH. أظهرت نتائج الاختبار الأول ان قيمة النشاطية كانت كما يلي : 76,68%، 89,32%، 80,97% بالنسبة لمستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب بينما قيمتها كانت للشاهد الموجب BHT = 99.94%. أما فيم يخص الاختبار الثاني كانت IC₅₀ للمستخلصات كما يلي : 105.76-100.20- 68.10 μ g/ml للمستخلصات كل من الكلوروفوم، اسيتات الايثيل و الايثانول على الترتيب. اما بالنسبة للشاهد الموجب BHA كانت IC₅₀ = 51.17 μ g/ml. حددت النشاطية المضادة للميكروبات والتركيز الأدنى للتثبيط لأربعة سلالات بكتيرية بطريقة الأقراص فكانت النتائج كما يلي: التركيز الأدنى للتثبيط (CMI) لسلاستي كل من *Staphylococcus aureus*، *E. Coli* قدر ب 0.5mg/ml - 1.8mg/ml، أما بالنسبة لسلالة *Proteus mirabilis* كان 0.75 - 1.5mg/ml للمستخلصي كل من الكلوروفوم واسيتات الايثيل على الترتيب. المستخلصات كلها كانت مؤثرة على كل السلالات المختبرة فيما عدى *Pseudomonas aeruginosa* التي كانت مقاومة.

كلمات مفاتيح : *Artemisia campestris* Asteracea، المستخلصات العضوية، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للميكروبات.

Abstract

Artemisia campestris is a medicinal plant belonging to the Asteraceae family, this species known as « Tgouft » is very widespread in the south of Algeria. Organic extracts were obtained by maceration with three solvents: chloroform, ethyl acetate and ethanol. The yields were: 3.4% (w/w), 2.26% (w/w) and 0.48% (w/w) respectively. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent, it was: 178- 91-102 mg CAE/g dw for the chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts respectively. The flavonoid contents was determined using a method AICI3, it were respectively: 16.88 - 19.47 - 21.33 mg QE/g dw in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts. The flavonols contents were respectively: 31.13- 36.86- 12.70 mg QE/g dw in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts.

Antioxidant activity was evaluated using two different methods: β -carotene bleaching method and Free radical scavenging effects of the free radical DPPH. In former test, the percentage of inhibition was 76,68% - 89,32% and 80,97% for the chloroform, ethyl acetate and ethanol extracts respectively, whereas in the latter, the IC₅₀ estimated for extracts was: 105.76 – 100.20 – 68.10 μ g/ml in chloroform, ethyl acetate, and ethanol extracts, this effect seems to be weak when compared to BHA (IC₅₀ = 51.17 μ g/ml). Antimicrobial activity was determined using four bacterial strains according to the disk diffusion assay; the minimal inhibitory concentration (MIC) was 1.8 mg/ml and 0.5mg/ml for the three solvents when tested on *Staphylococcus aureus* and *E. coli* respectively, and was 0.75 mg/ml and 1.5mg/ml for chloroform and ethyl acetate extracts when tested against *Proteus mirabilis*. Despite *Pseudomonas aeruginosa*, all the microorganisms tested were sensitive to the extracts.

Key words: Asteraceae, *Artemisia campestris*, organic extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity.