

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2019

## THÈSE

Présentée par

**BOUDJOUREF Mourad**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

Filière : BIOLOGIE

Spécialité : BIOCHIMIE

## THÈME

**Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits  
d'*Artemisia campestris***

### Devant le Jury

Président	Dhamna Saliha	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Belhattab Rachid	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	Zellagui Ammar	Pr. Univ OEB
	Gherraf Noureddine	Pr. Univ OEB
	Hambaba Leila	Pr. Univ Batna 2

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée LMA*

## **DÉDICACES**

*À mes chers parents qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et qui m'ont éclairé le chemin par leurs conseils*

*judicieux,*

*À ma femme, qui était toujours avec moi dans mes beaux et mauvais moments.*

*À mes frères et ma sœur : Walid, Ramzi, Djalel et Besma*

*À mes fils Mohamed El Amine, Souhaib*

*À mes oncles ; Ammar, Salem et Amor*

*À mes amis et mes collègues*

## **REMERCIEMENTS**

*Je remercie Allah le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.*

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mr Bellhattab Rachid, Professeur à l'université de sétif-1 Ferhat Abbas pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, pour sa grande patience, ses conseil et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Mme Dhemna Salîha, professeur à l'université de sétif-1 Ferhat Abbas d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je tiens également mes vifs remerciements à Mr Zellagui Ammar, Professeur à l'université D'OEB d'avoir accepté de juger ce travail et participer au jury.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Mr Gherraf Noureddine, Professeur à l'université D'OEB pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Mme Hambaba Leila Professeur à l'université Batna 2 d'avoir accepté de juger ce travail et participer au jury.*

*À tous mes amis.*

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

## Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer la composition phytochimique des extraits de la partie aérienne de la plante *Artemisia campestris* d'une part et d'évaluer les activités antioxydantes, anticholinestérase, antiinflammatoire et antibactérienne d'autre part.

Les extraits sont obtenus par décoction (extrait aqueux) et macération (extrait méthanolique). Un screening chimique suivi par le dosage des polyphénols, des flavonoïdes, flavones et flavonols et des tanins a été effectué. La séparation et l'identification des composés phénoliques a été réalisée en utilisant HPLC TOF / MS. L'activité antioxydante a été évaluée par les tests DPPH,  $\beta$ -carotène/acide linoléique, chélation du fer et le pouvoir réducteur. L'activité anticholinestérase a été évaluée par la méthode d'Ellman alors que l'activité antiinflammatoire des extraits a été évaluée selon le test de nitrite en utilisant des macrophages RAW 264.7. L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant la zone d'inhibition autour des disques. La teneur en polyphénol totaux variait entre  $74.75 \pm 0,01$  et  $88.61 \pm 0,22$  mg EAG / g d'extrait; Les flavonoïdes totaux entre  $12,91 \pm 0,01$  et  $33,14 \pm 0,01$  mg EQ / g d'extrait; les flavones et les flavonols entre  $18,37 \pm 0,01$  à  $217,75 \pm 0,01$  mg EQ / g d'extrait et celle des tanins entre 35,29 et 70,59 mg EC / g d'extrait. L'extrait méthanolique a montré une activité antioxydante modérée; DPPH ( $CI_{50} = 131,19 \pm 18,81 \mu\text{g/mL}$ ),  $\beta$ -carotène / acide linoléique (AA% =  $88,03 \pm 0,58$ ), la chélation du fer ( $CI_{50} = 266,74 \pm 16,51 \mu\text{g/mL}$ ). Cependant, aucun extrait n'a montré une activité anticholinestérase, au contraire tous les extraits ont manifesté une forte activité antiinflammatoire. Une activité antimicrobienne faible a été observée avec l'ensemble des extraits.

**Mots clés :** *Artemisia campestris*, screening chimique, activité antioxydante, activité anticholinestérase, activité antiinflammatoire, activité antimicrobienne.

## الملخص

تهدف هذه الدراسة لمعرفة التركيب الكيميائي للجزء الهوائي لنباتة *Artemisia campestris* من جهة وتقدير النشاطية المضادة للأكسدة، المضادة للمكروبات والمضادة للالتهابات من جهة أخرى. تم الحصول على المستخلصات باستعمال طريقة الغلي (المستخلص المائي) والنقع (المستخلص الميثانولي). تم إجراء عمليات التحليل الكيميائي بغية تحديد كمية عديدات الفينول الكلية، الفلافونيدات والدباغ، في حين تمت عملية الفصل والتعرف على المركبات الفينولية تم باستخدام كروماتوغرافيا ذات المردود العالي المتصلة بالكتلة.

تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال طريقة DPPH، ابيضاض بيتاكاروتين/حمض اللينوليك، خلب الحديد و القوة الارجاعية. تم تقييم النشاطية المضادة للأستيل كولين استيراز باستخدام طريقة Ellman بينما تم تحديد النشاطية المضادة للالتهابات باستخدام اختبار النترتيت باستعمال الخلايا البالعة RAW264.7. تم تقييم النشاطية المضادة للميكروبات باستخدام طريقة قياس قطر التثبيط.

يتراوح المحتوى الفينولي بين  $0.01 \pm 74.75$  و  $0.22 \pm 88.61$  مع مكافئ من حمض الغاليك لكل غرام من المستخلص، محتوى الفلافونيدات ما بين  $12.91 \pm 0.01$  و  $33.14 \pm 0.01$  مغ مكافئ الكرسيتين /غرام من المستخلص و الدباغ تتراوح ما بين 35.29 و 70.59 مع مكافئ من الكاتشين / غرام من المستخلص. اظهر المستخلص الميثانولي نشاطا مضادا للأكسدة بدرجة معتبرة في اختبار DPPH ( $131.19 \pm 18.81$  ميكروغرام/مل)، البيتاكاروتين /حمض اللينوليك ( $88.03 \pm 58$  بالمئة)، خلب الحديد ( $16.51 \pm 266.74$  ميكروغرام/مل). أظهرت كل المستخلصات انعدام النشاطية المضادة للأستيل كولين استيراز في حين كانت النشاطية المضادة للالتهابات قوية. النشاطية المضادة للميكروبات كانت ضعيفة مع جميع المستخلصات.

**كلمات البحث :** *Artemisia campestris*، التحليل الكيميائي، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للأستيل كولين استيراز، النشاطية المضادة للالتهابات، النشاطية المضادة للميكروبات.

## Abstract

The aim of this study was to determine the phytochemical composition of *Artemisia campestris* aerial part extracts on the one hand and to evaluate the antioxidant, anti-cholinesterase, anti-inflammatory and the antimicrobial activities on the other hand. The extracts were obtained by decoction (aqueous extract) and maceration (methanolic extract). A phytochemical screening followed by the determination of polyphenols, flavonoids, flavones, flavonols and tannins was carried out. Separation and identification of phenolic compounds were achieved using HPLC TOF/MS. The antioxidant activity was assessed according to DPPH,  $\beta$ -carotene/linoleic acid, iron chelating ability and reducing power methods. The anticholinesterase activity was evaluated by using Ellman's method while the antiinflammatory activity according to the nitrite test using RAW 264.7 macrophage cell. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition zone. Total phenol content varied from  $74.75 \pm 0.01$  to  $88.61 \pm 0.22$  mg EAG / g extract; total flavonoids ranged from  $12.91 \pm 0.01$  to  $33.14 \pm 0.01$ mg QE/g extract; flavones and flavonols ranged from  $18.37 \pm 0.01$  to  $217.75 \pm 0.01$ mg QE/g extract; and tannins ranged between 35.29 and 70.59 mg EC / g extract. The methanolic extract showed moderate antioxidant activity; against the free radical DPPH ( $IC_{50} = 131.19 \pm 18.81$   $\mu$ g / mL),  $\beta$ -carotene / linoleic acid ( $AA\% = 88.03 \pm 0.58$ ), iron chelating ability ( $IC_{50} = 266.74 \pm 16.51$   $\mu$ g/mL). However, no extract showed anticholinesterase activity, in contrast all extracts showed a strong anti-inflammatory activity. A weak antimicrobial activity was observed with all extracts.

**Key words:** *Artemisia campestris*, chemical screening, antioxidant activity, anticholinesterase activity, anti inflammatory activity, antimicrobial activity.

## Liste des Abréviations

AchE	Acétylcholinestérase
ACTI	Acétylthiocholine iodide
AINS	Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	Butylated hydroxytoluene
CI <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice 50%
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DTNB	Acide dinitrobenzoïque
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium.
DMSO	Dimethylsulfoxyde
EDTA	Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique
EMOH	Extrait méthanolique
EAq	Extrait aqueux
EC50	Concentration effective qui chélate 50 % de Fe <sup>2+</sup>
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EAG	Equivalent d'acide galique
EQ	Equivalent de quercétine
EC	Equivalent de catéchine
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GN	Gélose nutritive
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit

GSSG	Glutathion disulfure
LPS	Lipopolysaccharide
MTT	Bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium
O.M.S	Organisation mondiale de santé
SVF	Sérum de veau foetal
SOD	Superoxyde dismutase
DTNB	5,5'- dithiobis-[2 nitrobenzoate]

## Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b> Photos d' <i>Artemisia campestris</i> .....	3
<b>Figure 2.</b> Structures de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone .....	7
<b>Figure 3:</b> Différents types structuraux de flavonoïdes.....	9
<b>Figure 4 :</b> Diagramme illustrant la nature multifactorielle complexe des dommages oxydatifs causés aux cellules .....	11
<b>Figure 5 :</b> Les enzymes antioxydantes et leurs mécanismes de réaction.....	12
<b>Figure 6 :</b> Composants naturels de la vitamine E.....	15
<b>Figure 7 :</b> Structure de l'acide ascorbique .....	16
<b>Figure 8 :</b> Structure de l'acide lipoïque .....	16
<b>Figure 9 :</b> Structures chimiques des principaux caroténoïdes présents dans le plasma humain. .....	17
<b>Figure 10 :</b> Classes des composés phénoliques.....	18
<b>Figure 11 :</b> La réaction inflammatoire schématisée .....	21
<b>Figure 12 :</b> Enchaînement des étapes de la réaction inflammatoire .....	22
<b>Figure 13 :</b> Mécanisme d'action des AINS. ....	31
<b>Figure 14 :</b> L'interaction anti-oxydante dans le test de DPPH.....	33
<b>Figure 15 :</b> L'interaction anti-oxydante dans le test de blanchissement du $\beta$ -carotène(BCB).36	
<b>Figure 16 :</b> Réaction de réduction du MTT en Formazan, catalysée par la succinate déshydrogénase .....	39
<b>Figure 17 :</b> Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman .....	44
<b>Figure 18 :</b> Les rendements des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> .....	45

<b>Figure 19 :</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux .	46
<b>Figure 20 :</b> Teneurs en polyphénols totaux des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> .....	47
<b>Figure 21 :</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes .....	49
<b>Figure 22 :</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonols...	58
<b>Figure 23:</b> Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins .....	59
<b>Figure 24 :</b> Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration .....	63
<b>Figure 25 :</b> Variation de pouvoir réducteur en fonction de la concentration .....	66
<b>Figure 26 :</b> Cinétique de blanchissement du $\beta$ - carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits de méthanol d' <i>Artemisia campestris</i> et du BHA.....	66
<b>Figure 27 :</b> Cinétique de blanchissement du $\beta$ - carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits aqueux d' <i>Artemisia campestris</i> et du BHA. ....	67
<b>Figure 28 :</b> Taux de NO <sub>2</sub> libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits d' <i>Artemisia campestris</i> . ....	68
<b>Figure 29:</b> Droite d'étalonnage NaNO <sub>2</sub> pour l'évaluation in vitro de l'activité antiinflammatoire .....	70
<b>Figure 30 :</b> Pourcentage de viabilité des cellules de macrophages en présence des extraits d' <i>Artemisia campetris</i> et de LPS (100ng/mL) .....	71
<b>Figure 31:</b> Les chromatogrammes des extraits aqueux et méthanoliques de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> obtenu par HPLC TOF/MS.....	72

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Principales classes de composés phénoliques .....	6
<b>Tableau 2</b> : Maladies liées aux dommages oxydatives .....	13
<b>Tableau 3</b> : Aspects, couleurs et rendement des divers extraits de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> . .....	41
<b>Tableau 4</b> : Résultats des tests phytochimiques sur les extraits aqueux et méthanoliques d' <i>Artemisia campestris</i> de deux régions, Boussaâda et OEB. ....	43
<b>Tableau 5</b> : Teneurs en polyphénols totaux des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> .....	44
<b>Tableau 6</b> : Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> .....	45
<b>Tableau 7</b> : Teneurs en flavones et flavonols des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> .....	46
<b>Tableau 8</b> : Teneurs en tanins des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> .....	47
<b>Tableau 9</b> : Les valeurs des $CI_{50}$ des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> et des antioxydants standards (BHA, acide ascorbique, quercétine). .....	50
<b>Tableau 10</b> : Valeurs de la concentration effectrice ( $CE_{50}$ ) des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> et des standards.....	51
<b>Tableau 11</b> : Valeurs de l'activité antiradicalaire (AAR) des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> et du standard. ....	51
<b>Tableau 12</b> : La capacité antioxydante totale des extraits .....	52
<b>Tableau 13</b> : Pourcentage d'inhibition de la production de NO .....	58
<b>Tableau 14</b> : Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits aqueux de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> Aq 04 .....	63
<b>Tableau 15</b> : Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits aqueux de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> Aq 28.....	65

<b>Tableau 16</b> : Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits MOH de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> MOH04.....	68
<b>Tableau 17</b> : Séparation chromatographique par HPLC TOF/MS des extraits MOH de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i> MOH28.....	71
<b>Tableau 18</b> : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries et de levure par les extraits d' <i>Artemisia campestris</i> de l'érythromycine et la ciprofloxacine.....	76

## Sommaire

Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

#### I. Généralités sur la plante

I- La plante <i>Artemisia campestris</i> .....	3
I -1-Généralités.....	3
I -2- Description botanique .....	3
I -3- Systématique de la plante.....	4
I -4- Origine et distribution.....	4
I -5- Composition chimique .....	4
I -6- Utilisation d' <i>Artemisa campestris</i> en médecine traditionnelle.....	4
I -7- Activités biologiques .....	5
II. Les polyphénols .....	5
II.1. Classification .....	5
II.1.1. Les flavonoïdes .....	6
II.1.1.1. Structure.....	7
II.1.1.2. Classification.....	7

#### III. Les Radicaux libres et Stress oxydatif

III.1. Les radicaux libres.....	10
III.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	10
III.3. Sources d'espèces réactives de l'oxygène .....	10
III.3.1. Les sources cellulaires des ERO.....	10

III.3.2. Les sources exogènes des ERO .....	11
III.4. Dommages oxydatives des espèces réactives de l'oxygène.....	11
III.5. Le stress oxydant .....	12
III.6. Maladies liées au stress oxydant.....	13
III.7. Les antioxydants .....	13
III.7.1. Les antioxydants enzymatiques .....	14
III.7.2. Les antioxydants non enzymatiques .....	15
IV.1. L'inflammation.....	20
IV.2. Les phases de l'inflammation.....	21
IV.3. Les médiateurs de l'inflammation .....	22
IV.4. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) .....	23
IV.5. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (A.I.S) ou corticoïdes .....	24
IV.6. Anti-inflammatoire d'origine végétale .....	25

## **MATERIEL ET METHODES**

I. Matériels et méthodes.....	26
II. Méthodes d'analyse.....	26
II.1. Extraction .....	26
II.1.1. Préparations de l'extrait méthanolique.....	26
II.1.2. Préparations de l'extrait aqueux.....	26
II.1.3. Calcul du rendement.....	26
II.2. Etude phytochimique des extraits .....	27
II.2.1. Screening phytochimique .....	27
II.2.1.1. Mise en évidence des flavonoïdes .....	27
II.2.1.2. Mise en évidence des tanins.....	27
II.2.1.3. Mise en évidence des saponines.....	27
II.2.1.4. Mise en évidence des alcaloïdes .....	27
II.2.1.5. Mise en évidence des anthocyanes.....	28

II.2.2. Analyses quantitatives .....	28
II.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	28
II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes .....	28
II.2.2.3. Dosage des flavones et flavonols .....	29
II.2.2.4. Dosage des tanins.....	29
II.3. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC Q-TOF/ MS).....	30
II.4. Évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits in vitro .....	30
II.4.1. Test de DPPH.....	30
II.4.2. Pouvoir anti-oxydant réducteur du fer (FRAP).....	31
II.4.3. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène (BCB).....	32
II.4.4. Activité antioxydante totale (TAC).....	34
II.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de nitrite .....	34
II.5.1. Mise en culture des cellules .....	34
II.5.2. Récolte des cellules .....	35
II.6. Activité antimicrobienne .....	37
II.7. Activité anticholinestérase.....	39
II.8. Analyses statistiques .....	40
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
I. Résultats.....	41
I.1. Rendement des extractions .....	41
II.1. Screnning chimique .....	42
II.2. Analyse quantitative.....	43
II.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	43
II.2.2. Dosage des flavonoïdes .....	44
II.2.3. Dosage des flavones et flavonols .....	<b>45</b>
II.2.4. Dosage des tanins.....	<b>46</b>
II.3. Identification des composés phénoliques par HPLC TOF/MS .....	<b>47</b>

II.4. Activités biologiques.....	54
II.4.1. Activité antioxydante .....	54
II.4.1.1. Test de DPPH.....	54
II.4.1.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	58
II.4.1.3. Test de blanchissement du $\beta$ - carotène.....	62
II.4.1.4. Capacité antioxydante totale (TAC).....	65
II.4.2. Activité antiinflammatoire.....	66
II.4.2.1. Effet cytotoxique .....	70
II.4.3. Activité antimicrobienne .....	73
II.4.4. Activité anticholinestérase.....	75
Conclusion et Perspectives .....	76
Références bibliographiques.....	78

Annexes

### **Introduction**

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences simples en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (Benkhighe *et al.*, 2010).

D'après une estimation de l'OMS, sur la population du globe qui dépasse 4 milliards d'habitants, il y en a peut-être 80% qui ont essentiellement recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire leurs besoins en soins de santé primaires. En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales (Benkhighe *et al.*, 2010).

L'utilisation des plantes en phytothérapie a connu actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent. Il est estimé qu'au moins 25% de tous les médicaments modernes sont dérivés, directement ou indirectement, à partir de plantes médicinales, principalement grâce à l'application des technologies modernes aux connaissances traditionnelles.

L'importance des plantes aromatiques et médicinales ne cesse d'augmenter en relation, d'une part, avec la forte augmentation de la demande mondiale enregistrée ces dernières décennies pour les PAM's et leurs produits dérivés et, d'autre part, avec le nombre croissant d'utilisateurs et la diversité des domaines de leur valorisation (El Hilah *et al.*, 2015). Les plantes constituent une source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'études scientifiques rigoureuses pour leur éventuelle utilisation comme alternative, particulièrement pour la protection contre la peroxydation lipidique et le traitement des maladies anti-inflammatoires (Bourkhiss *et al.*, 2010).

*Artemisia campestris* est une plante médicinale largement utilisée en Afrique du nord en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies. De nombreuses études phytochimiques ont montré la présence de polyphénols, des tanins, des flavonoïdes et des huiles essentielles dans cette espèce. Ces composés sont doués de nombreux effets pharmacologiques tels que les effets antioxydants, effets anticancéreux, effets antifongiques, effets antidiabétiques, antihelminthiques, antihypertensives et hépatoprotecteurs (Ghlissi *et al.*, 2016 ; Sefi *et al.*, 2012 ; Dib *et al.*, 2016).

## ***Introduction***

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif essentiel consiste à l'étude phytochimique et biologique des extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*.

Le choix de cette espèce repose sur son utilisation en médecine traditionnelle où les feuilles et les tiges sont utilisées pour traiter les troubles digestives et les maladies hépatiques.

Le présent travail est structuré en deux parties : La première partie consacrée au screening phytochimique des extraits bruts de la partie aérienne de la plante, cette partie concerne la recherche de constituants chimiques et la caractérisation des molécules obtenues lors de cette étude et la deuxième partie est consacrée à l'évaluation *in vitro* des activités biologiques des extraits de la plante.

REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## I. La plante *Artemisia campestris*

### I.1. Généralités

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées. Il est considéré comme l'un des genres le plus répandu et le plus étudié ; ce genre contient un nombre variable d'espèces avoisinant les 500 espèces. En Algérie, le genre *Artemisia* est représenté par 11 espèces qui poussent de façon spontanée (Quezel et Santa, 1962).

### I.2. Description botanique

*Artemisia campestris* est une plante vivace de 30 à 150 cm de hauteur. La tige glabre est ramifiée et ascendante ayant une forme de panicule; elle est généralement rouge brunâtre et glabre, et acquiert une forme lignifiée dans la partie inférieure et une forme pubescente dans la partie supérieure. Les feuilles sont vertes souvent glabrescentes à maturité; Les feuilles inférieures sont atténuées en pétioles ou même auriculé alors que les feuilles supérieures sont simples. Les capitules sont ovoïdes et hétérogames, contenant 8 à 12 des fleurs, organisées sur un réceptacle convexe et glabre, et entourées d'involucrebractées glabres organisées en plusieurs rangées. Les fleurs de rayon sont femelle, pistillées et fertiles, tandis que les fleurs du disque sont stériles, et fonctionnellement masculin avec des ovaires abortifs réduits, Les fleurs mâles sont tubulaires, jaunâtres, sans calice, avec 5 pétales fusionnés et 5 étamines fusionnées avec la présence de sacs de sécrétion sur les lobes de la corolle des fleurs du disque. Le fruit est un akène homomorphe, obové, chauve et lisse (Dib *et al.*, 2017; Quezel et Santa, 1962) (Fig. 1).



**Figure 1 :** Photo d'*Artemisia campestris* (Belhattab *et al.*, 2011)

### **I.3. Systématique de la plante**

D'après Caratini (1971), la plante *Artemisia campestris* est classée comme suit :

**Règne:** *Plantae*

**Sous règne:** *Tracheobionta*

**Embranchement:** *Spermatophyta*

**Sous embranchement:** *Magnoliophyta*

**Classe:** *Magnoliopsida*

**Sous classe:** *Asteridae*

**Ordre:** *Asterales*

**Famille:** *Asteraceae*

**Genre:** *Artemisia*

**Espèce:** *Artemisia campestris* L.

### **I.4. Origine et distribution**

D'après Yun *et al.* (2007), *Artemisia campestris* est originaire de l'Asie.

Les plantes de la famille des Astéracées poussent dans les climats arides et semi-arides; elles se trouvent dans les steppes et les déserts du Moyen-Orient, de l'Afrique du Nord et de l'Espagne et s'étend jusqu'au nord-ouest de l'Himalaya (Khelifi *et al.*, 2013).

### **I.5. Utilisation d'*Artemisia campestris* en médecine traditionnelle**

*Artemisia campestris* est l'une des plantes médicinales les plus utilisées en Afrique du Nord comme remède contre diverses maladies. Le décocté des feuilles de cette plante est utilisé en médecine traditionnelle grâce à ses propriétés antivenimeuses, anti-inflammatoires, antirhumatismales et antimicrobiennes (Sefi *et al.*, 2012). La partie aérienne est utilisée pour traiter les troubles digestifs, les ulcères et les douleurs menstruelles (Dob *et al.*, 2005). Comme elle est utilisée pour traiter les troubles urinaires, rénaux et hépatiques (Dib *et al.*, 2017).

## I.6. Activités biologiques

En plus de son utilisation en médecine traditionnelle, des études confirment que *Artemisia campestris* possède des activités antioxydantes, anticancéreuses, antibactériennes, anthelminthique, insecticides, anti-inflammatoire, antidiabétiques et antipoison (Megdiche-Ksouri *et al.*, 2015 ; Dib *et al.*, 2017).

## I.7. Composition chimique

Dans la littérature, de nombreuses études ont rapporté sur la composition chimique de cette espèce. Elles ont révélé la présence des polyphénols, des tanins, des saponosides et des huiles essentielles (Ghliissi *et al.*, 2016).

Les composés phénoliques présents chez *Artemisia campestris* sont : l'acide caféique, l'acide chlorogénique et les acides isochlorogéniques A, B et C (Djeridane *et al.*, 2007; Sebai *et al.*, 2014 ; Megdiche- Ksouri *et al.*, 2015).

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

Plusieurs études (Akrouit *et al.*, 2001; Belhattab *et al.*, 2011) ont rapporté la composition chimique des huiles essentielles d'*A. campestris*. D'après Akrouit *et al.* (2001) les constituants les plus abondants sont :  $\beta$ -pinène (24,2- 27,9 %), *p*-cymène (17.4– 22.3%) et  $\alpha$ -pinène (4.1– 11.0%), ces constituants représentent plus de 45 % de l'huile totale. Les feuilles d'*A. campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, et des saponines. (Naili *et al.*, 2010).

## II. 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).

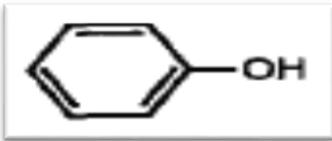
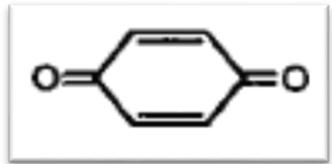
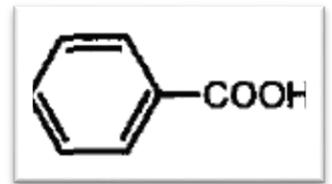
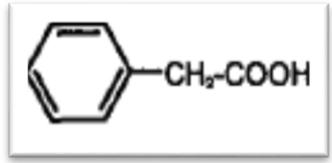
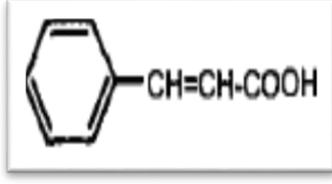
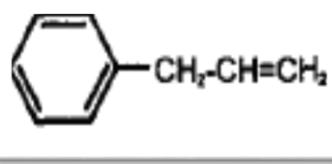
### II.1. Classification

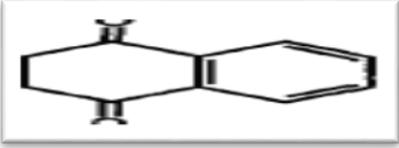
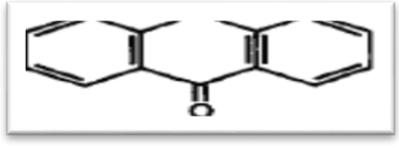
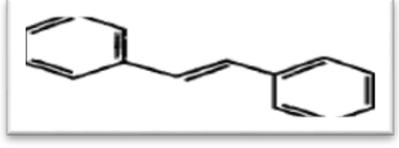
Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999 ; Tapiero *et al.*, 2002). (Tab.1)

## II.1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005).

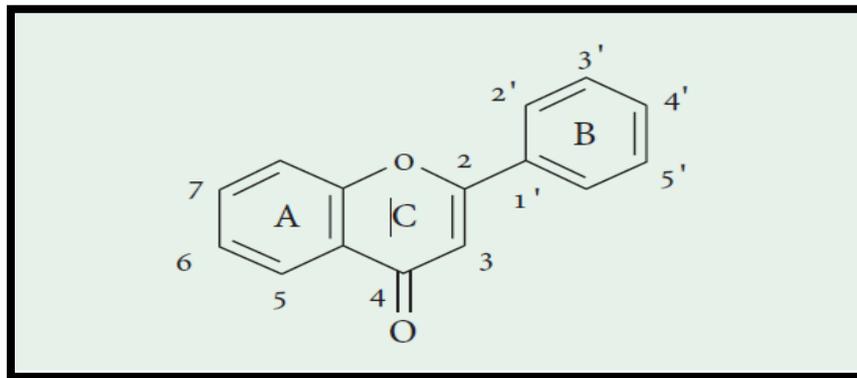
**Tableau I :** Structures chimiques des principales classes de composés phénoliques (Bravo, 1998)

Classe	Squelette carboné	Structure de base
Phénols simples	C <sub>6</sub>	
Benzoquinones	C <sub>6</sub>	
Acides phénoliques	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
Acides phénylacétiques	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Acides hydroxycinnamiques	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Phénylpropènes	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	

Naphtoquinones	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	
Xanthones	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	
Stilbènes	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Flavonoïdes	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	

### II.1.1.1. Structure

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- $\gamma$ -pyrone (Di Carlo *et al.*, 1999) (Fig.2)



**Figure 2** : Structures de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone (Di Carlo, 1999)

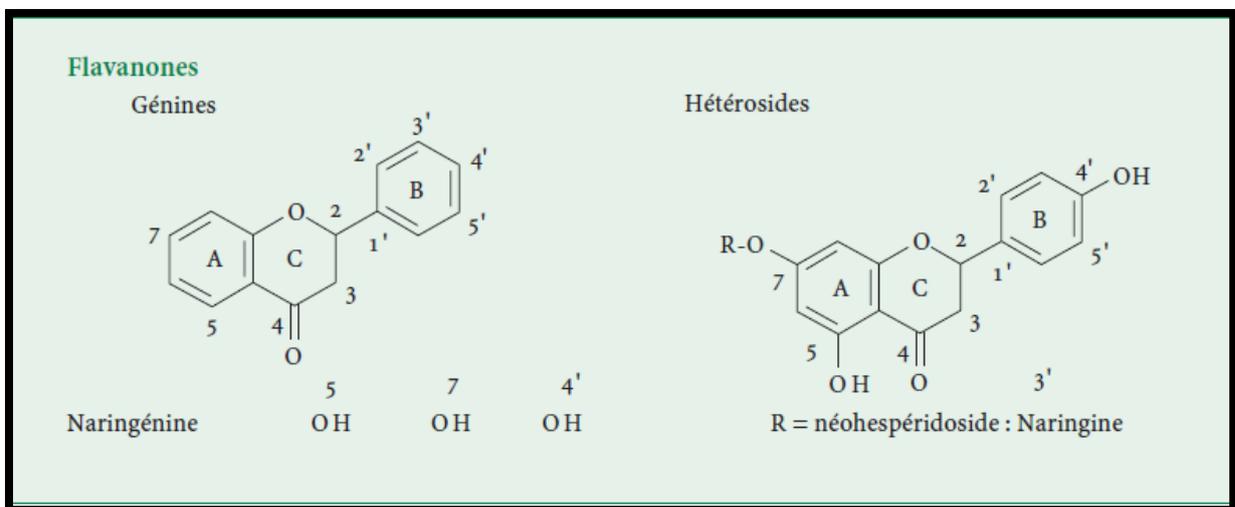
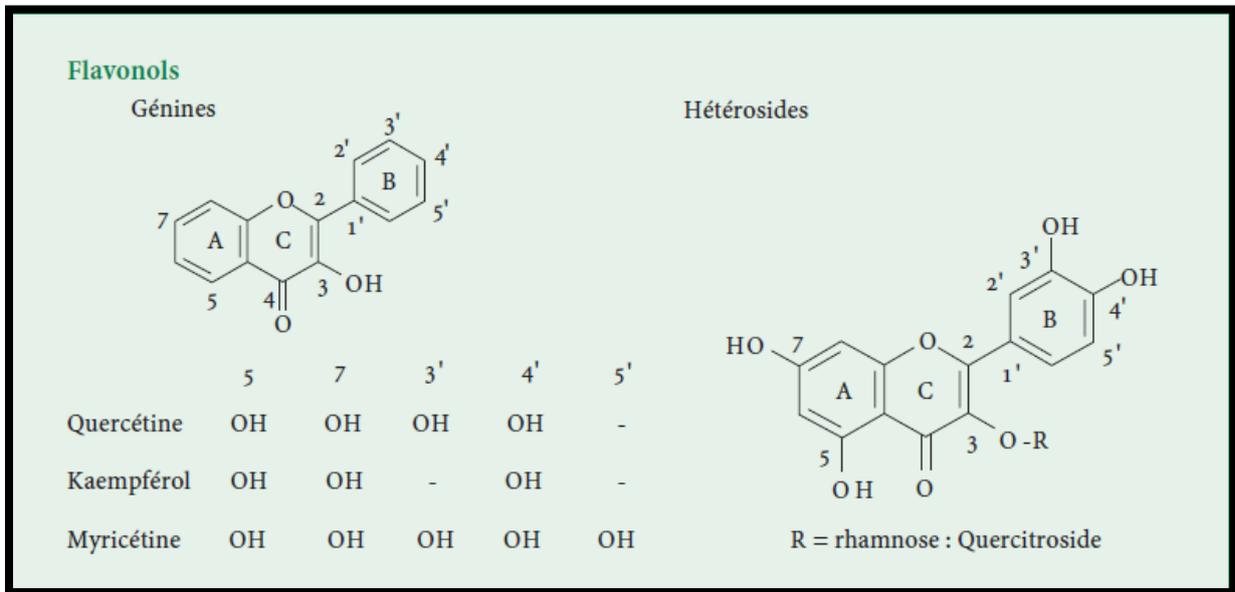
### II.1.1.2. Classification

Selon la nature de l'hétérocycle ( $\gamma$ -pyrone ou son dihydro-dérivé), on distingue :

– les flavones et les flavonols, qui sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine.

– les flavanones, les flavanols et les dihydroflavanols, qui sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de résidus osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques).



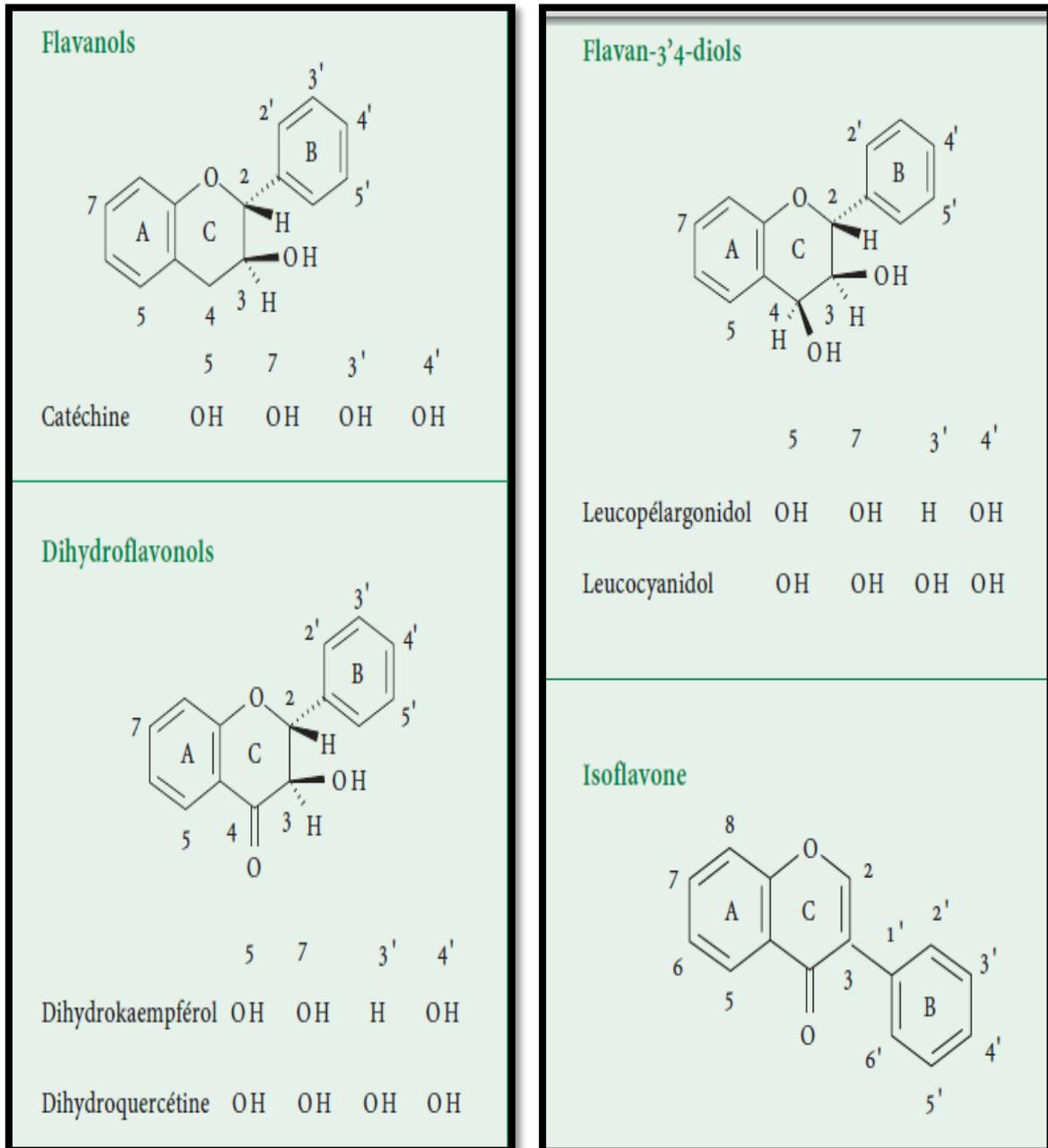


Figure 3 : Différents types structuraux de flavonoïdes (Di Carlo, 1999)

### **III.1. Les radicaux libres**

Un radical libre peut être défini comme toute espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbitale externe (Aruoma, 1994). Une fois que les radicaux se forment, ils peuvent réagir avec un autre radical ou avec une autre molécule par diverses interactions. La vitesse et la sélectivité de ces types de réactions dépendent des fortes concentrations de radicaux, de la délocalisation de l'électron unique du radical (augmentant ainsi sa durée de vie) et de l'absence de liaisons faibles dans les molécules avec lesquelles le radical pourrait interagir (Aruoma, 1998).

### **III.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)**

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont une famille de molécules qui sont générées, transformées et consommées en permanence dans tous les organismes vivants en conséquence de la vie aérobie (Dickinson et Chang, 2011).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie appelés radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

Les radicaux primaires sont des dérivés l'oxygène : l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  et le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$ . D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

### **III.3. Sources d'espèces réactives de l'oxygène**

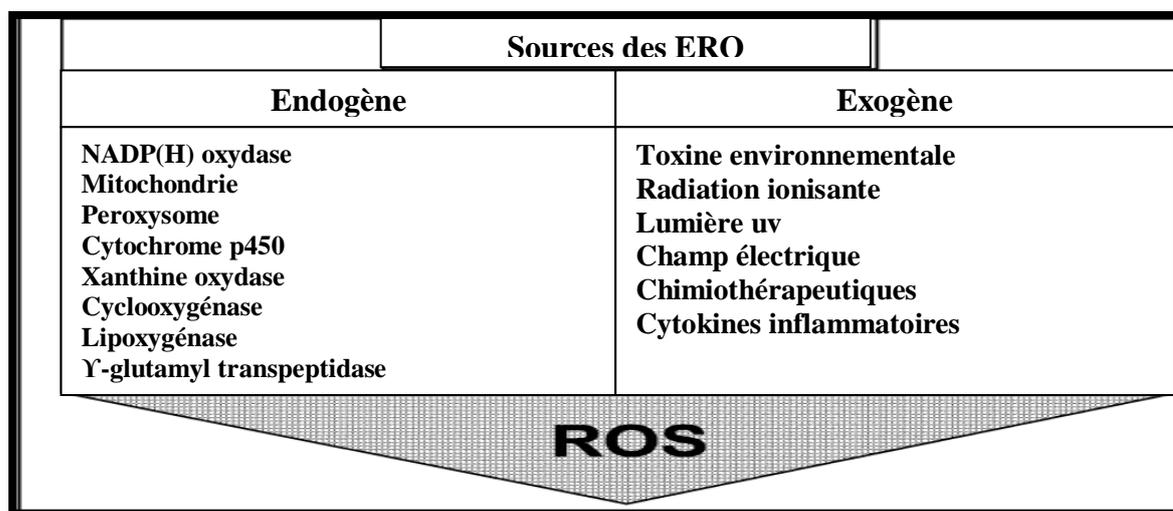
#### **III.3.1. Les sources cellulaires des ERO**

La production des ERO dans les cellules des mammifères est essentiellement d'origine enzymatique et résulte de plusieurs sources : la NAD(P)H oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire sont les principales. D'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires, peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire : xanthine oxydase, enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxygénases, cyclo-oxygénases), enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450) et peroxysomes. Les NO synthases sont, quant à elles,

à l'origine de la synthèse du radical  $\text{NO}^*$ , mais elles peuvent aussi dans certaines conditions (faible concentration en L-arginine ou en cosubstrat réduit, la tétrahydrobioptérine...) produire des anions superoxyde (Beaudeau *et al.*, 2006).

### III.3.2. Les sources exogènes des ERO

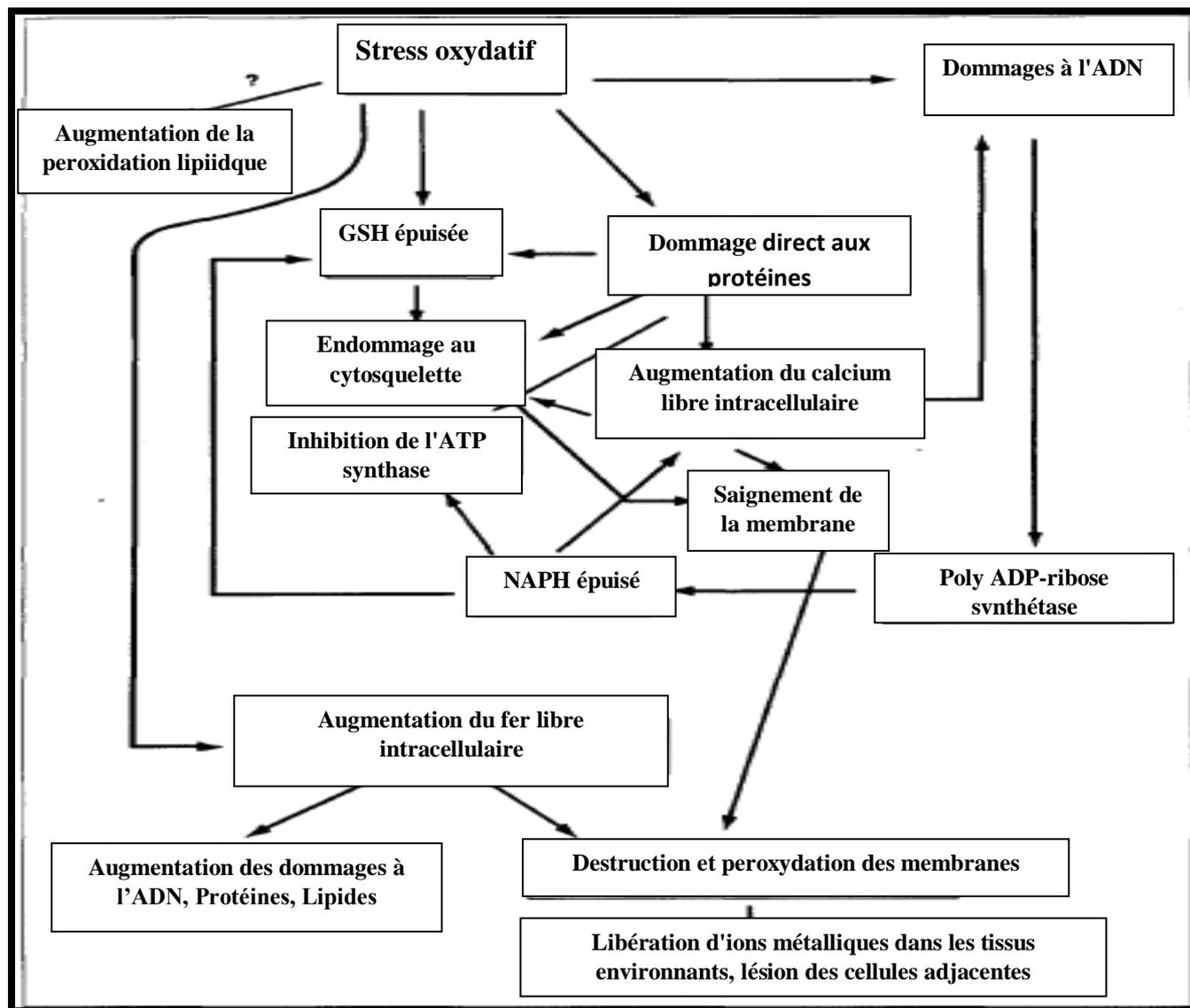
Les sources exogènes des de ROS sont les polluants, la fumée de tabac, les divers stress biotiques et abiotiques, les maladies et les facteurs environnementaux (températures extrêmes, rayonnements ionisants, rayons ultraviolets, toxines, polluants atmosphériques) Boonstra et Post, 2004 ; Scandalios, 2005) (Fig. 4).



**Figure 4** : Sources des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (Sauer *et al.*, 2001).

### III.4. Dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent entraîner des dysfonctionnements métaboliques des cellules, notamment la peroxydation des lipides membranaires, une diminution des nucléotides nicotinamides, une augmentation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  libres intracellulaires, une perturbation du cytosquelette et des dommages à l'ADN (Halliwell *et al.*, 1991) (Fig. 5).



**Figure 5 :** Diagramme illustrant la nature multifactorielle complexe des dommages oxydatifs causés aux cellules (Halliwell, 1991).

### III.5. Le stress oxydant

Le stress oxydant est communément défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue d'EOA, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante (Defraigne et Pincemail, 2008)

### III.6. Maladies liées au stress oxydant

Les dommages oxydatifs causés aux cellules et aux molécules du corps ont été impliqués dans de très nombreuses maladies, y compris les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, et les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, le vieillissement et d'autres maladies (Tab.II) (Jacob *et al.*, 1995 ; Valko *et al.*, 2007).

**Tableau II** : Maladies liées aux dommages oxydatives (Jacob *et al.*, 1995)

<b>Cancer</b>	<b>Pancréatite</b>
<b>L'arthrite et maladies inflammatoires</b>	<b>Maladie inflammatoire de l'intestin et colite</b>
<b>L'athérosclérose</b>	<b>Maladie de Parkinson</b>
<b>L'ischémie/réperfusion</b>	<b>Oxydation des lipoprotéines néonatales</b>
<b>Cataractes</b>	<b>Dysfonctionnement pulmonaire</b>
<b>Diabètes</b>	<b>Lésions cutanées</b>
<b>Maladies rénales</b>	<b>Vieillissement</b>
<b>Scléroses multiples</b>	

### III.7. Les antioxydants

L'exposition à des radicaux libres provenant de diverses sources a conduit les organismes à développer une série de mécanismes de défense pour la protection contre les métabolites réactifs. Un antioxydant, par définition est une substance qui retarde ou empêche de manière significative l'oxydation de substrats oxydables (protéine, lipides, glucides, acide nucléiques) (Valko *et al.*, 2007 ; Dan, 2008). L'organisme possède deux systèmes de défense antioxydant(e)s : le système enzymatique constitué par l'ensemble des enzymes de catalase, superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase et le système non enzymatique incluant des molécule hydrosolubles, tels que le glutathion, la métallothionéine, l'acide ascorbique, l'acide

urique et certaines protéines plasmatiques, ainsi que des molécules liposolubles telles que l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), la bilirubine et l'ubiquinol (Kruidenier et Verspaget, 2002).

### III.7.1. Les antioxydants enzymatiques

#### a) La superoxyde dismutase (SOD)

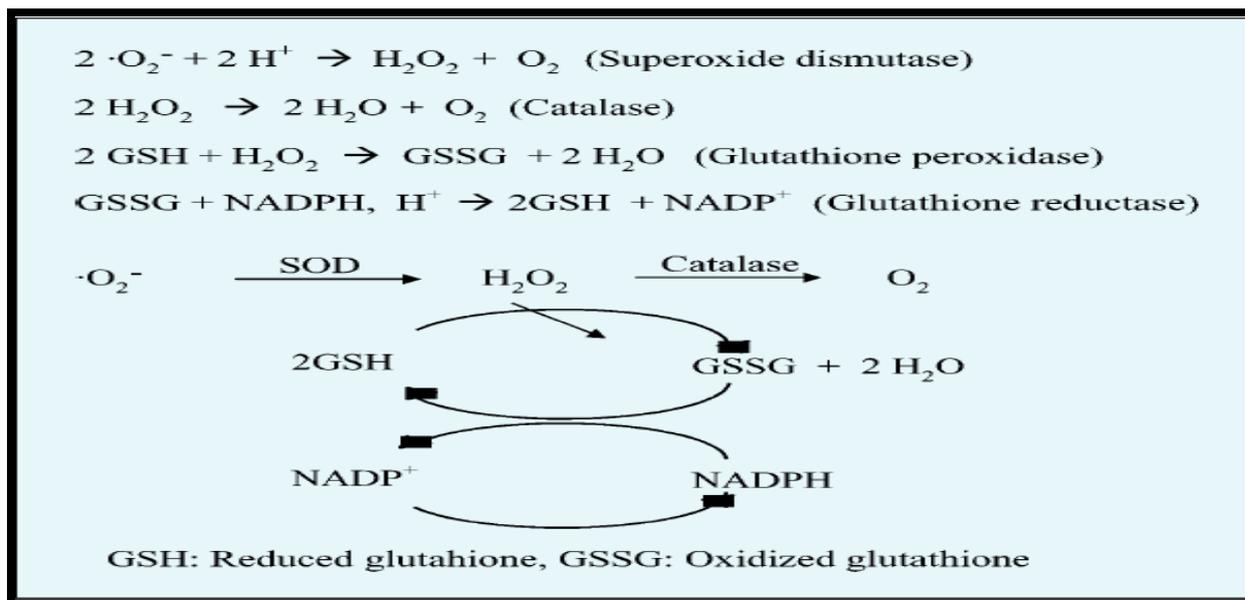
La superoxyde dismutase est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène ( $O_2$ ) (Fig. 6) (Scandalios *et al.*, 2005). Chez les mammifères, il y a 3 isoformes des SOD dont deux isoformes de SOD ayant du cuivre et zinc dans leur centre catalytique (CuZn-SOD ou SOD1) et sont, soit localisées dans des compartiments cytoplasmiques intracellulaires soit sous une forme extracellulaire (EC-SOD ou SOD3), la troisième isoforme de SOD possède du manganèse (Mn) comme cofacteur et elle a été localisée dans les mitochondries des cellules aérobies (Mn-SOD ou SOD2) (Zelko *et al.*, 2002).

#### b) La catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Fig.6) (Matés *et al.*, 1999). Cette enzyme est localisée dans les peroxysomes de nombreux tissus et les hématies (Jenkins *et al.*, 1984 ; Moreno *et al.*, 1995).

#### c) La Glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase est une enzyme qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou des hydroperoxydes organiques en eau ou en alcools en utilisant du glutathion réduit (Fig. 6). Selon leur séquence d'acides aminés, leur spécificité de substrat et leur localisation subcellulaire, la glutathion peroxydase est divisée en six isoformes (Herbette *et al.*, 2007). Cette enzyme est localisée dans le cytosol et dans les mitochondries (Kruidenier et Verspaget, 2002).



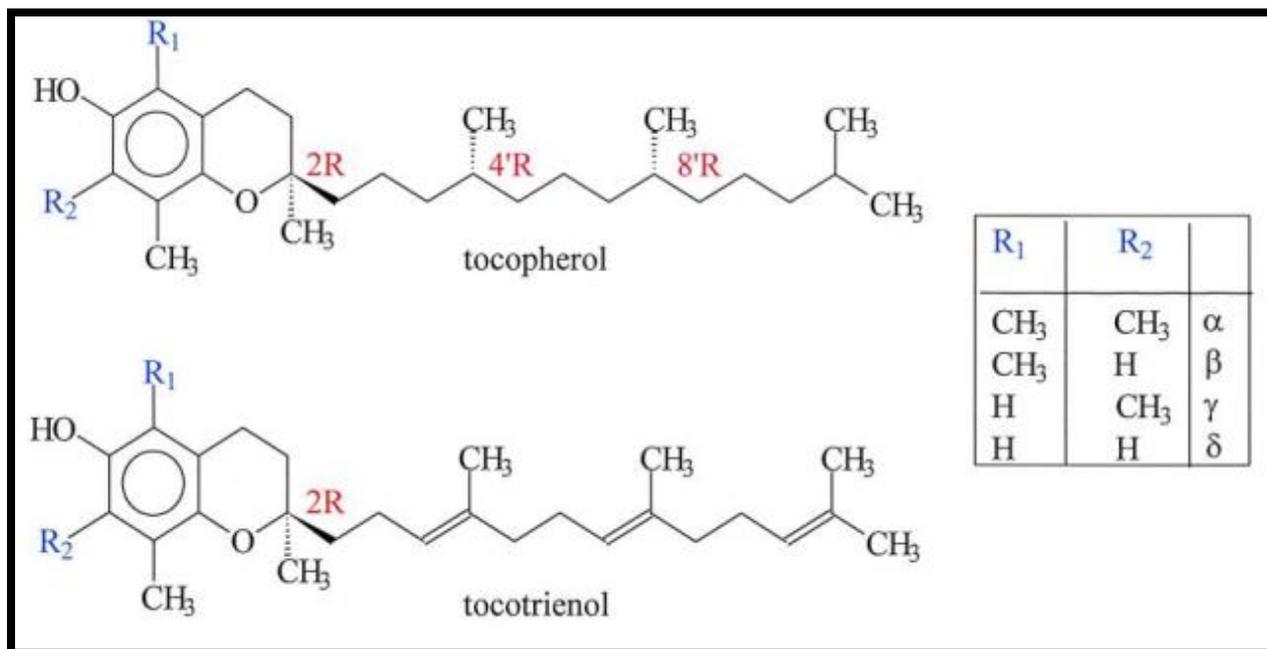
**Figure 6** : Les enzymes antioxydantes et leurs mécanismes de réaction (Lee *et al.*, 2004) ;

### III.7.2. Les antioxydants non enzymatiques

Ce groupe comprend plusieurs composés alimentaires aux propriétés antioxydantes, qui proviennent normalement de sources naturelles telles que les fruits, les légumes et les extraits de plantes (Kruidenier et Verspaget, 2002).

#### a) La vitamine E

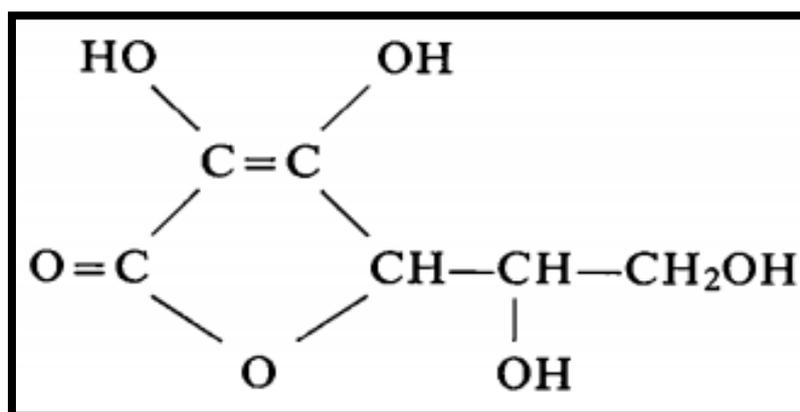
La vitamine E constitue le principal antioxydant liposoluble dans le corps (Herrera et Barbas, 2001). La vitamine E naturelle comprend deux groupes de composés liposolubles étroitement apparentés, les tocophérols et les tocotriénols. En fonction du nombre et de la position des groupes méthyles attachés au cycle aromatique, il existe quatre isomères de tocophérol,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  (Fig.7) (Azzi et Stocker, 2000). La vitamine E joue un rôle scavenger des radicaux oxygène libres et dans la stabilisation des membranes cellulaires, préservant ainsi sa perméabilité (Ognjanović *et al.*, 2003). La vitamine E est présente dans toutes les plantes et il y a une forte corrélation entre sa teneur et la quantité d'acides gras insaturés dans les huiles végétales (Herrera et Barbas, 2001).



**Figure 7 :** Composants naturels de la vitamine E (Azzi et Stocker, 2000).

#### b) La vitamine C (acide ascorbique)

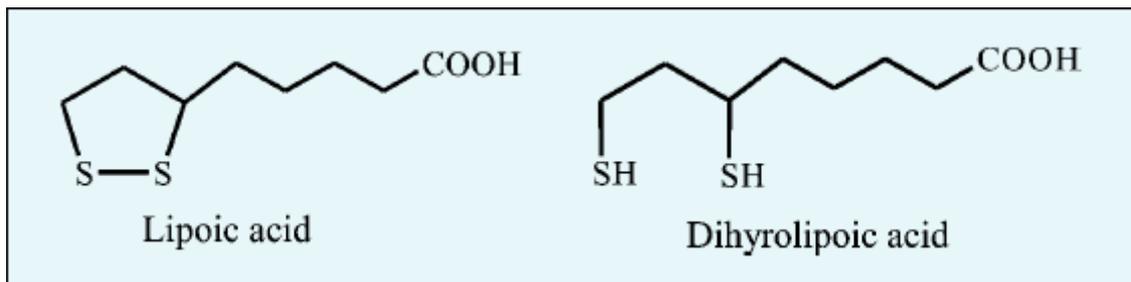
La vitamine C est l'un des antioxydants naturels les plus puissants (Fig. 8), elle se trouve principalement dans les fruits et légumes (Padayatty *et al.*, 2003). Elle est soluble dans l'eau et se trouve en forte concentration dans de nombreux tissus (foie, reins, pancréas et thymus). L'acide ascorbique joue le rôle de scavanger des radicaux de l'anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, l'hydroxyle et l'oxygène singulet comme il est capable de régénérer le tocophérol à partir du radical tocophéryle formé lors de l'inhibition de la peroxydation lipidique par la vitamine E (Stahl et Sies, 1997).



**Figure 8 :** Structure de l'acide ascorbique (Hvoslef, 1967)

**c) Acide lipoïque ((acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque)**

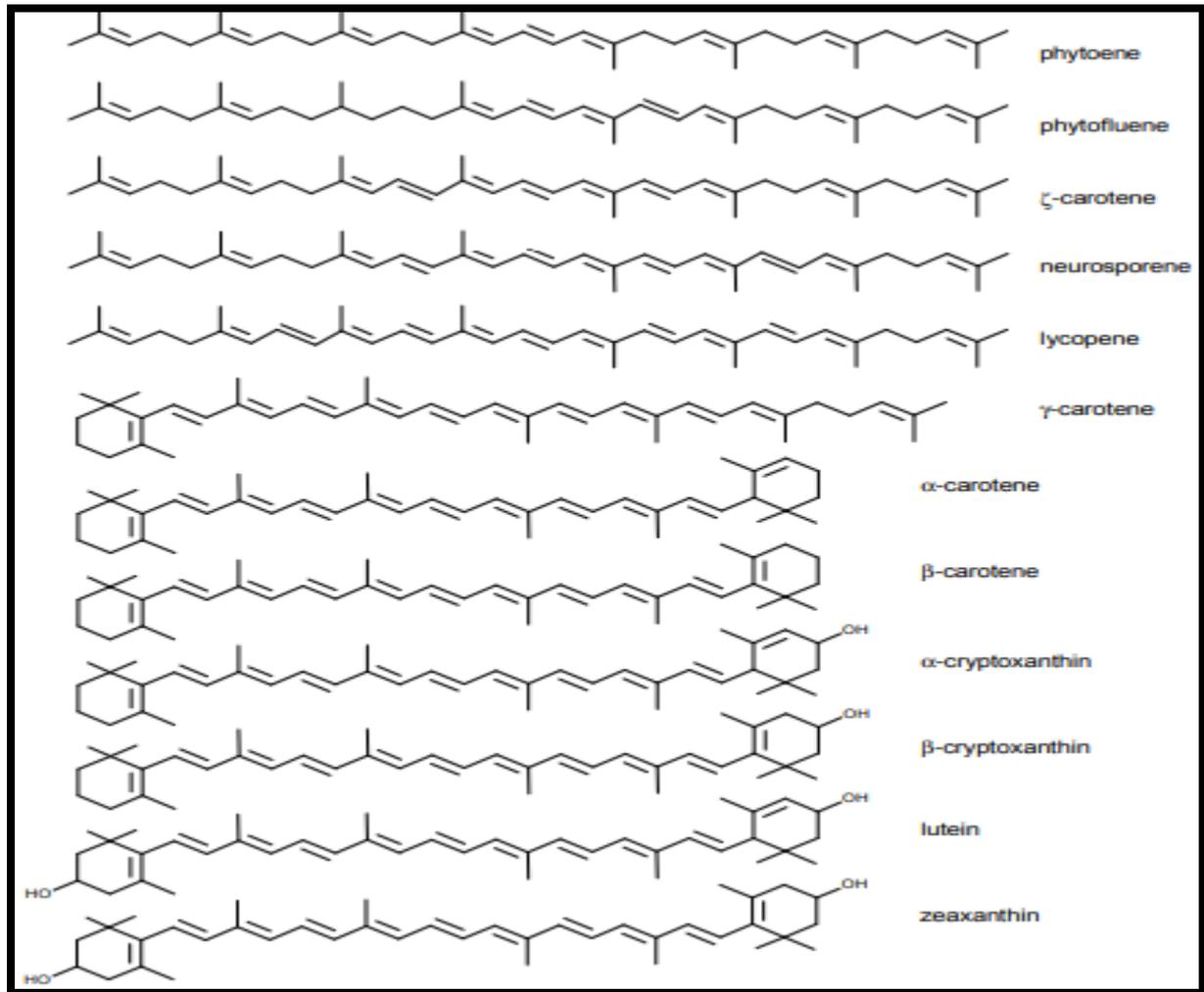
L'acide lipoïque (Fig. 9) est un cofacteur des complexes multienzymatiques qui catalysent la décarboxylation oxydative d'acides  $\alpha$ -cétoniques tels que le pyruvate, le cétooglutarate (Packer *et al.*, 1995). Il est soluble dans l'eau et les solvants organiques. Cette molécule est localisée, dans les membranes cellulaires, les mitochondries, le cytosol et le noyau (Sgherri *et al.*, 2002). L'acide lipoïque s'est avéré hautement actif contre une variété de ERO, il intervient dans le piégeage de : radical hydroxyle, l'acide hypochloreux et l'oxygène singulet (Packer *et al.*, 1995)



**Figure 9** : Structure de l'acide lipoïque (Packer *et al.*, 1995)

**d) Les caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont des pigments naturels, synthétisés par les plantes et les microorganismes et sont responsables des couleurs de divers fruits et légumes. Ce sont des molécules hautement lipophiles, généralement situées à l'intérieur des membranes cellulaires (Paiva *et al.*, 1999 ; Fiedor et Burda 2014). Bien que non synthétisés par l'homme et l'animal, ils sont présents dans le sang et les tissus qui contiennent environ 20 types dont les plus importants sont :  $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -carotène, lycopène, lutéine, zéaxanthine,  $\beta$ -cryptoxanthine,  $\alpha$ -cryptoxanthine,  $\gamma$ -carotène, neurosporène,  $\zeta$ -carotène, phytofluène et phytoène (Fig. 10) (Fiedor et Burda 2014). Les caroténoïdes sont considérés comme antioxydants puissants, ils sont efficaces contre les espèces réactives de l'oxygène telles que l'oxygène singulier, ainsi que des agents de rupture de chaîne radicalaires (Hix *et al.*, 2004)



**Figure 10 :** Structures chimiques des principaux caroténoïdes présents dans le plasma humain. (Fiedor et Burda, 2014)

### e) Le glutathion

Le glutathion réduit est un tripeptide avec un groupe sulfhydryle actif, il peut agir sur plusieurs niveaux de défense antioxydante. En plus de sa fonction en tant que substrat pour l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase, le glutathion sert de piègeur de plusieurs espèces réactives de l'oxygène, y compris l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle  $OH \cdot$ , peroxynitrite et les hydroperoxydes lipidiques (Kruidenier et Verspaget, 2002).

### f) Les polyphénols

Les composés phénoliques présentent sont des composés doués de nombreuses propriétés physiologiques, telles que les propriétés anti-allergènes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et antioxydantes (Balasundram *et al.*, 2006).

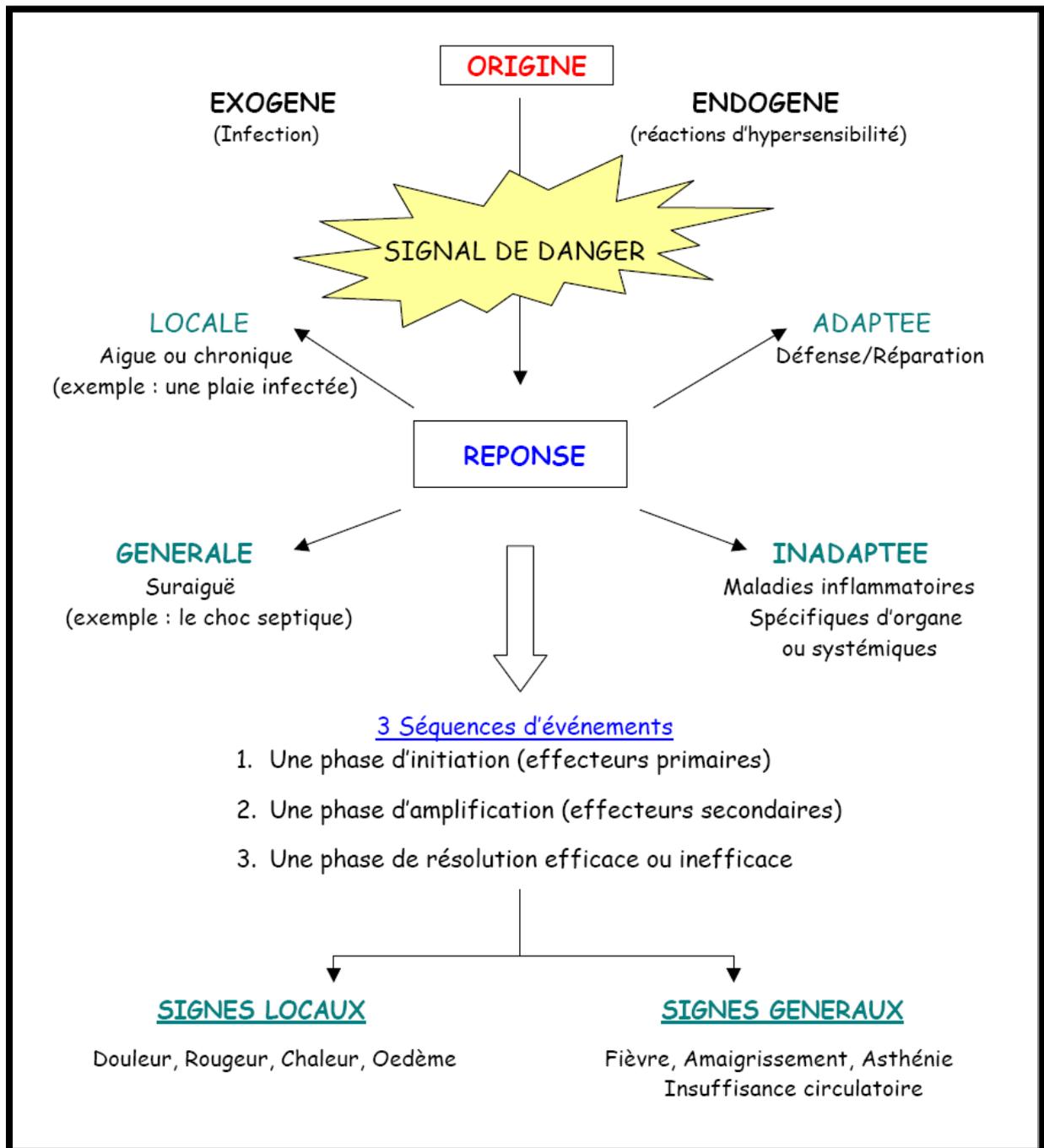
Les flavonoïdes possèdent une puissante activité antioxydante *in vitro*, ils sont capables de piéger une large gamme d'espèces réactives d'oxygène, d'azote et de chlore par la chélation des ions métalliques (Halliwell, 2008).

**IV.1. L'inflammation**

La réaction inflammatoire est un processus de défense immunitaire de l'organisme en réponse à une agression ayant pour origine des éléments physiques : chaleur, froid, rayonnements ionisants... ou des éléments solides exogènes ou endogènes : pathogènes microbiens, piqûre d'insecte, produits chimiques ou biologiques, composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques, cytokines...) (Fig. 12) (Széles *et al.*, 2007 ; Kang *et al.*, 2011).

La réaction inflammatoire apparaît comme une perturbation tissulaire, généralement passagère, obéissant une séquence immuable de phénomènes humoraux, cellulaires et intercellulaires. Ce qui varie en fonction de la cause, ou encore de la localisation, ou encore de l'état du patient, c'est la prépondérance de telle ou telle des phases de cette séquence (Engler, 1993).

La réaction inflammatoire est caractérisée par les signes cardinaux : rougeur, gonflement, chaleur, douleur et perte de fonction (Iwalewa *et al.*, 2007).



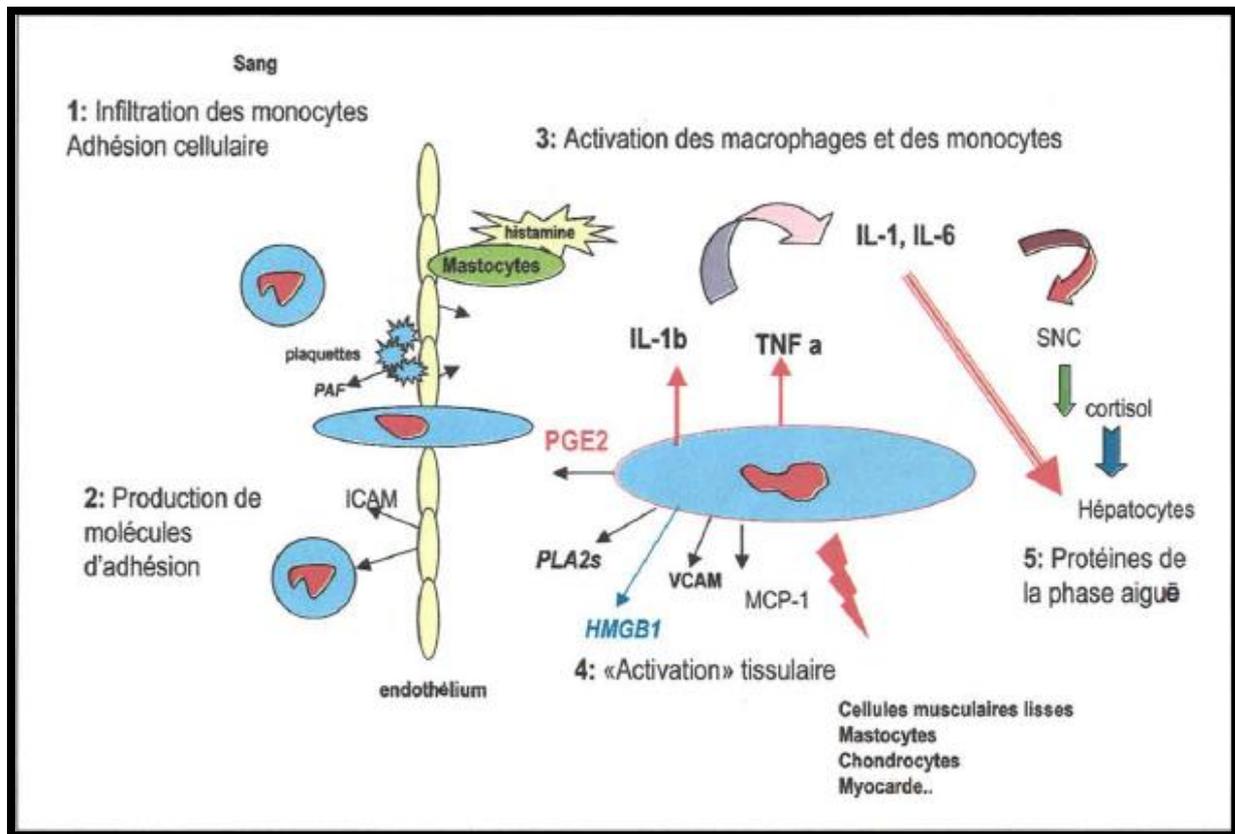
**Figure 11** : La réaction inflammatoire schématisée (Zerbato, 2010)

#### IV.2. Les phases de l'inflammation

Le phénomène inflammatoire se décompose en deux phases principales : l'initiation et la progression (Fig. 13). La phase d'initiation est induite par les cellules infectées par les virus ou les bactéries, par la présence de corps étrangers ou l'accumulation de molécules toxiques (radicaux, lipides, cholestérol...). Les premières réactions libèrent des messages qui diffusent en induisant des signaux de mort cellulaire voire de nécrose. Les cibles cellulaires sont les

cellules endothéliales qui adoptent un changement morphologique par chimiotactisme laissant infiltrer des cellules du plasma sanguin.

La phase de progression de l'inflammation périphérique se caractérise en effet par une activation des terminaisons nerveuses qui provoque une vasodilatation facilitant la diffusion des molécules dans l'espace extracellulaire (Raymondjean, 2007).



**Figure 12** : Enchaînement des étapes de la réaction inflammatoire (Raymondjean, 2007).

### IV.3. Les médiateurs de l'inflammation

Les inducteurs de l'inflammation déclenchent la production de nombreux médiateurs inflammatoires, qui altèrent à leur tour la fonctionnalité de nombreux tissus et organes, ces médiateurs inflammatoires ont des effets communs sur le système vasculaire et sur le recrutement des leucocytes. On distingue les médiateurs dérivés de protéines plasmatiques et les médiateurs sécrétés par des cellules (Medzhitov, 2008).

Les médiateurs cellulaires peuvent être produits par des leucocytes spécialisés (en particulier des macrophages résidents et des mastocytes) ou par des cellules présentes dans les tissus locaux (Medzhitov, 2008).

Certains médiateurs (tels que l'histamine et la sérotonine) sont préformés et stockés dans les granules de mastocytes, de basophiles et de plaquettes, d'autres sont préformés et circulent dans le plasma en tant que précurseurs inactifs. La concentration plasmatique de ces médiateurs peut augmenter considérablement en raison de la sécrétion accrue des précurseurs par les hépatocytes au cours de la réponse en phase aiguë. D'autres médiateurs sont produits directement en réponse à une stimulation appropriée par des inducteurs d'inflammation (Medzhitov, 2008).

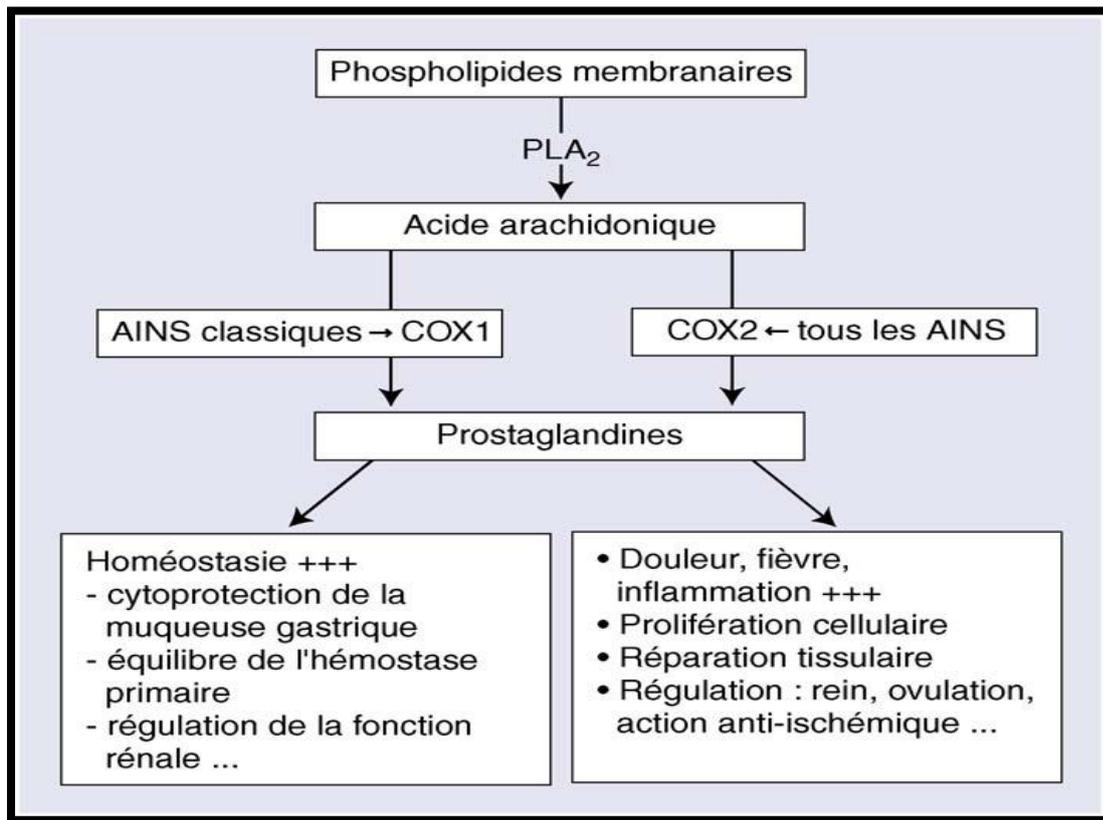
Les médiateurs inflammatoires peuvent être classés en sept groupes en fonction de leurs propriétés biochimiques : amines vasoactives, peptides vasoactifs, fragments de composants du complément, médiateurs lipidiques, cytokines, chimiokines et enzymes protéolytiques (Medzhitov, 2008).

#### **IV.4. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments symptomatiques actifs sur la fièvre, les douleurs par excès de nociception et la composante vasculaire de la réaction inflammatoire.

La plupart des anti-inflammatoires non stéroïdiens sont des inhibiteurs des deux enzymes COX1 et COX2 avec une puissance d'inhibition variable selon la molécule anti inflammatoire (Fig. 14).

La puissance de leur action antiinflammatoire est liée à la puissance d'inhibition de l'enzyme COX2. Inversement, la majorité de leurs effets indésirables est due à l'inhibition de l'enzyme COX1 (Guillonnet et Jacqz-Aigrain, 1997 ; Bannwarth, 2005).



**Figure 13** : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS (Bannwarth, 2005).

#### IV.5. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (A.I.S) ou corticoïdes

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes de synthèse permettent d'obtenir une meilleure activité anti-inflammatoire et la dissociation entre les effets anti-inflammatoires et les effets physiologiques cortisoliques (Faure, 2009).

L'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes s'exerce lorsqu'un tissu est sujet à l'inflammation, donc dans des conditions pathologiques. Les glucocorticoïdes peuvent inhiber toutes les étapes de la réaction inflammatoire aussi bien précoces que tardives. Ils contrôlent ainsi les différents stades de l'inflammation : la vasodilatation, l'œdème, la migration des leucocytes, le stress oxydatif, la phagocytose. Ils inhibent l'activation de la phospholipase A2, la production des médiateurs de l'inflammation (prostaglandines, leucotriènes et **PAF-acéther**), des radicaux libres, de l'oxyde nitrique (NO) (Dejean et Richard, 2013).

**IV.6. Anti-inflammatoire d'origine végétale**

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal. Les composés phénoliques peuvent exercer une action modulatrice sur les cellules en interagissant avec un large spectre de cibles moléculaires essentielles au mécanisme de signalisation cellulaire. Les mécanismes moléculaires impliqués dans les activités anti-inflammatoires des polyphénols ont également été suggérés, notamment : l'inhibition des enzymes pro-inflammatoires comme la cyclooxygénase (COX-2), lipoxygénase (LOX), oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Santangelo *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont prouvé que les flavonoïdes possédaient une activité anti-inflammatoire. Les flavonoïdes pourraient réguler les activités cellulaires des cellules liées à l'inflammation comme les : mastocytes, macrophages, lymphocytes et les neutrophiles, de même certains d'entre eux inhibent la libération d'histamine des mastocytes, et d'autres inhibent la prolifération des lymphocytes T. En outre, certains flavonoïdes modulent les activités enzymatiques de la voie des enzymes métabolisant l'acide arachidonique (AA), telles que la phospholipase A2 (PLA2), la cyclooxygénase (COX), la lipoxygénase (LOX) et l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Kim *et al.*, 2004).

**MATERIEL ET  
METHODES**

## **I. Matériel et méthodes**

- **Matériel végétal**

Les parties aériennes d'*Artemisia campestris* ont été récoltées au mois de Novembre 2015 au stade végétatif dans les régions d'Oum el-Bouaghi et Boussaâda. L'identification a été faite par Pr. Belhettab (université Sétif 1), Après la récolte, Elles ont été nettoyées et mises à sécher à l'abri de l'humidité à température ambiante et à l'ombre dans un endroit aéré puis coupées grossièrement et conservées dans des sacs en papier jusqu'à utilisation.

## **II. Méthodes d'analyse**

### **II.1. Extraction**

#### **II.1.1. Préparations de l'extrait méthanolique**

L'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est préparé selon la méthode décrite par Khettaf *et al.*, (2016). Une quantité de 10 g de la partie aérienne est mise à macérer dans 100 mL de méthanol avec agitation pendant 24 heures, à l'ombre et à température ambiante ensuite le mélange est filtré sur la gaze et une deuxième fois sur papier filtre. L'opération est répétée une seconde fois sur le marc. Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif "HEIDOLPH" à une température de 40-50 °C permettant d'obtenir un extrait brut méthanolique (EMOH).

#### **II.1.2. Préparations de l'extrait aqueux**

L'extrait aqueux est obtenu par décoction de 10g de broyat de la partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) dans 100 mL d'eau distillée pendant 10 min sous agitation magnétique. La solution est laissée reposer sur la plaque chauffante pendant 15 minutes, le mélange est d'abord filtré sur une gaze et ensuite sur papier Whatmann N°1.

Après filtration, la solution obtenue est lyophilisée (lyophilisateur de type Christ) pour obtenir une poudre de couleur jaune claire (Sefi *et al.*, 2012 ; Moualek *et al.*, 2016 ; (Belhettab *et al.*, 2004).

#### **II.1.3. Calcul du rendement**

Le rendement représente le rapport entre le poids de l'extrait et le poids sec de la plante.

## **II.2. Etude phytochimique des extraits**

Dans le but de caractériser les extraits d'*Artemisia campestris*, des analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées.

### **II.2.1. Screening phytochimique**

Les analyses qualitatives permettent de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques (alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, anthocyanes, saponosides) dans les extraits.

#### **II.2.1.1. Mise en évidence des flavonoïdes**

La recherche des flavonoïdes débute par une macération de 10g de la plante pulvérisée dans 150mL d'acide chlorhydrique (HCl 1%), pendant 2 heures. Après filtration, on récupère 10mL du filtrat auquel on ajoute une solution basique d'ammoniac (NH<sub>4</sub>OH), après 3heures, l'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes (Harborne, 1998).

#### **II.2.1.2. Mise en évidence des tanins**

1 ml d'une solution de Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) à 1% est ajouté à un volume de 5 ml de l'infusé. La couleur vire au bleu noir en présence des tanins galliques, et au bleu verdâtre en présence des tanins catéchiques (Razafindrambao, 1973).

#### **II.2.1.3. Mise en évidence des saponines**

Une masse de 2 g du matériel végétal sec broyé est mis en décoction avec 100 mL d'eau pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, le volume est complété à 100 mL. À partir de cette solution mère, 10 tubes contenant des volumes de : 1, 2, ... 10 mL, sont complétés à 10 mL avec de l'eau distillée. Chacun des tubes est agité vigoureusement en position horizontale. Après 15 min de repos en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Le tube dans lequel la hauteur de la mousse est de plus de 1cm indique la présence de saponosides (Razafindrambao, 1973).

#### **II.2.1.4. Mise en évidence des alcaloïdes**

Après macération de 5g du broyat dans 50 mL d'HCl à 1 %, la solution obtenue est filtrée. Quelques gouttes de réactif de Mayer lui sont ajoutées. La formation d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes (Bouquet, 1972).

### II.2.1.5. Mise en évidence des anthocyanes

La recherche des anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10% avec le changement de pH. On ajoute quelques gouttes d'HCl, puis d'ammoniac ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), le changement de couleur indique la présence des anthocyanes (Razafindrambao, 1973).

## II.2.2. Analyses quantitatives

### II.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des extraits aqueux et méthanolique d'*Artemisia campestris* est déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999).

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. C'est une technique basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture : phosphotungstique phosphomolibdique du réactif conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue (oxyde de tungstène et de molybdène). Ces derniers présentent un spectre d'absorption à 765 nm (Ikawa *et al.*, 2003 ; Everette *et al.*, 2010).

- **Mode opératoire**

Un volume de 200  $\mu\text{L}$  des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 4 min, 800  $\mu\text{L}$  de carbonates de sodium (7,5%) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir 2 heures à température ambiante, puis la lecture est faite à 765 nm. L'acide gallique (0- 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) est utilisé comme standard pour établir la courbe d'étalonnage. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage ; elle est exprimée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait).

### II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (Bahorun *et al.*, 1996).

- **Mode opératoire**

Un millilitre de la solution méthanolique de trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  (2 %) est ajouté à 1 mL de la solution de l'échantillon (extraits ou standard) à différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm (Kosalec *et al.*, 2004).

Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

La quantité des flavonoïdes contenus dans l'extrait est calculée à l'aide d'une gamme d'étalonnage en utilisant la quercétine comme standard. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ )

### **II.2.2.3. Dosage des flavones et flavonols**

La teneur en flavones et flavonols des différents extraits est estimée selon la méthode de Kosalec *et al.*, (2004).

- **Mode opératoire**

Un volume de 0.5 mL de différents extraits de la partie aérienne d'*A. campestris* est additionné à 1.5mL d'éthanol. Après agitation, 0.1mL d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 % et 0.1 mL d'acétate de sodium ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) et enfin 2.8mL d'eau distillée sont ajoutés. Le mélange est laissé réagir pendant 30 min puis la lecture est faite à 415 nm. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

La concentration des flavones et flavonols contenus dans les extraits d'*A.campestris* est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

### **II.2.2.4. Dosage des tanins**

Le dosage des tanins condensés est réalisé pour les différents extraits selon la méthode de Julkunen- Titto (1985) avec quelques modifications.

La méthode de vanilline dépend de réaction de la vanilline avec les tanins condensés pour produire un complexe coloré qui absorbe à 500nm (Schofield *et al.*, 2001).

- **Mode opératoire**

À 50  $\mu\text{L}$  d'échantillon ou de standard est ajouté 1.5mL de la solution de vanilline (4% dans le méthanol) et 1,5 mL de HCl concentré. Après 15 minutes de réaction, l'absorption est lue à 500 nm. La concentration des tanins est déduite à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la catéchine et est exprimées en microgrammes d'équivalents de catéchine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EC/mg d'extrait}$ ). Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

### II.3. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC Q-TOF/ MS)

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC-TOF/MS) des extraits d'*Artemisia campestris* a été réalisée par la méthode de Koldes *et al.* (2015).

Les composés phénoliques des extraits de la plante ont été quantifiés en utilisant un système HPLC de type Agilent 1260 couplé à un détecteur de temps de vol TOF- MS de type Agilent 6200 et une colonne (100mm× 4.5mm x 3.5 µm) de type Agilent ZORBAX Eclipse XDC18 (Agilent Technologies, SantaClara, Calif).

Les phases mobiles sont : la phase A composée d'eau/acide formique 1mL L<sup>-1</sup> et la phase B qui comporte le méthanol/acide formique 1mL L<sup>-1</sup>. Le débit était de 0,2 mL/min, la température de la colonne était de 25 °C et le volume d'injection était 10 µL. Le programme d'élution était: 0 à 10 min 50% de B; 10 à 20 min 65% B; 20 à 30 min 85% B. Le mode d'ionisation de l'instrument HPLC-TOF / MS était positif et fonctionnait avec une température de gaz d'azote de 325 °C, un débit d'azote gazeux de 10,0 µLmin<sup>-1</sup>, nébuliseur de 30 psi, et enfin, le voltage de fragmentateur de 175 V.

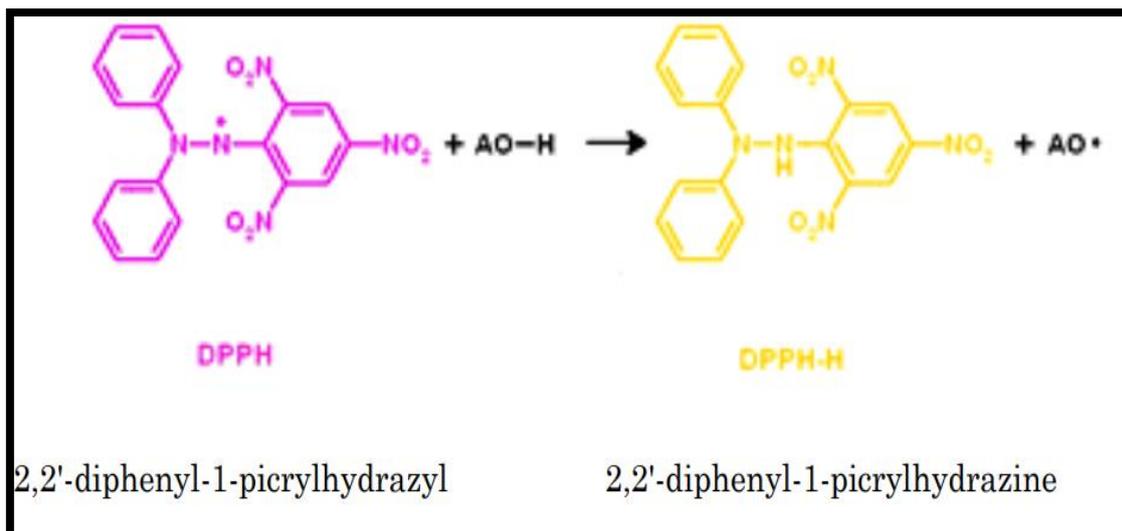
Pour l'analyse des échantillons, des extraits bruts (10mg/mL) ont été dissous dans le méthanol à température ambiante..

### II.4. Évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits *in vitro*

#### II.4.1. Test de DPPH

L'activité antiradicalaire des différents extraits, est évaluée par le test de piègeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH\*); elle est réalisée en utilisant la méthode décrite par Oliveira *et al.*, 2007, avec des modifications.

La molécule de DPPH est considérée comme un radical stable grâce à la délocalisation de l'électron dans la molécule ; cette dernière donne une couleur violette profonde caractérisée par une bande d'absorption à 517 nm. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à celle d'une substance capable de donner un atome d'hydrogène, il en résulte une forme réduite (diphénylpicrylhydrazine), avec perte de couleur violette (Bouhlel *et al.*, 2007). Le degré de décoloration indique le potentiel de récupération des composés antioxydants (Fig. 15) (Nyau *et al.*, 2015)



**Figure 14** : l'interaction anti-oxydante dans le test de DPPH (Thabit *et al.*, 2014).

- **Mode opératoire**

Un volume de 1,5 mL de la solution méthanolique de DPPH (0.1mM) est mélangé avec un volume équivalent de 1,5 mL des solutions d'extraits ou d'extraits standards (BHA, Vitamine C, quercétine) à différentes concentrations. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant.

Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

L'activité antiradicalaire des extraits et standards est exprimée en pourcentage de DPPH réduit selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

#### II.4.2. Pouvoir anti-oxydant réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique d'*A.campestris* est déterminé selon la méthode de Oliveira *et al.*, (2007).

- **Principe**

Dans cette méthode, à un pH faible et à une température égale à 37°C les réducteurs des extraits de plantes entraînent la réduction du fer ferrique (Fe<sup>+3</sup>) présent dans le complexe ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>). La réaction est révélée par la couleur bleu du fer ferreux

(Fe<sup>+2</sup>). La valeur de l'absorbance mesurée à 593 nm est proportionnelle au pouvoir réducteur des antioxydants présents dans l'échantillon (Ou *et al.*, 2002).

- **Mode opératoire**

Différentes concentrations d'extraits ou d'antioxydant standard (BHA) sont mélangées avec 2,5 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 2,5 mL de ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite, sont ajoutés 2,5 mL d'acide trichlore acétique TCA (10%), et le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes.

Après centrifugation, 2.5 mL de la phase supérieure sont récupérés par aspiration et mélangés avec 2.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de FeCl<sub>3</sub> (0.1 %). L'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf le FeCl<sub>3</sub>. Le contrôle est préparé extemporanément de la même manière sauf que l'échantillon est remplacé par un volume équivalent de méthanol pour l'extrait méthanolique et d'eau distillée pour l'extrait aqueux.

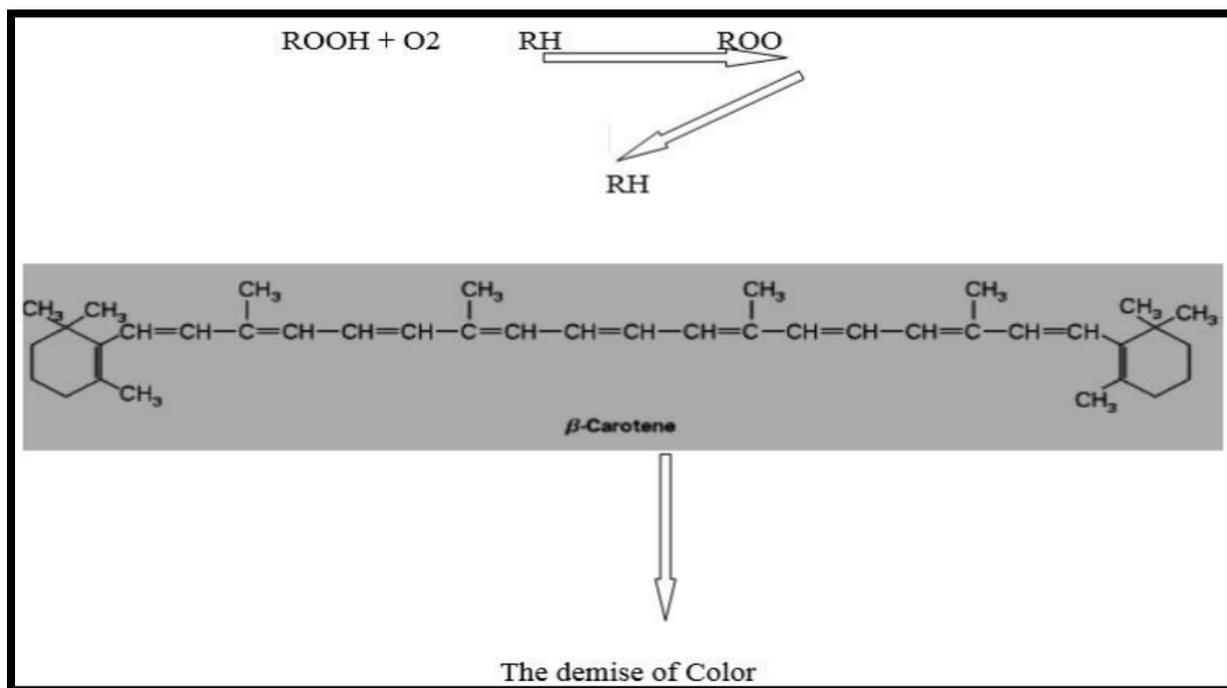
EC<sub>50</sub> est la concentration d'extrait qui correspond à une valeur d'absorbance de 0,5. Elle est déterminée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration d'extrait enregistré à 700 nm. Le BHA est utilisés comme composés de référence.

#### **II.4.3. Test de blanchissement du β-carotène (BCB)**

La capacité des extraits aqueux et méthanolique d'*A.campestris* de prévenir le blanchissement du β-carotène est déterminée selon la méthode décrite par Shon *et al.*, (2007).

- **Principe**

Cette méthode est généralement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des composés dans les émulsions, accompagnée de l'oxydation couplée du β-carotène et de l'acide linoléique. Dans le test de blanchissement du β-carotène l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres de peroxydes en raison de l'extraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylènes diallyliques de l'acide linoléique entraînant ainsi la disparition de sa couleur (Thabit *et al.*, 2014).



**Figure 15 :** Mécanisme réactionnel au cours du test de blanchissement du β-carotène (BCB) (Thabit *et al.*, 2014).

- **Mode opératoire**

Une émulsion β-carotène/ acide linoléique a été préparée par solubilisation de 2 mg de β-carotène dans 1 mL de chloroforme, ensuite 25 μL d'acide linoléique et 200 μL de tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur et 100 mL d'eau enrichie d'oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

Le milieu réactionnel contient 2.5 mL de l'émulsion de β-carotène/acide linoléique et 350 μL des solutions d'extraits ou d'un antioxydant de référence (BHA). Le mélange est placé dans un bain-marie et incubé à 50°C pendant 2 heures. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490 nm juste après sa préparation (t = 0 min) et à des intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h, et 48h). Le contrôle négatif contient 350 μL d'eau distillée à la place de l'extrait aqueux, et de 350 μL mL de méthanol à la place de l'extrait méthanolique et des antioxydants standards.

L'activité antioxydante (AA%) est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle négatif. L'activité anti-oxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}_{48\text{h}}(\text{échantillon})/\text{Abs}_{48\text{h}}(\text{BHA})] \times 100.$$

#### II.4.4. Activité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prieto *et al.*, (1999).

- **Principe**

Cette méthode est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène Mo (V)  $\text{MoO}^{2+}$  en présence de l'antioxydant pour former un complexe vert de phosphate dans un milieu acide (Prieto *et al.*, 1999).

- **Mode opératoire**

Un volume de 0.2 mL d'extrait est mélangé avec 3 mL de la solution (acide sulfurique 0.6 M, phosphate de sodium ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) 28 mM et molybdate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ) 4 mM), ensuite les tubes sont incubés pendant 90 min à la température de 95°C. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc correspondant qui est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La même opération est effectuée pour l'acide ascorbique à différentes concentrations.

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g extrait).

Toutes les manipulations sont faites en duplicata.

#### II.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de nitrite

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité anti inflammatoire des extraits d'*Artemisia campestris* est celle basée sur la quantification des nitrites. En effet, le test utilisé pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire consiste à déterminer la capacité des extraits à inhiber la production de monoxyde d'azote (NO) dans les macrophages activés par le lipopolysaccharide (LPS). Le monoxyde d'azote libéré par les cellules peut être détecté et quantifié spectrophotométriquement (Paul *et al.*, 1997).

Toutes les lignées cellulaires de macrophages RAW 264.7 ont été cultivées et entretenues au Laboratoire de recherche biomédicale (CIBM) de l'Université de Grenade (Grenade, Espagne).

### **II.5.1. Mise en culture des cellules**

Les lignées cellulaires de macrophages RAW 264.7 ont été cultivées à 37 °C dans une chambre humidifiée avec 5% de CO<sub>2</sub> dans des flacons 75 cm<sup>2</sup> de culture tissulaire, dans un milieu supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de pénicilline et 1% de la streptomycine (Yoon *et al.*, 2009).

### **II.5.2. Récolte des cellules**

Une fois à confluence les cellules cessent de se multiplier. Il convient alors de les récolter afin de pouvoir les utiliser. Pour cela, nous effectuons trois lavages avec un tampon phosphate (PBS) afin d'éliminer le SVF et les débris cellulaires qui pourraient interférer avec l'action de la trypsine. Un pré-contact avec 1 mL de trypsine –EDTA suivi d'une incubation de 5 minutes à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub> avec là encore 1 mL de trypsine–EDTA permet la dissociation des cellules du tapis par digestion enzymatique partielle des protéines d'adhésion des cellules. La dissociation et l'individualisation des cellules sont vérifiées au microscope inversé. L'ajout de 32 mL de milieu de culture approprié permet d'obtenir une suspension cellulaire en milieu de culture supplémenté à 10% de SVF au final.

La suspension cellulaire est alors prête à être utilisée pour l'ensemencement de plaques de culture 96 puits et mises dans l'incubateur pendant 48 h (MacKenzie *et al.*, 2002).

### **II.5.3. Détermination de la production de l'oxyde nitrique (NO)**

Les cellules de macrophages RAW 264.7 ont été cultivées avec des concentrations croissantes des extraits d'*Artemisia campestris* et de lipopolysaccharide (LPS : 100 ng/ mL). Après 24 heures d'incubation, le surnageant a été recueilli. L'accumulation de nitrite dans le surnageant a été déterminée par le test Griess.

En bref, 100 µL de milieu de culture cellulaire ont été mélangés avec 100 µL de réactif Griess (1% de sulfanilamide et 0,1% de dichlorhydrate de naphthyléthylènediamine dans 2,5% d'acide phosphorique), le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 minutes et l'absorbance a été mesuré à 550 nm dans un lecteur de microplaques de type MRX ete Dynexmicroplate reader (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Un milieu de culture frais a été utilisé comme blanc dans chaque expérience (Heo *et al.*, 2010 ; Bribi *et al.*, 2015).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la production de NO selon la formule suivante (Kassim *et al.*, 2010) :

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times ([\text{NO}_2]_{\text{Control}} - [\text{NO}_2]_{\text{Extrait}}) / ([\text{NO}_2]_{\text{Control}})$$

$[\text{NO}_2]_{\text{Control}}$ : concentration de nitrite produit en absence d'extrait

$[\text{NO}_2]_{\text{Extrait}}$  : concentration de nitrite produit en présence d'extrait.

#### II.5.4. Test de cytotoxicité

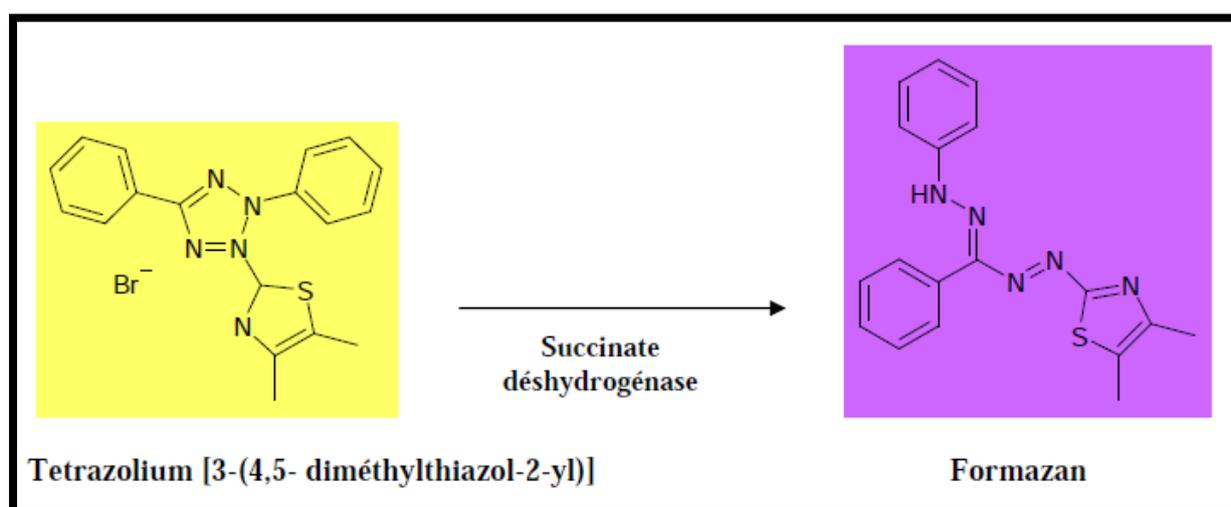
- **Test au MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromure)**

Le test de cytotoxicité consistait à mesurer la viabilité des cellules en culture lorsqu'elles sont mises en présence des extraits de plante. La cytotoxicité a été déterminée en utilisant le test colorimétrique MTT (Ambe *et al.*, 2016).

- **Principe**

La croissance cellulaire globale a été évaluée en utilisant le test colorimétrique au MTT (3 [4,5-diméthylthiazol-2-yl]-bromure de diphényltétrazolium).

Le test de prolifération cellulaire est un test colorimétrique qui est basé sur la capacité des enzymes succinate déshydrogénase mitochondriales dans les cellules vivantes à réduire le substrat jaune soluble dans l'eau 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure (MTT) en produit bleu violacé insoluble (formazan) mesuré par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes pour un temps donné et une concentration donnée, mais dépend aussi de leur activité métabolique (Patel *et al.*, 2009).



**Figure 16 :** Réaction de réduction du MTT en Formazan, catalysée par la succinate déshydrogénase (Alkhatib, 2010)

- **Mode opératoire**

Les cellules de macrophages RAW 264.7 ont étéensemencées dans des microplaques stériles de 96 puits et maintenues en culture à 37 °C, sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures avec une densité de 2×10<sup>4</sup> cellules/mL dans 100µL de milieu DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium) et un volume final de 200µL par puit.

Un volume de 100µL de la solution d'extraits d'*Artemisia campestris* à différentes concentrations est déposé dans les puits.

Les cellules de macrophages RAW 264.7 ont été incubées pendant 24 heures dans des plaques à 96 puits avant d'être traités avec différentes concentrations d'extraits d'*Artemisia campestris* et de lipopolysaccharide (LPS : 100 ng/ mL).

La viabilité a été déterminée par l'ajout dans chaque puits de 10µL (5 mg/mL) de bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl) -2, 5- diphenyltetrazolium (MTT) et incubé pendant 4 heures à 37 °C. Un volume de 25µL de SDS à 10% est ajouté dans chaque puit.

La mesure de la densité optique (DO) de chaque puits à 570 nm se fait au lecteur de plaques de type MRX ete Dynexmicroplate reader (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) (Jung *et al.*, 2013).

Quatre essais ont été réalisés pour chaque concentration.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au contrôle sans extrait de plante selon la formule :

$$\% \text{ viabilité} = \text{moyenne des DO de } x / \text{moyenne des DO du témoin}$$

Avec,

**Moyenne des DO de x** : correspond à la valeur de l'absorbance moyenne dans les puits qui contiennent des concentrations données d'un extrait,

**Moyenne des DO du témoin** : correspond à la valeur de l'absorbance moyenne dans les puits qui contiennent des cellules non traitées par les extraits (Salah-Fatnassi *et al.*, 2010).

## II.6. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanoliques bruts obtenus, a été testé en choisissant la méthode de diffusion sur disques, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme mise au point par Schroeder et Messing en 1949.

Le principe de cette méthode est d'imprégner des disques de papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre avec les substances à tester.

L'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique d'*Artemisia campestris* est évaluée en suivant la méthode décrite par Bolou et ses collaborateurs (2011) avec des modifications.

vis-à-vis de six souches bactériennes à Gram- : *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (NCTC 10418) et à Gram+ : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus*(PCM480) et *Micrococcus luteus* (DSM 1970) et une souche de levure *Candida albicans* (ATCC 35150).

Ils ont tous été fournis par le laboratoire de microbiologie du centre Cartuja de l'université de Grenade (Espagne).

### **II.6.1. Préparation des disques.**

Les extraits méthanoliques et aqueux sont repris dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à raison de 100 mg pour 1 ml. Des disques de papier buvard stériles de 6 mm de diamètre sont imprégnés avec 10 µL de chaque solution mère, correspondant à 1mg d'extrait par disque. Finalement on prépare des disques imprégnés d'eau distillée stérile et d'autres imprégnés de DMSO. Ces deux dernières catégories de disques serviront de contrôle. Des disques de ciprofloxacine (5µg), érythromycine (15 µg), Chloramphénicol (30 µg) ont été également utilisés comme antibiotique de référence.

### **II.6.2. Méthode de diffusion en milieu gélosé**

A partir de colonies jeunes de 18 à 24 h, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau distillée stérile pour chaque souche. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à  $10^6$  unités formant colonie par millilitre (ufc/ml). Cet inoculum estensemencé par inondation sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (SFM, 2008).

Les disques imprégnés des différents extraits et fractions sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Il en est de même pour les disques de ciprofloxacine. Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1h à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h.

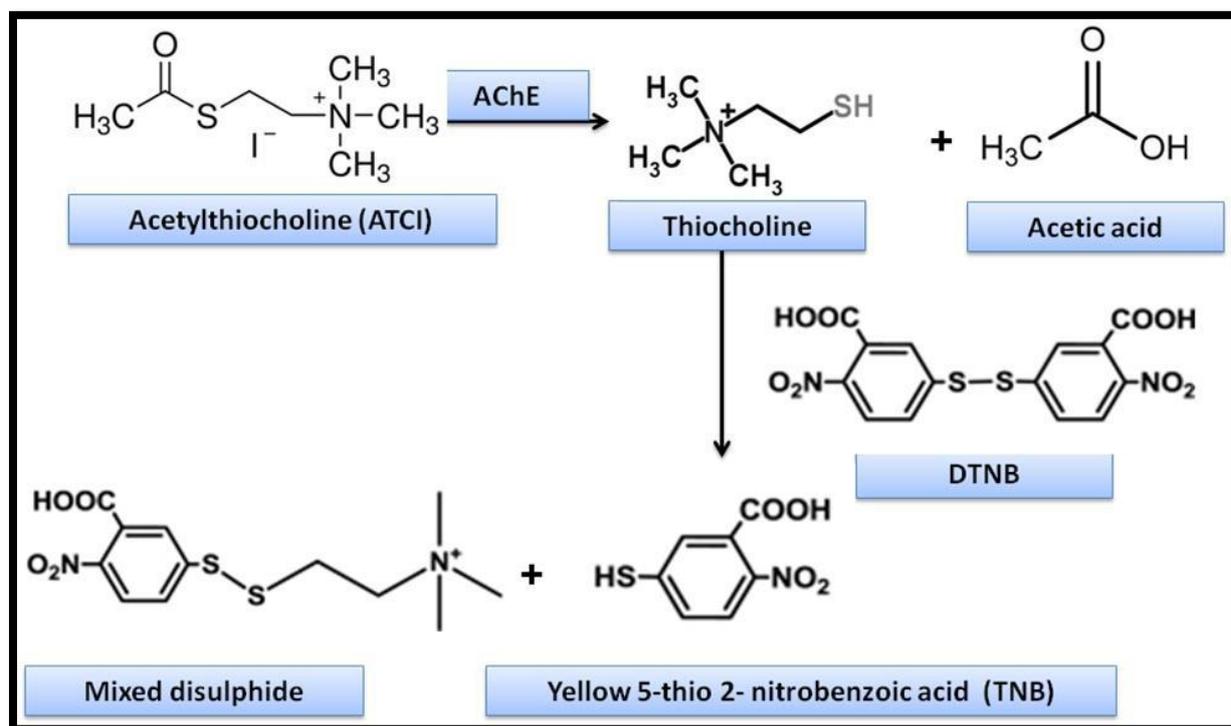
L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en mm autour de chaque disque (Eldeen *et al.*, 2005).

## II.7. Activité anticholinestérase

L'évaluation de l'activité enzymatique est réalisée selon la méthode d'Ellman (1961), qui utilise un substrat artificiel, l'acétylthiocholine, dont l'hydrolyse conduit à la formation de thiocholine. Cette dernière forme un dérivé coloré avec le DTNB (5,5'- dithiobis- [2 nitrobenzoate]).

- **Principe**

L'acétylcholinestérase (AChE) agit sur l'acétylthiocholine iodure (ACTI) en milieu aqueux pour libérer l'acide acétique et la thiocholine, qui, en agissant avec un composé chromogène : l'acide dinitrobenzoïque (DTNB) cette réaction entraîne le développement d'une couleur jaune. Les changements d'intensité de la couleur jaune sur une période de temps, qui peuvent être estimés à 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV, représentent l'activité anticholinestérase (Agarwal *et al.*, 2013).



**Figure 17 :** Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman pour l'étude de l'inhibition de l'acétylcholinestérase (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014).

- **Mode opératoire**

Le mélange réactionnel est composé de 140 µL de tampon phosphate de sodium (pH 8.0, 100 mM), 10µL de solution d'extrait dissous dans l'éthanol à différentes concentrations, 20 µL de la solution d'enzyme AChE ( $5.32 \times 10^{-3}$  U) Après incubation ..., 20µL de DTNB pendant 15min à 25°C, puis 20 µL de DTNB (0.5 mM) ont été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 10 µL d'iodure d'acétylthiocholine (0.71 mM).

La lecture de la densité optique contre le blanc est faite à une longueur d'onde de 412 nm. L'absorbance est mesurée à des intervalles de temps (t=0min, t=5min, t=10min, t=15min).

Les expériences ont été réalisées en *triplicata*, la galantamine est utilisée comme composé de référence.

Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme AChE a été déterminé par comparaison de la réaction de l'échantillon par rapport au blanc (éthanol dans du tampon phosphate pH 8 à l'aide de la formule suivante :

$$I\% = (E - S)/E \times 100$$

Avec,

**E** : l'activité de l'enzyme sans extrait

**S** : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

## **II.8. Analyses statistiques**

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. La détermination des valeurs de la concentration inhibitrice à 50% (CI50) est effectuée en utilisant la méthode de régression linéaire à partir de la courbe (pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student et le test d'ANOVA univariée suivie du test de Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification ( $p \leq 0.001$  ou bien  $p \leq 0.05$ ). Le calcul statistique est réalisé par le logiciel *XLSTAT 2014*.

# RÉSULTATS ET DISCUSSION

## I. Résultats et discussion

### I.1. Rendement des extractions

La macération dans le méthanol des parties aériennes d'*Artemisia campestris* a permis d'obtenir des résidus secs d'extraits bruts avec des rendements de 15,68 et 6.36% (m/m) pour les plantes des régions de Boussaâda et Oum El Bouaghi respectivement, inversement la décoction a donné des valeurs respectives de 3.4 %, 4.94 % (m/m). La couleur et l'aspect ont été aussi suivis (Tab. III)

**Tableau III** : Aspects, couleurs et rendements des divers extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*.

Région	Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
<b>Boussaâda</b>	E.MeOH	Visqueux	verte	15,68
	E.Aq	Poudre	jaune claire	3.4
<b>Oum El Bouaghi</b>	E.MeOH	visqueux	verte foncée	6.36
	E.Aq	poudre	jaune	4.94

Le broyage permet d'obtenir des échantillons en poudre dont les particules sont plus homogènes et plus petites, ce qui permet un meilleur contact de surface avec les solvants d'extraction. Cette méthode est importante, car pour que l'extraction soit efficace, le solvant doit entrer en contact avec les analytes cibles et la taille des particules inférieure à 0.5 mm est idéale pour une extraction efficace (Azwanida, 2015).

L'extraction est une étape très importante dans la séparation, l'identification aussi bien que dans la caractérisation des composés bioactifs. L'extraction des composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques (Azmir *et al.*, 2013 ; Mahmoudi *et al.*, 2013).

En général, le rendement de l'extraction dépend du type de solvant utilisé, le temps d'extraction, la température, le rapport échantillon/solvant ainsi que de la composition chimique et des caractéristiques physiques des échantillons (Dai *et al.*, 2010) .

Le rendement de l'extraction méthanolique est relativement supérieur à celui de l'extraction aqueuse. Les solvants polaires sont fréquemment utilisés pour la récupération des polyphénols à partir d'une matrice végétale. Les plus appropriés de ces solvants sont les mélanges aqueux (chaud ou froid) qui contiennent de l'éthanol, du méthanol, de l'acétone ou de l'acétate d'éthyle. Le méthanol et l'éthanol ont été largement utilisés pour extraire des composés antioxydants de diverses plantes (Sultana *et al.*, 2009).

La comparaison des résultats de rendement n'est pas facile, à cause de l'intervention de certains facteurs dans la détermination de rendement comme la méthode de préparation, les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Lee *et al.*, 2003).

### **II.1. Screening chimique**

L'étude phytochimique qualitative permet de détecter les différentes familles chimiques constituant une plante ; les tests y sont basés sur l'intensité du précipité et de la turbidité, la coloration étant proportionnelle à la quantité de substances recherchées (Bachiri *et al.*, 2016).

La caractérisation des métabolites secondaires présentant un intérêt pharmacologique tels les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les saponosides a été entreprise.

En effet, la détection des alcaloïdes s'effectue grâce au réactif de Mayer et celle des flavonoïdes se fait en utilisant la solution basique d'ammoniac ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ; tandis que les tanins sont détectés par utilisation de la solution aqueuse de trichlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) et, enfin, la mise en évidence des saponosides est faite par le test du pouvoir moussant en solution aqueuse (Tab. IV).

**Tableau IV** : Screening phytochimiques des extraits aqueux et méthanoliques d'*Artemisia campestris* de deux régions, Boussaâda et OEB.

Espèce étudiée	<i>Artemisia campestris</i>	
	Boussaâda	OEB
Familles chimiques recherchées		
Flavonoïdes	+	+
Tanins	+	+
Alcaloïdes	-	-
anthocyanes	+	+
Saponines	+	+

Les flavonoïdes, les tanins et les saponosides sont présents en quantité importante dans les extraits de plantes des deux régions. Les anthocyanes sont également présents. A l'opposé, les alcaloïdes sont absents dans les deux plantes.

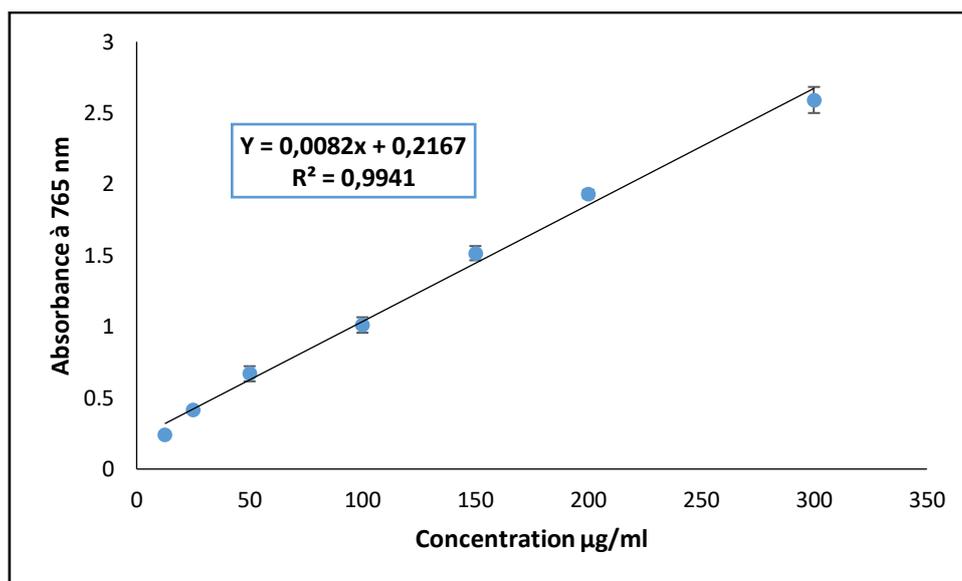
## II.2. Analyse quantitative

### II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits méthanoliques et aqueux de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été effectuée par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu ; qui est considérée la meilleure méthode pour déterminer la teneur en polyphénols (Djeridane, 2007).

L'acide gallique a été utilisé comme standard, la quantité des polyphénols correspondante de chaque extrait a été rapportée en microgramme équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$ ) (Fig. 18).

Les teneurs en polyphénols totaux des extrais méthanoliques sont de 88.61 et 82.84  $\mu\text{gEAG/mg}$  d'extrait et celles des extraits aqueux de 74.75 et 87.35 EAG/mg d'extraits pour les plantes des régions de Boussaâda et Oum el Bouaghi respectivement (Tab. V).



**Figure 18 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux (Moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

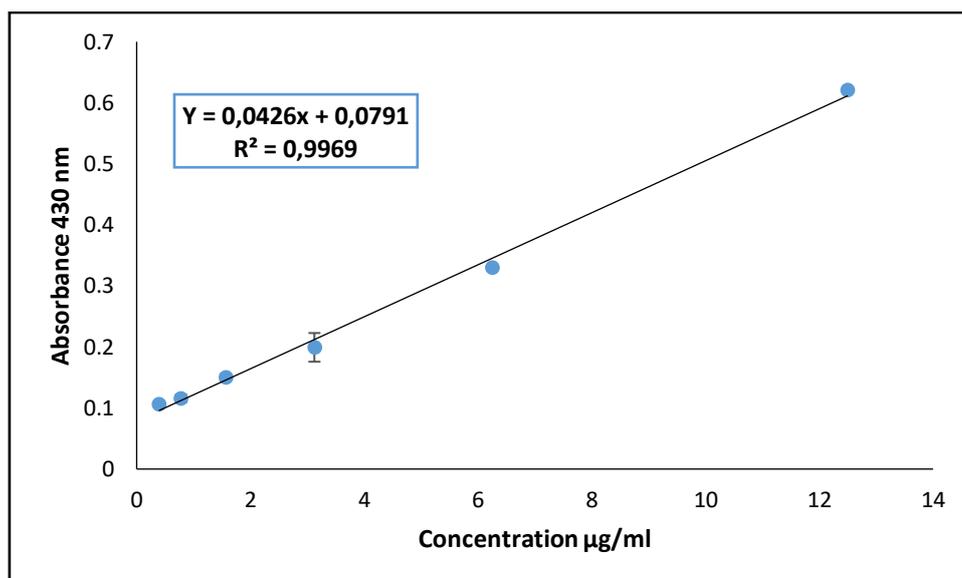
**Tableau V :** Teneurs en polyphénols totaux des extraits d'*Artemisia campestris*

Extrait/Région	Boussaâda (EAG/mg d'extraits)	Oum el Bouaghi (EAG/mg d'extraits)
E.MeOH	88.61 $\pm$ 0,22	82.84 $\pm$ 0,09
E.Aq	74.75 $\pm$ 0,01	87.35 $\pm$ 0,03

### II.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium et le témoin utilisé été la quercétine (Fig. 19). La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait) (Fig. 19).

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits sont de 2.41 et 2.61  $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait pour l'extrait méthanolique, et de 2.16 et 2.25  $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait aqueux pour les plantes des régions de Boussaâda et Oum el Bouaghi respectivement (Tab. VI).



**Figure 19 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes (Moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

**Tableau 6 :** Teneurs en flavonoïdes totaux dans les extraits d'*Artemisia campestris*

Extrait/Région	Boussaâda ( $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait)	Oum el bouaghi ( $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait)
E.MeOH	12,91 $\pm$ 0,01	13,72 $\pm$ 0,00
E.Aq	31,84 $\pm$ 0,00	33,14 $\pm$ 0,01

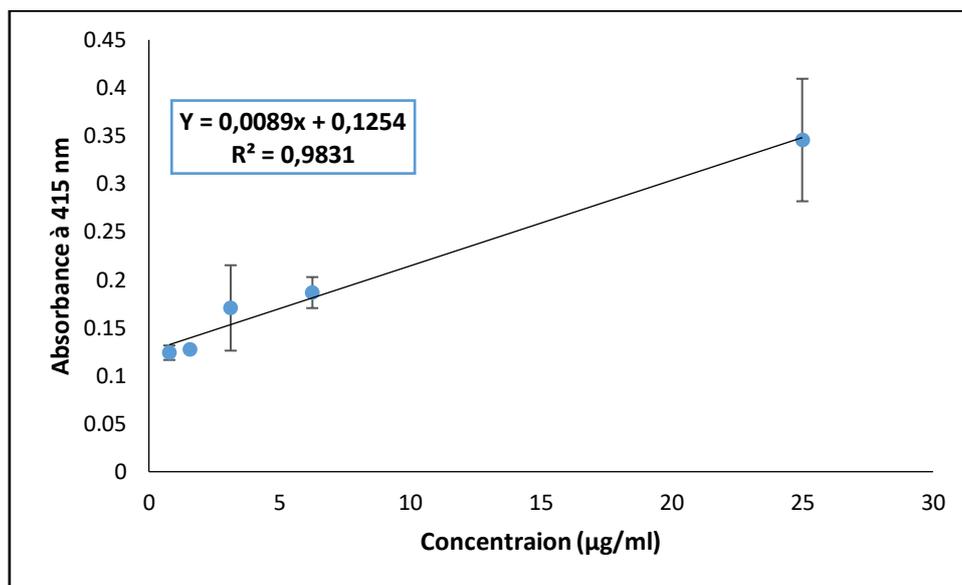
La quantité des composés phénoliques et des flavonoïdes des extraits de plantes varie d'une plante à l'autre, cela est probablement dû à la localisation géographique, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la maturité de la plante et la durée de conservation (Gheffour *et al.*, 2015).

### II.2.3. Dosage des flavones et flavonols

Pour le dosage des flavones et flavonols, la quercétine a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, La teneur en flavones et flavonols est exprimée en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait) (Fig. 20).

Les extraits aqueux sont riches en flavones et flavonols avec des taux de 217,75 et 111,93  $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait pour la plantes de Oum el Bouaghi et Boussaâda respectivement, alors que les

extraits méthanoliques contiennent une faible teneur avec des valeurs de 18,37 et 20,51  $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait pour les mêmes plantes respectivement (Tab. VII).



**Figure 20 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonols (Moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

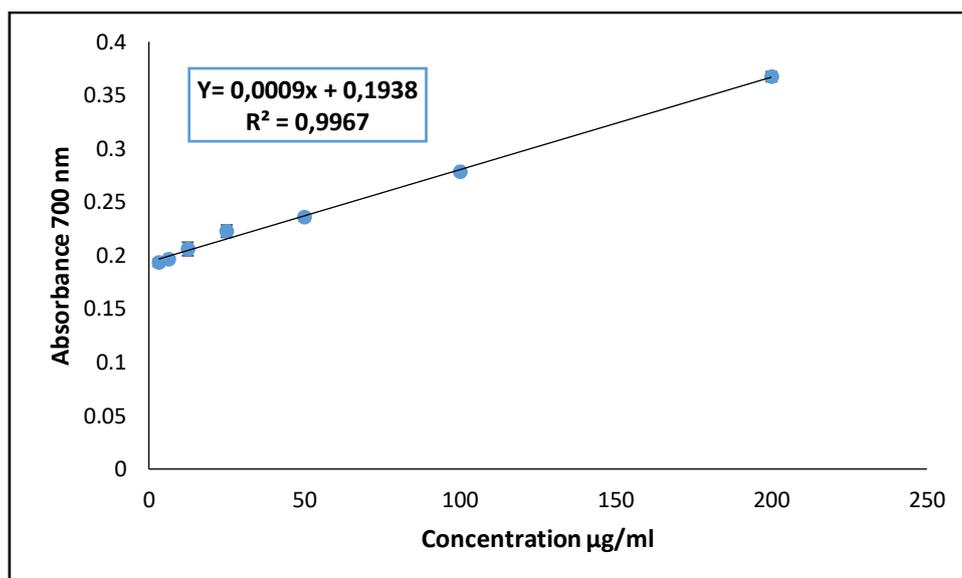
**Tableau VII:** Teneurs en flavones et flavonols des les extraits d'*Artemisia campestris*

Extrait/Région	Boussaâda ( $\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait)	Oum el Bouaghi ( $\mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait)
E.MeOH	20,51 $\pm$ 0,01	18,37 $\pm$ 0,01
E.Aq	111,93 $\pm$ 0,02	217,75 $\pm$ 0,01

#### II.2.4. Dosage des tanins

Le dosage des tanins a été réalisé selon la méthode utilisant la vanilline en milieu acide. La catéchine est utilisée comme standard, la teneur des tanins a été rapportée en microgrammes équivalents de catéchine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EC/ $\mu\text{g}$  d'extrait) (Fig. 21).

Le taux des tanins dans les extraits de la région d'Oum el Bouaghi est deux fois supérieur à celui des extraits de la région de Boussaâda (Tab. VIII).



**Figure 21 :** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins  
(Moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

**Tableau VIII :** Teneurs en tanins des extraits d'*Artemisia campestris*

Extrait/Région	Boussaâda ( $\mu\text{g EC/mg}$ d'extrait)	Oum el bouaghi ( $\mu\text{g EC/mg}$ d'extrait)
E.MeOH	36,88 $\pm$ 0,01	70,59 $\pm$ 0,00
E.Aq	35,29 $\pm$ 0,00	60,29 $\pm$ 0,01

### II.3. Identification des composés phénoliques par HPLC TOF/MS

La chromatographie liquide à haute pression (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (TOF / MS) est une méthode d'analyse chimique puissante pour la caractérisation du contenu phénolique des extraits d'*Artemisia campestris*.

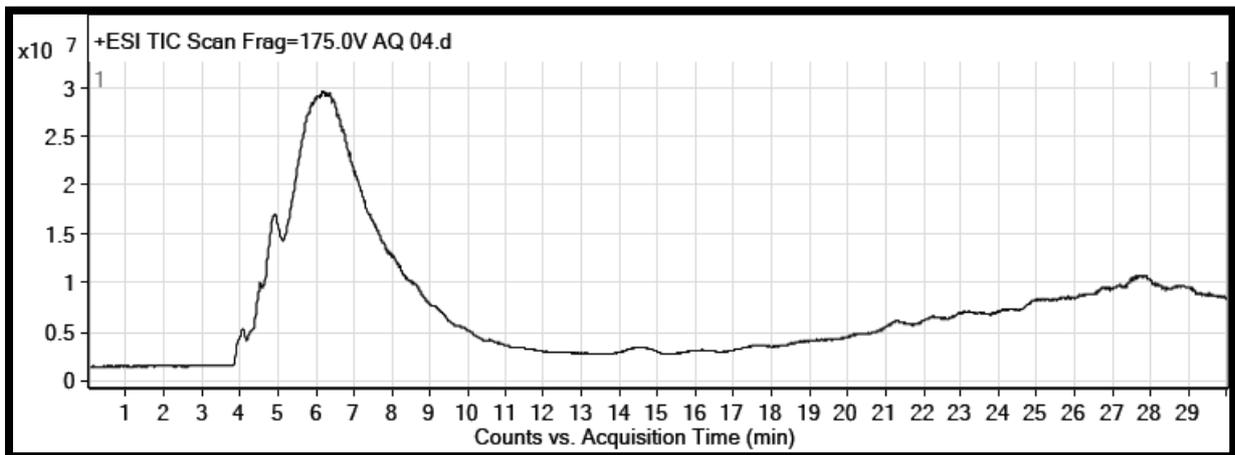
#### II.3.1. Les extraits aqueux

Dans l'extrait aqueux de la région d'OEB, l'isoflavone et le méthyl robustone constituent les composés majoritaires alors que les autres constituants se trouvent en faibles concentrations (Tab. 09).

Le villinol, l'acide chlorogénique et le nodifloretin sont les composés les plus abondants dans l'extrait aqueux d'*A. campestris* de la région de Boussaâda (Tab. X).

### II.3.2. Les extraits méthanolique

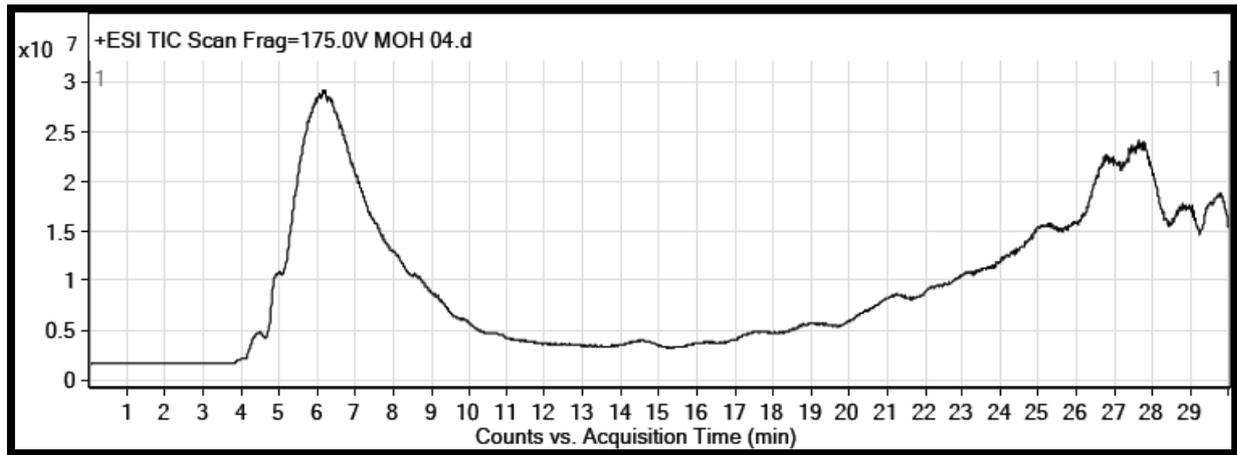
L'analyse de cet extrait a permis de mettre en évidence de nombreux composés dans les deux extraits ; Dans l'extrait de la plante d'OEB, les composés majoritaires sont l'acide caféique et la trilobolide alors que, les autres composés phénoliques sont présents à de faibles concentrations (Tab. XI).



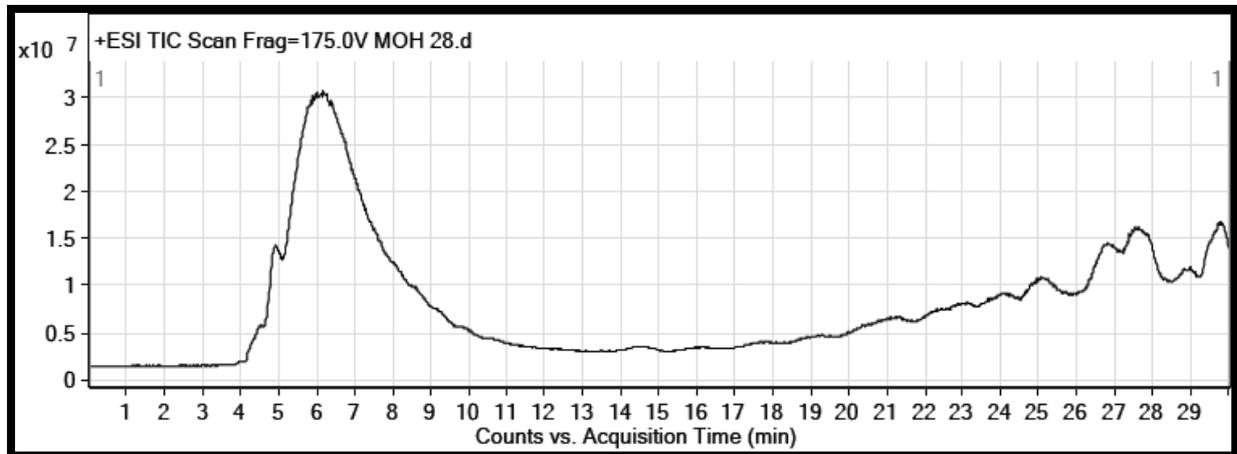
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figure 22** : Chromatogrammes des extraits aqueux et méthanoliques de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* obtenu par HPLC TOF/MS. a) E.Aq OEB. b) E.Aq Boussaâda. c) E.MeOH OEB d) E.MeOH Boussaâda.

**Tableau IX** : Constituants de l'extrait aqueux d'OEB obtenus par chromatographie HPLC TOF/MS.

Composé	TR	M/Z
Furano [2'',3'':6,7]aurone	4.67	263.07
5-Hydroxy-3',4'- methylenedioxy- 6'',6''- dimethylpyrano [2'',3'':7,8] isoflavone	4.672	365.1037
Methyl robustone	4.674	379.1191
Villinol	4.694	439.1395
Acide chlorogénique	5.747	377.0841
Apigénin 7- (2'',3''- diacetylglucoside)	7.909	539.1155
5,7,2',5'-Tetrahydroxy-6 methoxyflavanone	20.597	319.081
Rehderianin I	26.723	331.0811
5,7,2',3'- tetrahydroxyflavone	26.886	287.0549
5,2',6'-Trihydroxy-7- methoxyflavone	27.551	301.0704

**Tableau X :** Constituants de l'extrait aqueux de Boussaâda obtenus par chromatographie HPLC TOF/MS

Composé	TR	M/Z
Villinol	4.69	439.1409
Acide chlorogénique	6.125	377.0842
Apigénin 7-(2",3"- diacetylglucoside)	8.481	539.1157
Diospolysaponin A	26.793	803.4407
Rehderianin I	26.849	331.0812
Nodifloretin	26.895	317.0651
5,7,2',3'- Tetrahydroxyflavone	26.999	287.0548
5,2',6'-Trihydroxy-7- methoxyflavone	27.619	301.0707
Diospolysaponin A	28.177	803.4406

**Tableau XI** : Constituants de l'extrait méthanolique d'OEB par chromatographie HPLC TOF/MS

Composé	TR	M/Z
8-methylcaffeine	5.413	231.0844
4-Methylesculetin	8.911	193.0498
5,7,2',5'-Tetrahydroxy-6- methoxyflavanone	20.524	319.0813
6a,7-Dihydroxymedicarpin	22.576	303.0863
Nodifloretin	23.912	317.0657
Trilobolide	24.913	523.2519
Rehderianin I	26.702	331.0819
5,7,2',3'-Tetrahydroxyflavone	26.89	287.0553
2',4',6'-Trihydroxychalcone	27.192	257.0809
Tamadone	27.336	361.0917
5,2',6'-Trihydroxy-7- methoxyflavone	27.491	301.0711

**Tableau XII** : Constituants de l'extrait méthanolique de Boussaâda obtenus par chromatographie HPLC TOF/MS

Composé	TR	M/Z
Chlorogenic Acid	5.732	319.1369
5,7,2',5'-Tetrahydroxy-6- methoxyflavanone	20.56	319.0813
6a,7-Dihydroxymedicarpin	22.607	303.0863
3-tert-Butyl-5- ethylcatechol	23.418	181.1228
Nodifloretin	23.964	317.0664
Rehderianin I	26.718	331.0821
5,7,2',3'-Tetrahydroxyflavon	26.902	287.0559
6a,7-Dihydroxymedicarpin	27.092	303.0859
Tamadone	27.468	361.0915
5,2',6'-Trihydroxy-7- methoxyflavone	27.502	301.0713

## II.4. Activités biologiques

### II.4.1. Activité antioxydante

La capacité antioxydante est largement utilisée comme paramètre pour caractériser l'effet bénéfique des aliments ou des plantes. Récemment, il est devenu très intéressant de trouver des antioxydants naturels pour remplacer les antioxydants synthétiques, qui étaient limités en raison de leurs effets secondaires tels que la carcinogénèse (Riahi *et al.*, 2013).

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de la plante a été réalisée par quatre techniques chimiques (le piégeage du radical libre DPPH, la réduction de fer, la capacité antioxydante totale et le blanchiment du  $\beta$ -carotène).

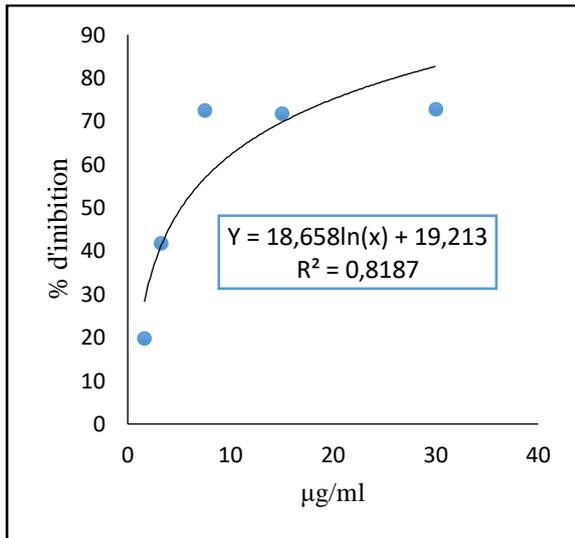
#### II.4.1.1. Test de DPPH

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH). Ce test simple permet de fournir des informations sur la capacité des composés à donner un électron ce qui contribue à comprendre le mécanisme d'action des antioxydants (Bouhleb *et al.*, 2007).

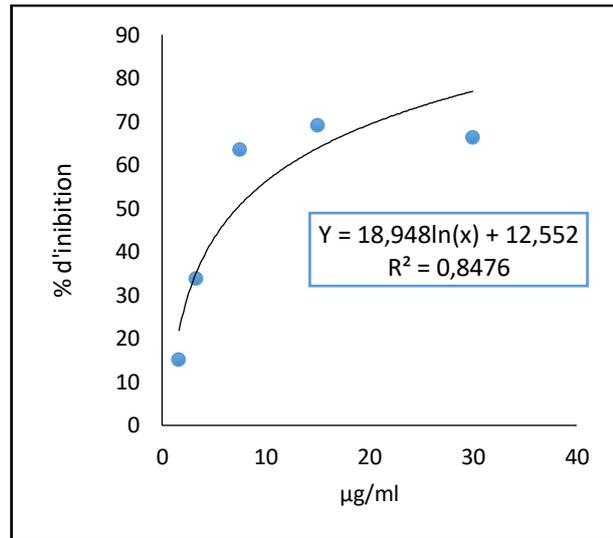
L'activité antioxydante des extraits d'*Artemisia campestris* est comparée à celle divers antioxydants standards : BHA, l'acide ascorbique et la quercétine.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée par la concentration inhibitrice à 50 % ( $CI_{50}$ ). Ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration de l'extrait exigée ( $\mu\text{g/mL}$ ) pour réduire 50% des radicaux libres (DPPH) dans des conditions expérimentales employées (Stamenic *et al.*, 2014). La  $CI_{50}$  est inversement lié à la capacité anti-oxydante d'un composé, donc plus la valeur  $CI_{50}$  est basse, l'activité anti-oxydante d'un composé est grande.

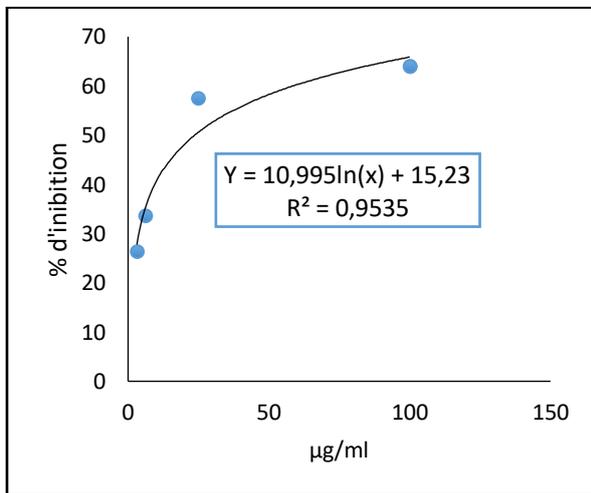
Les résultats obtenus montrent que les extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* ont une activité antiradicalaire concentration dépendante (Fig. 23, 24). Elle est de 169.82 et 131.073  $\mu\text{g/mL}$  pour les extraits méthanoliques et 150.70 et 88.354  $\mu\text{g/mL}$  pour les extraits aqueux pour les plantes des régions de Boussaâda et Oum el Bouaghi respectivement (Tab. XIII).



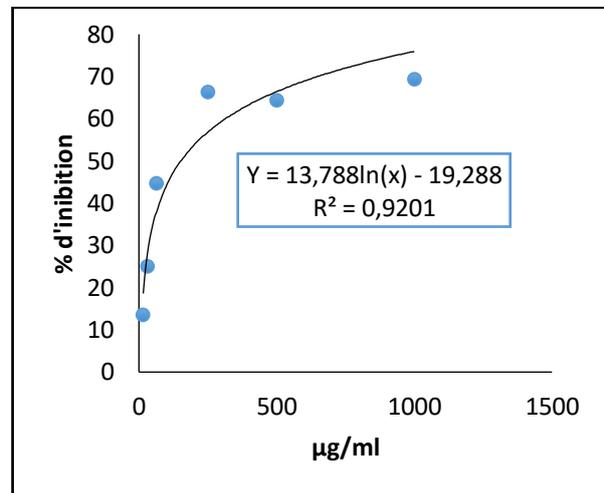
(a)



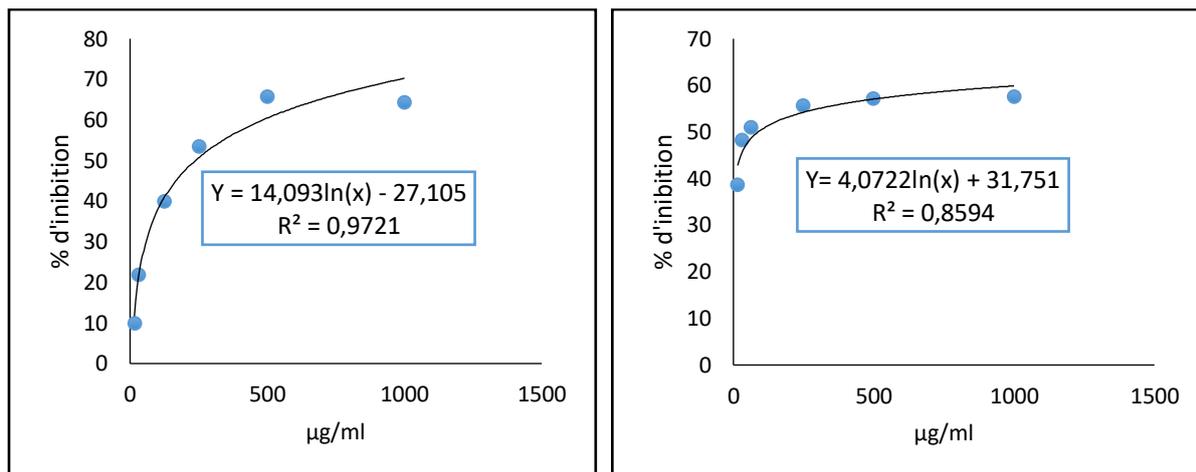
(b)



(c)

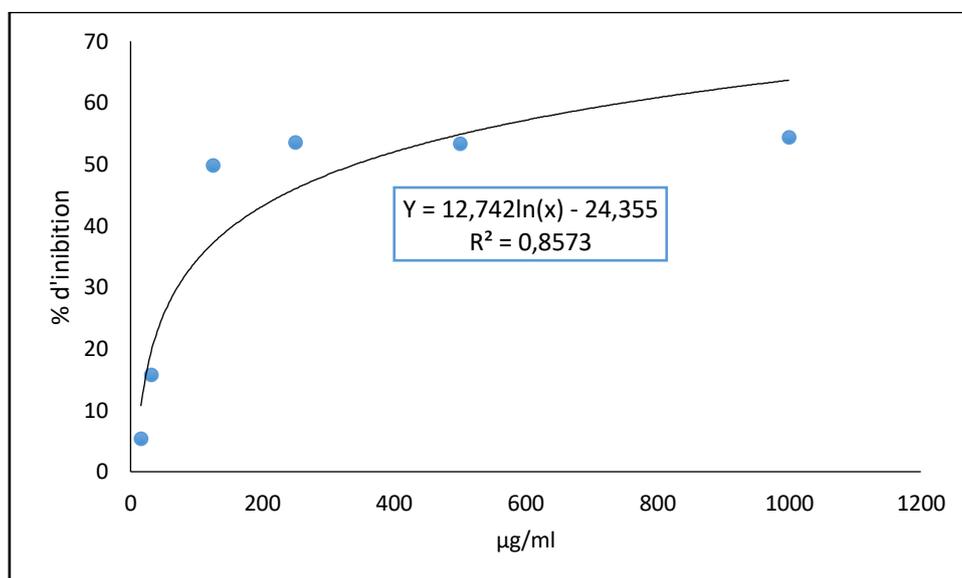


(d)



(e)

(f)



(g)

**Figure 23 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de plante ou de standard :a) Quercétine, b) Acide ascorbique, c) BHA, d) EMeOH OEB, e) EMeOH Boussaâda, f) E Aq OEB, g) EAQ Boussaâda

En effet, la faible valeur de  $CI_{50}$  signifie la forte activité antioxydante. Les extraits d'*Artemisia campestris* de la région de Boussaâda présentent une faible activité antioxydante avec des  $CI_{50}$  de l'ordre de 241,48 et 320,60 µg/mL pour les extraits méthanolique et aqueux respectivement. A propos de l'extrait aqueux de la région d'Oum el Bouaghi son activité est considérable avec une  $CI_{50}$  de 48,42 µg/mL. En comparaison avec l'antioxydant standard BHA, cette valeur reste encore faible. Akrouf *et al.* (2011) ont montré une  $CI_{50}$  de 2,053 mg/mL pour l'extrait d'éthanol-eau de la partie aérienne et 0,658 mg/ml pour l'extrait de l'infusion, ces valeurs sont nettement

inférieurs à nos résultats. Khettaf *et al.* (2016) ont étudié l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques et aqueux d'*Artemisia campestris*, ils ont trouvé qu'ils possèdent des valeurs de  $CI_{50}$  très inférieures à nos résultats.

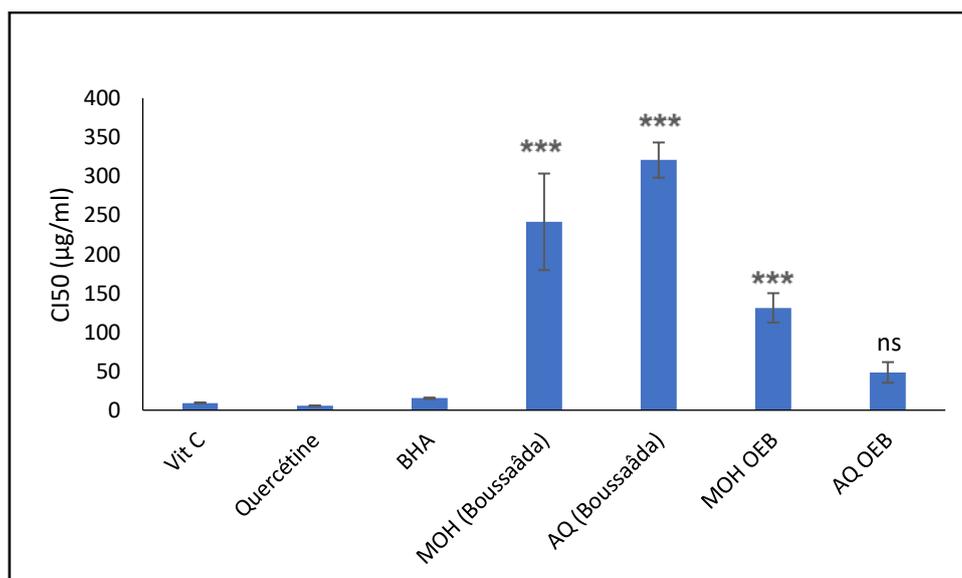
Une étude menée par Ivanescu *et al.* (2018) sur l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* a montré une  $CI_{50}$  de  $28.0 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ , donc une forte activité anti-radicalaire par rapport à nos extraits méthanoliques. De même Karabegović *et al.* (2011) ont trouvé une valeur de la  $CI_{50}$  comprises entre 19.8 et 23  $\mu\text{g/mL}$ .

Les valeurs de la  $CI_{50}$  varient considérablement selon le type d'extraction, les sous-espèces et les conditions pédoclimatiques qui influencent directement la composition chimique Ivanescu *et al.*, (2018)

**Tableau XIII :** Les valeurs des  $CI_{50}$  des extraits d'*Artemisia campestris* et des antioxydants standards (BHA, acide ascorbique, quercétine).

Extraits et Standards	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
E. MeOH (Boussaâda)	$241,48 \pm 61,86$
E. Aq (Boussaâda)	$320,60 \pm 22,58$
E.MeOH (Oum el bouaghi)	$131,19 \pm 18,81$
E.Aq (Oum el bouaghi)	$48,42 \pm 13,19$
BHA	$15,18 \pm 0,95$
Acide ascorbique	$9,34 \pm 0.217$
Quercétine	$5.57 \pm 0.211$

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.



**Figure 24 :** Activité anti-radicalaire des extraits d'*Artemisia campestris* et des témoins positifs (BHA, Ac ascorbique, quercétine).

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. ns: non significatif, \*\*\* :  $P \leq 0,0001$

#### II.4.1.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques et aqueux d'*Artemisia campestris* a été évaluée en utilisant la méthode de réduction du fer (FRAP). Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel et peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux.

La présence de réducteurs dans les extraits de plantes provoque la réduction de  $Fe^{3+}$ / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent,  $Fe^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Bougandoura et Bendimerad, 2012).

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dose dépendante (concentration dépendante). L'activité antioxydante des extraits est exprimée en une mesure quantitative : la concentration effectrice à 50 % ( $CE_{50}$ ) qui correspond à la concentration de l'extrait requise pour réduire de 50% l'ion ferrique ( $CE_{50}$ ). Le BHA a été utilisé comme standard (Fig. 25).

L'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur  $CE_{50}$ . Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* de la région d'Oum el Bouaghi présente le meilleur pouvoir réducteur estimé à 266,74  $\mu\text{g/mL}$  largement supérieur à celui exprimé par l'extrait aqueux de la même région ainsi qu'à des extraits de la région de

Boussaâda mais cette valeur reste nettement inférieure à celle de l'antioxydant standard utilisé (BHA) (Tab. XIV).

Si on compare nos résultats avec ceux de la bibliographie, on constate que l'activité de l'extrait de méthanol est nettement inférieure à celle trouvée par Ivanescu *et al.* (2018) qui a trouvé une valeur de  $18,05 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ .

Megdiche-Ksouri *et al.*, (2014) ont également trouvé que l'effet chélateur des extraits aqueux et méthanoliques d'*Artemisia campestris* sont manifestés par des concentrations effectrices élevées par rapport à celui de l'acide ascorbique avec des valeurs de 110 et 340  $\mu\text{g/mL}$  pour les extraits aqueux et méthanoliques respectivement.

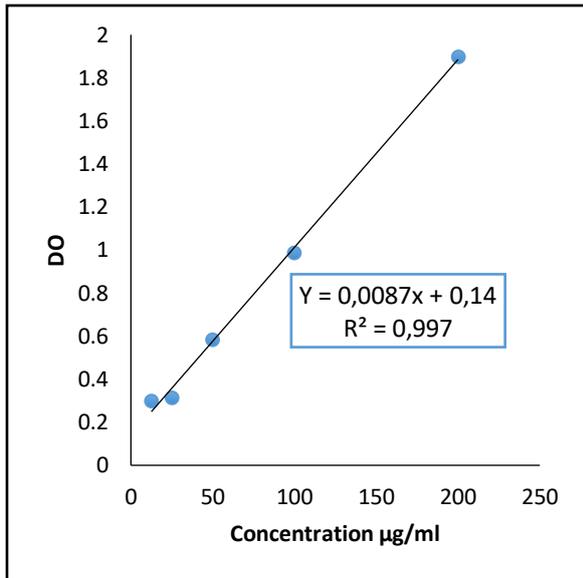
Saoudi *et al.* (2017) ont testé l'activité antioxydante des huiles essentielles, ils ont trouvé une valeur de la  $CE_{50}$  égale à  $5,36 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$ , cette valeur est nettement supérieure aux notre.

Dans une autre étude réalisée par Pavithra *et al.* (2018) sur l'espèce *Artemisia Pallens*, a montré une valeur de la  $CE_{50}$  de  $6 \mu\text{g/ml}$  pour l'extrait aqueux et  $56 \mu\text{g/ml}$  l'extrait aqueux méthanolique et  $12 \mu\text{g/ml}$  l'extrait chloroformique, elles sont également nettement supérieure aux notre.

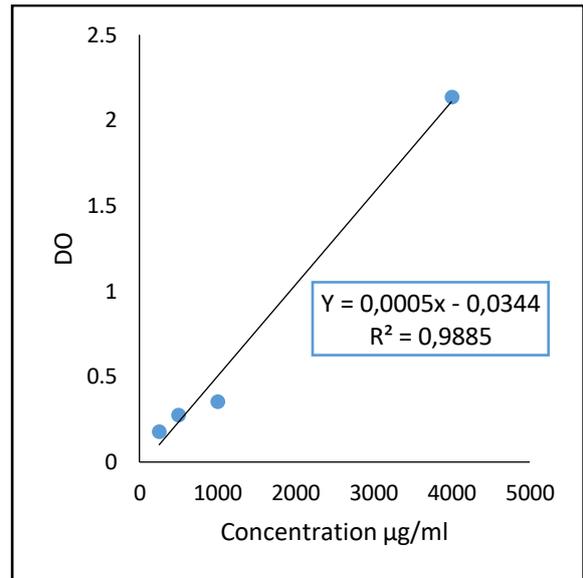
La différence entre l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques pouvant être attribuée à la variabilité de la teneur en composés phénoliques totaux parmi ces extraits.

De nombreux auteurs (Djeridane *et al.*, 2006 ; Akrouit *et al.*, 2011) ont attribué l'activité antioxydante au contenu de la plante en polyphénols et flavonoïdes.

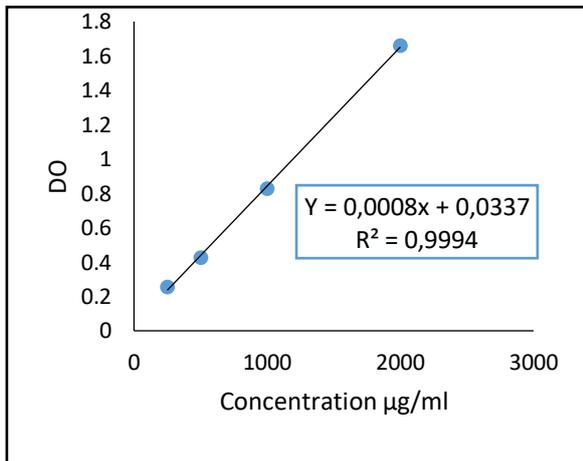
Cependant, ces différences entre les capacités antioxydantes globales pourraient non seulement dépendre de la quantité de ces molécules, mais aussi de la variabilité de leurs structures et de leurs interactions dans les extraits (Megdiche-Ksouri *et al.*, 2014).



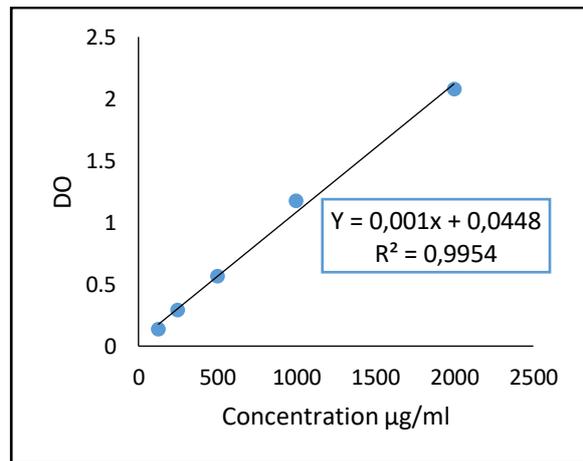
(a)



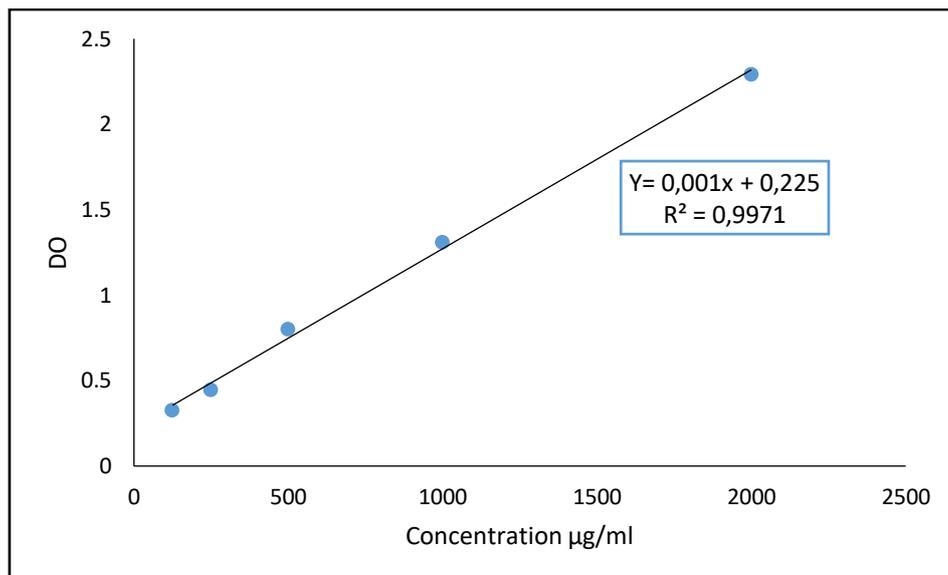
(b)



(c)



(d)



(e)

**Figure 25 :** Variation de pouvoir réducteur du fer en fonction de la concentration, a) BHA, b) EAq de Boussaâda, c) EAq de OEB, d) EMOH de Boussaâda, e) EMOH de OEB

**Tableau XIV :** Valeurs de la concentration effectrice ( $CE_{50}$ ) des extraits méthanoliques et aqueux d'*Artemisia campestris* et des standard déterminées pour le test du pouvoir réducteur du fer.

Extraits et Standards	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Méthanolique (Boussaâda)	$455,2 \pm 2,2$
Aqueux (Boussaâda)	$871,28 \pm 49,96$
Méthanolique (Oum el bouaghi)	$266,74 \pm 16,51$
Aqueux (Oum el bouaghi)	$414,52 \pm 28,78$
BHA	$41,21 \pm 0,78$

#### II.4.1.3. Test de blanchissement du $\beta$ - carotène

Dans le test de blanchissement du  $\beta$ - carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres due à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylène de l'acide linoléique. Puis le radical libre va oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé. La présence des antioxydants dans l'extrait permet de minimiser l'oxydation du  $\beta$ -carotène par les hydroperoxydes qui sont neutralisés (Cheurfa et Allem, 2015).

Cette méthode est employée couramment parce que le  $\beta$ -carotène montre une activité biologique forte et est un composé physiologique important. En outre, le  $\beta$ -carotène est employé comme agent de coloration en boissons et sa décoloration réduirait nettement la qualité de ces produits (Ghedadba *et al.*, 2015).

La cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène en présence et en absence des extraits d'*Artemisia campestris*, de l'antioxydant standard (BHA) est représentée dans les Figures 26 et 27.

La capacité des extraits à ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides est indiquée par l'abaissement de l'absorbance dans le temps.

La courbe qui correspond au contrôle négatif (–) décroît d'une façon rapide, car il n'y a aucun antioxydant qui puisse inhiber ou diminuer l'oxydation du  $\beta$ -carotène, ce qui facilite l'action des radicaux libres.

L'étude de la cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène montre que celui-ci diminue graduellement avec le temps, pour atteindre un état stationnaire au bout de 48 heures, étant donné que le nombre de radicaux libres devient important. Après ce temps-là, il reste constant, ce qui montre que toutes les doubles liaisons présentes dans le  $\beta$ -carotène sont dégradées, ce phénomène conduit à l'épuisement irréversible de la coloration jaune qui se transforme en une couleur blanche, c'est donc le blanchissement total du  $\beta$ -carotène, ce temps est dit « temps d'épuisement ».

Les résultats de blanchissement du  $\beta$ -carotène (Fig. 26, 27) ont indiqué que l'activité la plus élevée a été développée par l'extrait méthanolique d'*Artemisia* avec des valeurs d'activité anti-radicalaire (AAR) de 85,18 et 88,03 % pour les plantes des régions de Boussaâda et Oum el Bouaghi respectivement suivi par l'extrait aqueux d'Oum el Bouaghi (52,65%) et enfin, l'extrait aqueux de Boussaâda (26,58%).

Si on compare nos résultats avec ceux de la bibliographie, on constate que les résultats de l'activité des extraits aqueux sont nettement inférieurs aux résultats de l'étude réalisée par

Akrout *et al.* (2011) (88,7%) tandis que les extraits méthanoliques ont montré une activité nettement supérieure à celle de l'extrait éthanol-eau (34,8%).

(17.47±1.56 µg/ml) est supérieur à celles trouvées par Mraïhi

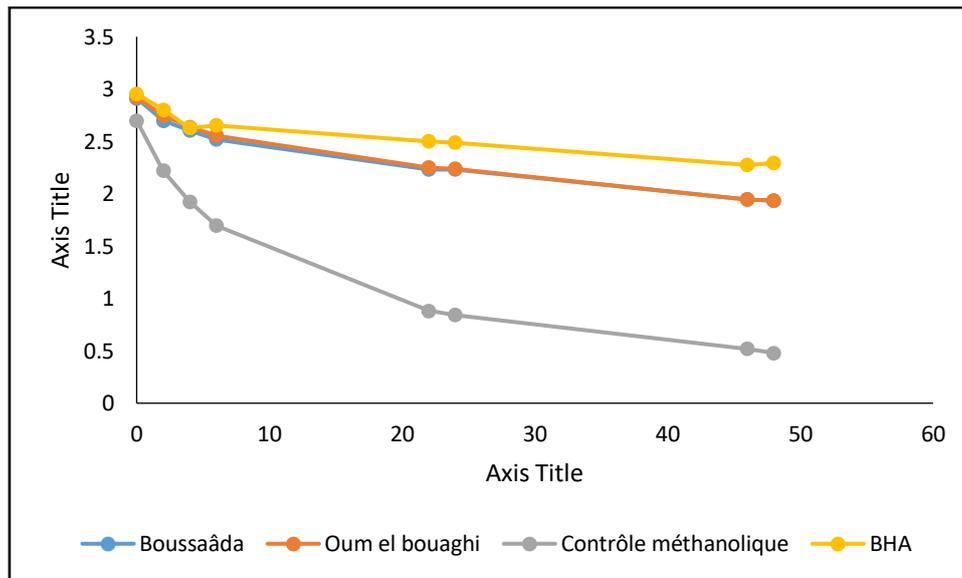
Les résultats obtenus pour les extraits méthanoliques sont en accord avec ceux obtenus par Djidel et Khennouf (2014). Ils ont trouvé que les extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle ont donné des pourcentages d'inhibition de 79% et 82% respectivement. Ghilissi *et al.*, (2016) ont testé l'activité antioxydante de l'extrait aqueux, leur résultat est similaire à celui obtenu dans la présente étude pour l'extrait aqueux de la région d'Oum el Bouaghi avec un pourcentage d'inhibition égal à 64.81%.

Dans une étude réalisée par Bidgoli. (2018) sur les huiles essentielles de trois espèces d'*Artemisia* : *Artemisia sieberi*, *Artemisia kermanensis* et *Artemisia khorassanica*, il a trouvé des pourcentages comprises entre 57,86 et 69,35 qui sont proches à celui de notre extrait aqueux de la plante de la région d'Oum El Bouaghi.

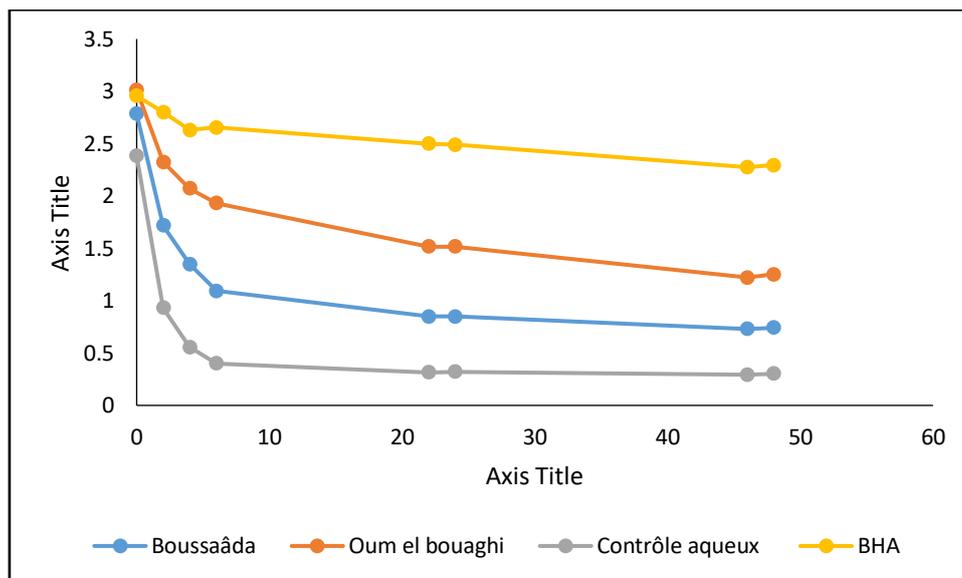
L'activité antioxydante des extraits polaires pourrait s'expliquer par leur richesse en substances polyphénoliques. L'activité antioxydante dépend de plusieurs facteurs, à savoir la concentration des extraits, la méthode d'évaluation, la sensibilité des antioxydants à la température de l'essai et la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant (Ghedadba *et al.*, 2014).

**Tableau XV** : Valeurs de l'activité antiradicalaire (AAR) des extraits d'*A.campestris* et du standard.

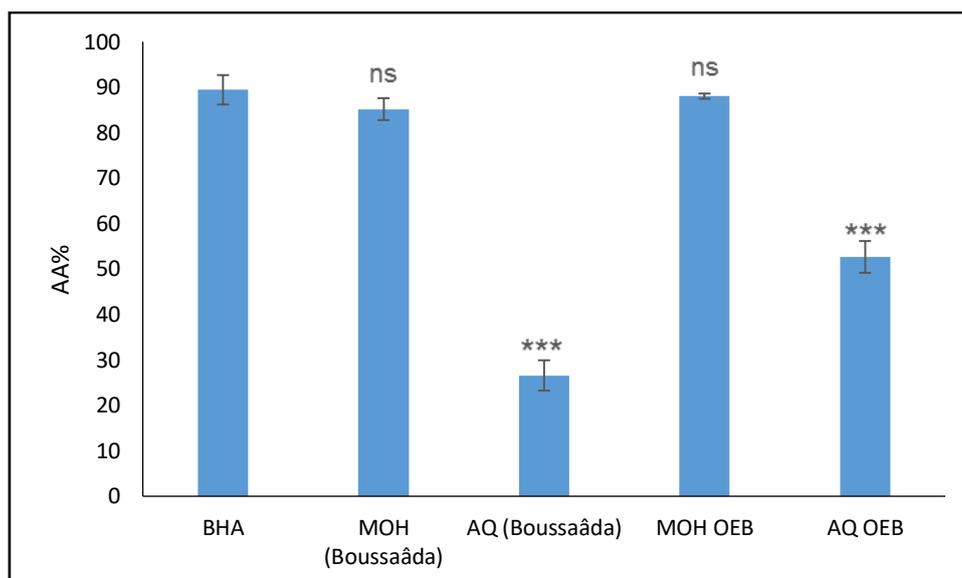
Extraits et Standards	AAR %
EMOH (Boussaâda)	85,18± 2,41
EAg (Boussaâda)	26,58± 3,34
EMOH (Oum el bouaghi)	88,03± 0,58
EAg (Oum el bouaghi)	52,65±3,50
BHA	89,43± 3,24



**Figure 26 :** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ - carotène à 470 nm en présence des extraits méthanolique d'*Artemisia campestris* et du BHA.



**Figure 27 :** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ - carotène à 490 nm en présence des extraits aqueux d'*Artemisia campestris* et du BHA.



**Figure 28** : Activité antioxydante des extraits d'*Artemisia campestris*, de BHA dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique.

Les valeurs sont la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

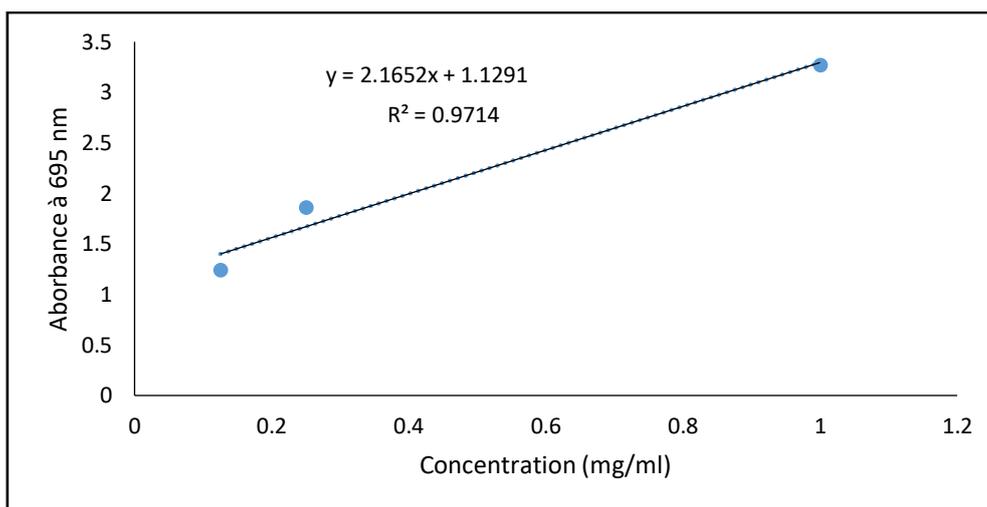
ns: non significatif, \*\*\* :  $P \leq 0,0001$ .

#### II.4.1.4. Capacité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  en molybdène Mo (V)  $\text{MoO}^{2+}$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (Phatak et Hendre, 2014).

Les résultats de la capacité antioxydante totale pour les extraits méthanoliques et aqueux exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalents d'acide ascorbique par mg de matière sèche /extrait (Fig. 29), montrent que tous les extraits présentent des activités antioxydantes différentes. Les extraits méthanoliques des parties aériennes d'*Artemisia campestris* possèdent une capacité antioxydante totale supérieure à celle développée par les extraits aqueux. Elle est de l'ordre de 802 et 958  $\mu\text{g}$  EAA/gms pour les extraits de Boussaâda et Oum el Bouaghi respectivement (Tab. XVI).

Megdiche-Ksouri et al. (2015) ont montré que l'extrait méthanolique présente une valeur de la  $\text{CI}_{50}$  de 540 EAG/g poids sec, et 216 mg EAG/g poids sec pour l'extrait aqueux et 328 mg EAG/g poids sec pour l'extrait d'acétate d'éthyle ; elles sont inférieures à nos résultats pour les extraits méthanolique et proche de nos résultats pour l'extrait aqueux de Oum El Bouaghi.



**Figure 29 :** Capacité antioxydante totale du composé de référence (acide ascorbique) à différentes concentrations.

**Tableau 16 :** Capacité antioxydante totale des extraits des parties aériennes d'*Artemisia campestris*

Extrait	Boussaâda ( $\mu\text{g EAA/ gms}$ )	Oum el bouaghi ( $\text{mg EAA/ gms}$ )
MOH	$801,73 \pm 0,13$	$957,6 \pm 0,12$
AQ	$56,53 \pm 0,50$	$233,41 \pm 0,54$

#### II.4.2. Activité antiinflammatoire

L'activité antiinflammatoire des extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est évaluée sur la base de leur capacité à inhiber la production de NO dans les macrophages de souris (RAW 264.7) activés par les LPS.

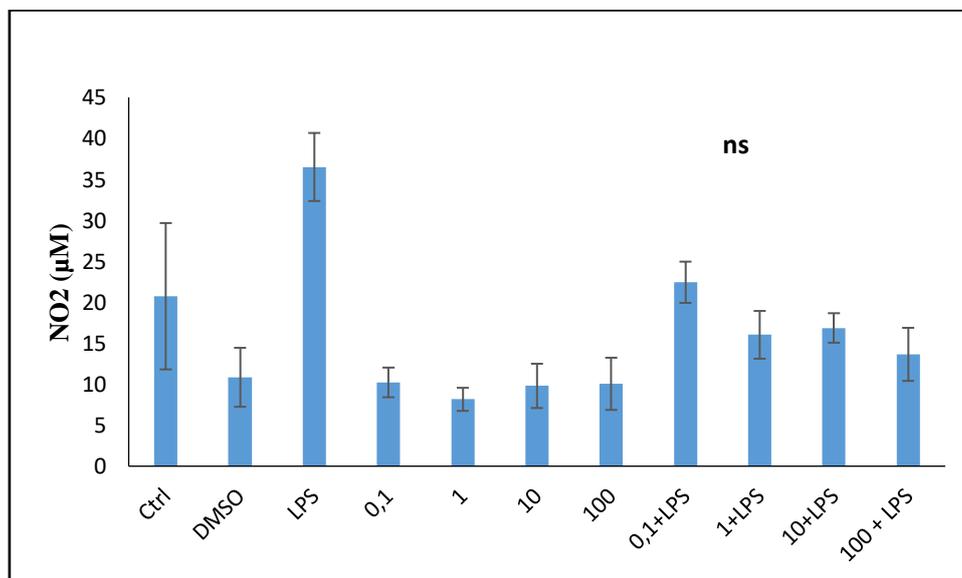
La stimulation des cellules de macrophages par les lipopolysaccharides (LPS) a provoqué une accumulation marquée de nitrite dans le milieu de culture. L'augmentation de la production de  $\text{NO}_2$  est un phénomène typique qui se produit dans les macrophages stimulés par les LPS et est utilisé comme indicateur d'une réponse inflammatoire typique (Jung *et al.*, 2013).

En présence des extraits méthanolique et aqueux à différentes concentrations et en présence de LPS, la libération de  $\text{NO}_2$  dans les cultures des monocytes (RAW 2647) est inhibée de manière dose dépendante.

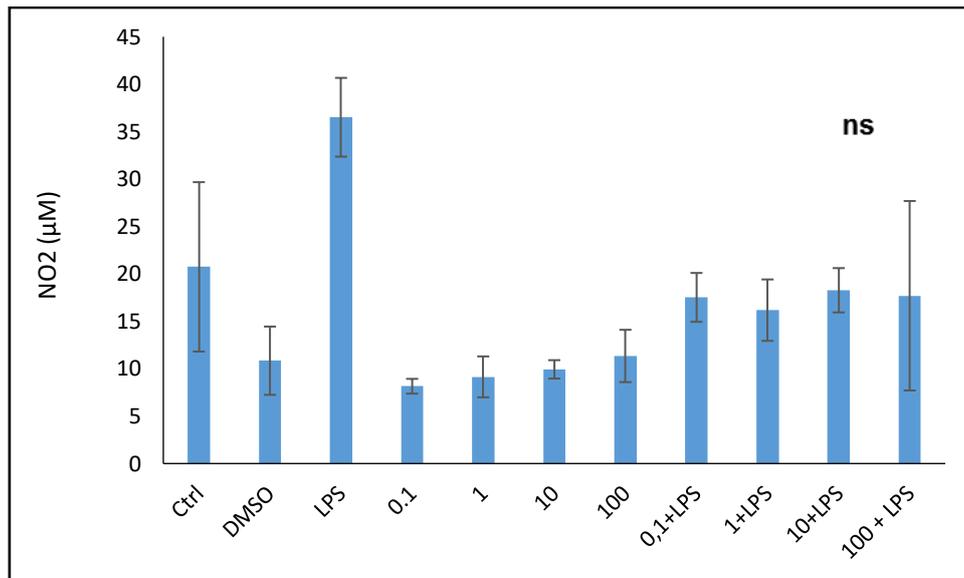
Les extraits méthanolique et aqueux à faible concentration (0.1µg/mL) diminuent la libération de NO<sub>2</sub> dans les cultures de RAW2647 de manière significative comparée aux proliférations basales (Fig. 30, 31).

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antiinflammatoires de la plante. Ghilissi *et al.*, (2016) ont montré que l'extrait aqueux des feuilles administré par voie intrapéritonéale, montre un effet anti-inflammatoire et analgésique dans l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.

L'activité anti-inflammatoire pourrait être due, en partie, à la présence de composés phénoliques et des flavonoïdes dans les extraits (Ghilissi *et al.*, 2016). De même Kazlowska *et al.*, (2010) ont suggéré que l'inhibition de l'action de l'enzyme de l'oxyde nitrique synthase (NOS) dans la cellule RAW 264.7 est due à l'action inhibitrice des flavonoïdes.

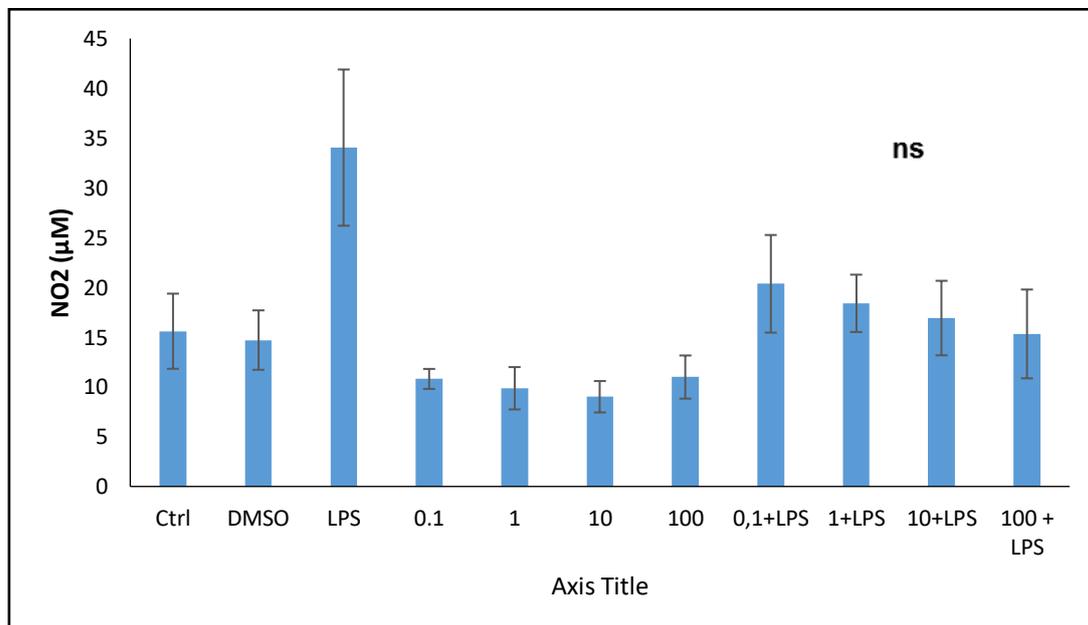


(a)

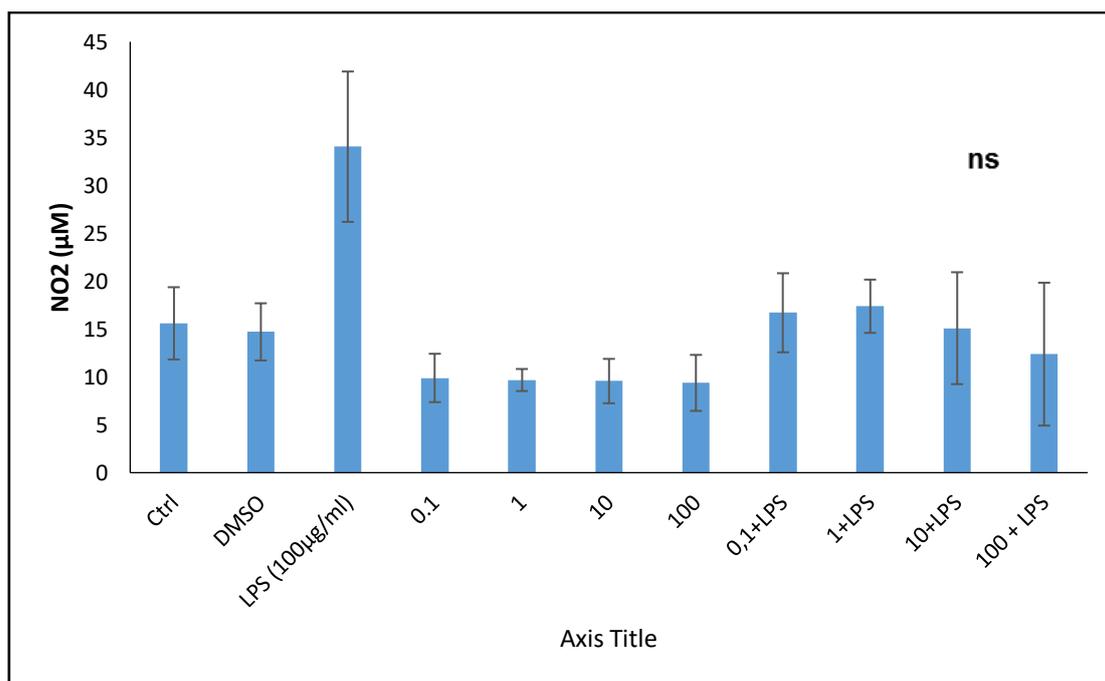


(b)

**Figure 30 :** Taux de NO<sub>2</sub> libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits aqueux d'*Artemisia campestris*. Les cellules ont été incubées en présence de LPS (100 ng/mL) et les extraits aqueux de 0.1-100µg/mL : (a) extrait de Boussaâda, (b) extrait d'OEB. La comparaison est réalisée avec le contrôle et LPS. ns: non significatif.



(a)

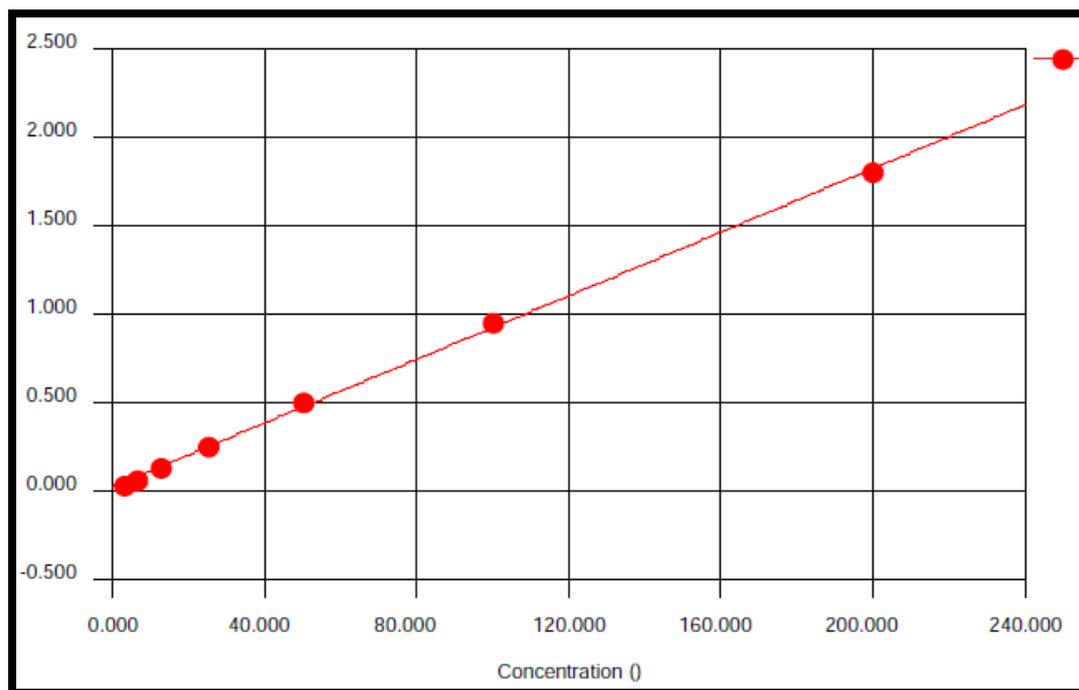


(b)

**Figure 31 :** Taux de NO<sub>2</sub> libéré par les monocytes lignée RAW2647 traités par les extraits méthanoliques d'*Artemisia campestris*. Les cellules ont été incubées en présence de LPS (100 ng/mL) et les extraits méthanoliques de 0.1-100µg/mL : (a) extrait de Boussaâda, (b) extrait d'OEB) (moyenne ± SD de douze essais).

**Tableau XVII :** Pourcentage d'inhibition de la production de NO par les extraits d'*Artemisia campestris*.

Concentration des extraits Extraits	Concentration des extraits			
	0,1(µg/mL)	1(µg/mL)	10(µg/mL)	100 (µg/mL)
MOH (Boussaâda)	40,21 ± 4,9	45,97 ± 2,88	50,31± 3,74	54,99 ± 4,46
AQ (Boussaâda)	38,53± 2,52	56,09± 2,91	53,80± 1,8	62,63± 3,24
MOH (Oum el bouaghi)	50,95 ± 4,13	48,95 ± 2,78	55,67 ± 5,84	63,64 ± 7,46
AQ (Oum el bouaghi)	51,54± 2,58	49,96 ± 3,24	55,70± 2,34	52,02± 9,98



**Figure 32 :** Droite d'étalonnage  $\text{NaNO}_2$  pour l'évaluation *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire

#### II.4.2.1. Effet cytotoxique

La mesure de la cytotoxicité a été effectuée sur des cellules de macrophages RAW 264.7 en culture avec les extraits méthanolique et aqueux d'*Artemisia campestris*.

Le test de viabilité est basé sur la transformation d'un sel de tétrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)] (MTT) en formazan par réduction enzymatique (Aslantürk, 2018).

L'anneau de tétrazolium qu'il contenait est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes métaboliquement actives. Le formazan est libéré sous forme de cristaux de couleur violette qui précipitent.

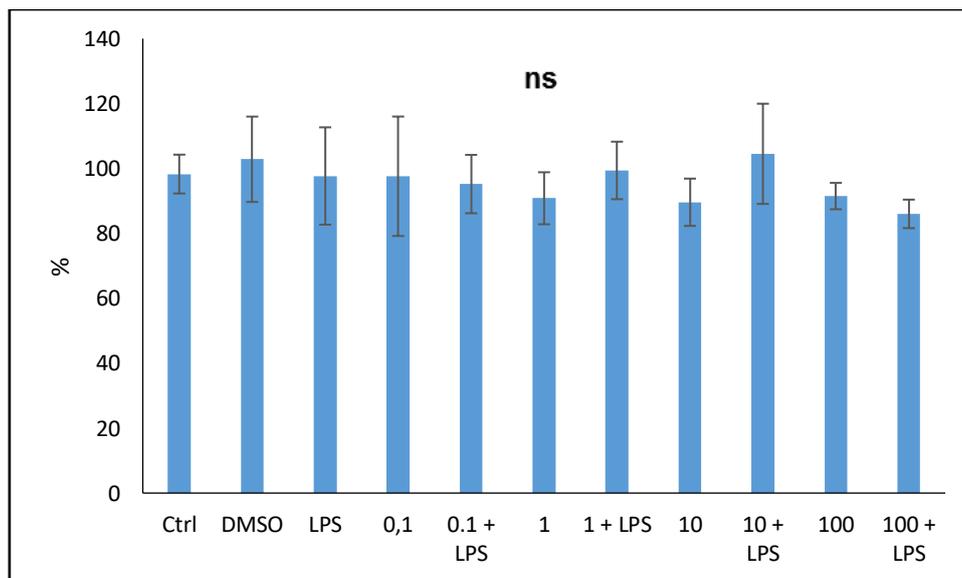
Les densités optiques obtenues après dosage spectrophotométrique à 570 nm ont servi pour établir des diagrammes montrant le pourcentage de viabilité cellulaire en fonction des concentrations des extraits (Figure 33).

D'après les résultats obtenus, les extraits n'ont pas manifesté de toxicité. A une concentration de  $10\mu\text{g/mL}$  la viabilité cellulaire est supérieure à 100 % pour l'extrait aqueux de la plante de la région de Boussaâda, et méthanolique de la région d'Oum el Bouaghi.

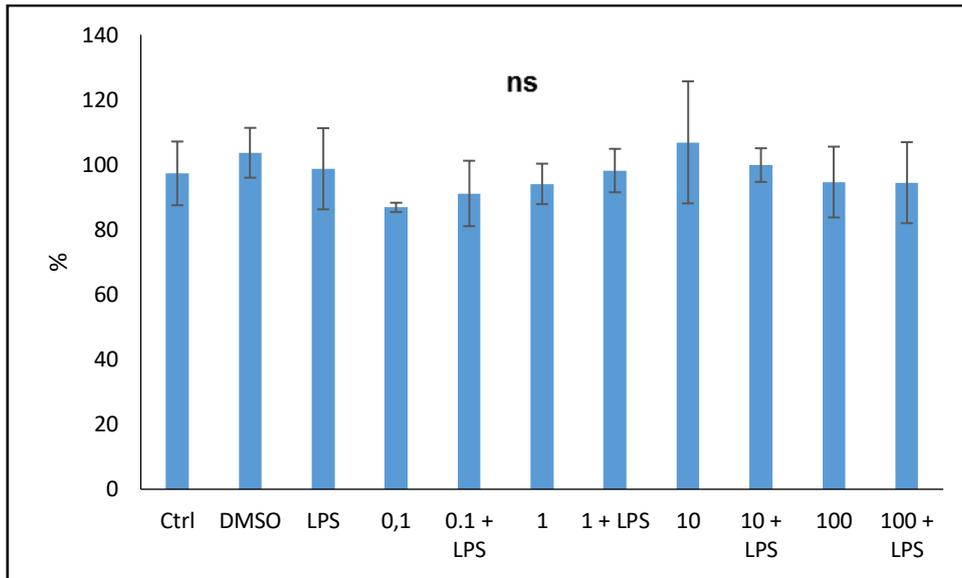
Ce dernier résultat peut s'expliquer par les réactions mises en jeu dans le test au MTT. En effet, ce test rend compte de l'activité mitochondriale des cellules : une absorbance supérieure au contrôle, perçue comme un pourcentage de cellules vivantes supérieur à 100 %, peut correspondre à une stimulation de l'activité enzymatique des cellules et en particulier, celle de la succinate déshydrogénase principalement impliquée dans ce test (Techer, 2013).

Akrouf et al. (2011) ont testé la cytotoxicité des extraits ainsi que des huiles, en utilisant une concentration (100 µg/ml), ils ont trouvé que l'huile essentielle présente une forte cytotoxicité avec un pourcentage de croissance égal à 19,56% suivi de l'extrait éthanol-eau (43,85%).

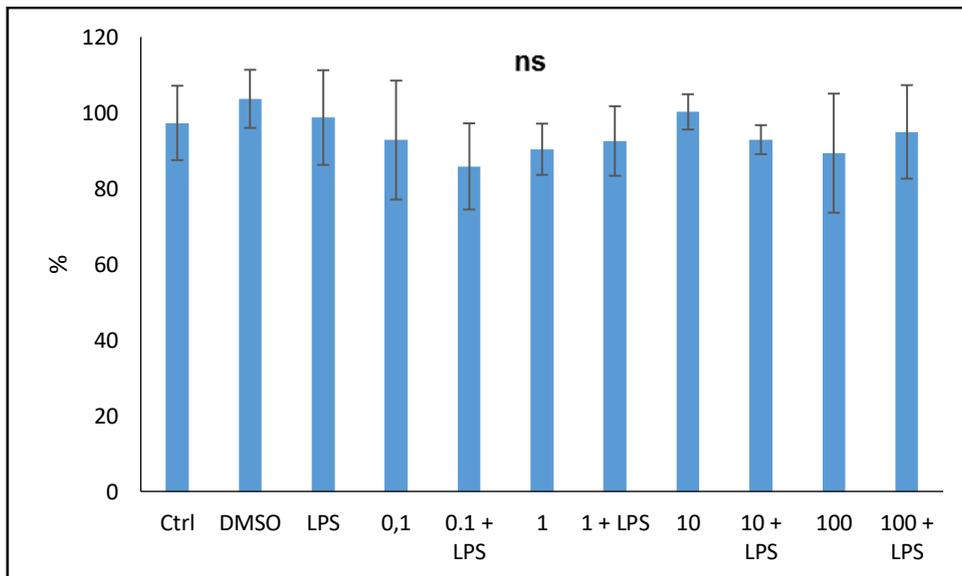
Dans une étude réalisée par Abd Manshooq *et al.* (2019) sur une autre espèce (*Artemisia sieberi*), sur les cellules de macrophage (RAW 264.7) à des concentrations comprises entre 6,25 et 12,5 µg/ml les extraits aqueux n'ont pas manifesté une cytotoxicité, par contre pour des concentrations situées entre 25 et 50 µg/ml les extraits inhibent la croissance avec des pourcentages de 29,5% et 43,1% successivement.



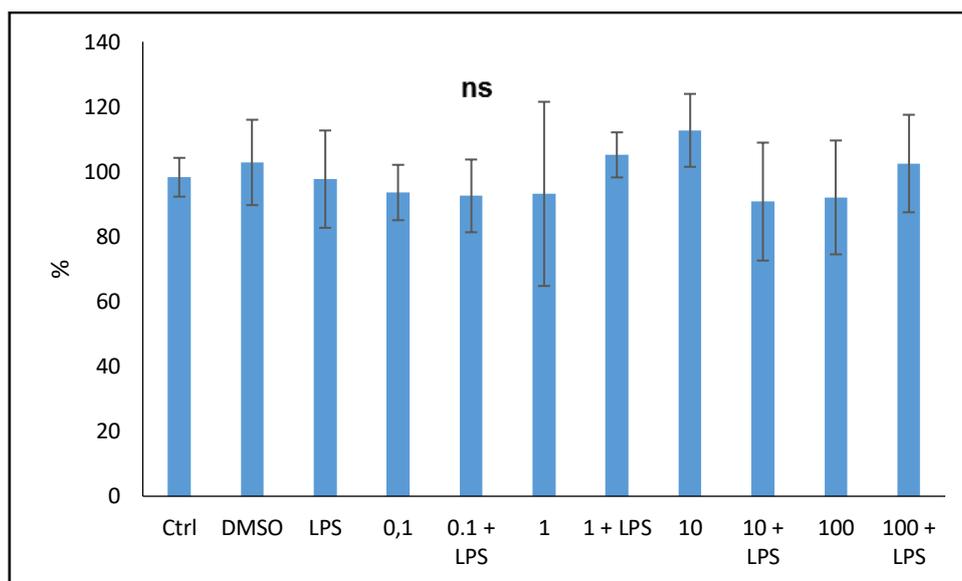
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figure 33 :** Pourcentage de viabilité des cellules de macrophages en présence des extraits d'*Artemisia campestris* et en présence ou en absence de LPS (100ng/mL) :a) EMOH Boussaâda, b) EAq de Boussaâda c) EAq d'OEB, d) EMOH d'OEB.

ns: non significatif. (moyenne  $\pm$  SD de quatre essais).

### II.4.3. Activité antimicrobienne

La méthode de diffusion des disques en milieu gélosé a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien des extraits d'*Artemisia campestris* vis-à-vis de six (6) bactéries référentielle Gram + et Gram - et une levure.

Dans le Tableau XVIII, sont reportés les diamètres d'inhibition et les antibiotiques de référence utilisés.

Les extraits de méthanol ont manifesté des effets inhibiteurs sur toutes les souches testées. Le plus fort effet a été observé pour l'extrait d'OEB sur *P. aeruginosa* et celui de l'extrait de Boussaâda sur *M. luteus*, *S. aureus* puis *P. aeruginosa*.

Les extraits aqueux de la plantes de différentes régions n'ont manifesté aucun effet inhibiteur ni sur les souches bactériennes ni sur la levure testées.

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* (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.

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.

Aligiannis 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*.

**Tableau XVIII :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries et de levure par les extraits d'*Artemisia campestris* de l'érythromycine et la ciprofloxacine. (NT: non testé)

Microorganismes	Extraits de plantes (100 mg/ml)				Erythromycine	Ciprofloxacine
	MeOH (BO)	Aq (BO)	MeOH (OEB)	Aq (OEB)	15µg	5µg
<i>B. cereus</i>	16.4±1.3	-	16.2 ± 0.5	-	31.9 ± 1.4	NT
<i>B. subtilis</i>	14.9 ± 1.2	-	15.2 ±2.0	-	35.8 ± 2.2	NT
<i>S. aureus</i>	17 ± 2.5	-	13.3 ± 0.9	-	20.7 ± 1.9	NT
<i>M. luteus</i>	17.5 ±1.0	-	15.9 ± 2.2	-	37.2 ± 1.9	NT
<i>E. coli</i>	10.8 ±0.9	-	11.8 ±1.7	-	NT	35.9 ±0.1
<i>P. aeruginosa</i>	16.8 ±1.0	-	19.2 ± 1.4	-	NT	38.1 ±1.9
<i>C. albicans</i>	10.8 ±0.9	-	11.9 ±2.1	-	NT	NT

#### **II.4.4. Activité anticholinestérase**

L'évaluation de l'activité anticholinestérase des extraits d'*Artemisia campestris* a été réalisée par l'utilisation de l'enzyme cholinestérase.

Aucun extrait n'a manifesté une activité inhibitrice de cette enzyme.

A notre connaissance il n'existe pas d'étude anticholinestérase réalisée sur les extraits d'*Artemisia campestris*.

D'après les travaux réalisés par Younsi et al. (2017) sur les huiles essentielles de deux espèces d'*Artemisia* : *A. campestris* et *A. herba alba*, à l'inverse de nos extraits, les deux huiles ont manifesté une activité inhibitrice considérable de l'enzyme.

Younsi et al. (2016) ont étudié l'activité de l'extrait méthanolique et de l'huile essentielle de l'espèce *Artemisia herba alba*, les résultats de l'étude montre que l'extrait ainsi que les l'huile exerce un effet inhibiteur considérable avec une CI50 de  $1200 \pm 167 \mu\text{g/mL}$  pour l'extrait méthanolique et  $165 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$  pour l'huile essentielle.

Qian Xu et al. (2019) montre que l'huile essentielle de la partie aérienne de l'espèce *Artemisia Gmelinii weber ex Stechm* possède une faible activité inhibitrice de l'enzyme d'acétyle choline avec une CI50 de  $341,7 \mu\text{g/mL}$ )

CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES

## **Conclusion et perspectives**

Dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et les activités biologiques des extraits organiques et aqueux de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*.

Afin d'identifier les classes phytochimiques majoritaires présentes, nous avons eu recours à des tests phytochimiques par plusieurs méthodes qualitatives basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration à l'aide des réactifs spécifiques. Les résultats de ce screening phytochimique confirment la richesse de cette plante en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes libres (flavones) et tanins).

Quantitativement, L'étude des extraits a montré des teneurs variées en polyphénols totaux, flavonoïdes et en tanins. Il ressort de ces analyses que *Artemisia campestris* est riche en flavonoïdes de types flavones et flavonols et en tannins.

Les profils HPLC TOF/MS des différents chromatogrammes ont révélé la présence de nombreux métabolites avec des temps de rétention très variables dont les pics majoritaires sont au nombre de deux pour les extraits d'OEB et trois pour les extraits méthanoliques et aqueux de Boussaâda.

L'évaluation, in vitro, de l'activité antioxydante des extraits par les méthodes ; piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP) et le blanchiment du  $\beta$ -carotène/acide linoléique, l'activité antioxydante totale (TAC) a révélé un pouvoir antioxydant modéré pour l'ensemble des extraits étudiés. Par contre, pour la méthode du blanchiment de la  $\beta$ -carotène, la plus importante activité antioxydante a été exercée par l'extrait méthanolique des pourcentages d'inhibition de l'ordre de  $85,18 \pm 2,41$  % et  $88,03 \pm 0,58$  %, pour les extraits de Boussaâda et Oum el Bouaghi respectivement.

Les résultats obtenus à l'issue de l'étude de l'activité anti-inflammatoire in vitro, réalisée sur des cellules de macrophages de souris (RAW 267.4), ont montré que les extraits exercent un effet anti-inflammatoire puissant.

Perspectives et recommandations :

- L'isolement, caractérisation et l'identification des composés actifs majoritaires,

### ***Conclusion et perspectives***

- Etudier les activités biologiques de ces métabolites *in vivo* et *in vitro*, pour mieux déterminer les principes actifs responsables de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

**Références bibliographiques**

- Abd Manshood, M., Al-Halbosiy, M. M., & Radhwan, M. M. (2019). *In vitro* cytotoxic activity of some wild plants extracts against RAW264. 7 cell line. *Plant Archives*, 19(2), 3983-3986.
- Agarwal, R., Gupta, S. K., Agarwal, P., Srivastava, S., & Alyayutdin, R. (2013). Anticholinesterase, antioxidant and nitric oxide scavenging activity of the aqueous extract of some medicinal plants. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 3(4), 807-816.
- Akkari, H., Rtibi, K., B'chir, F., Rekik, M., Darghouth, M. A., & Gharbi, M. (2014). *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet. Res. Comm.*, 38(3), 249-255.
- Akrouf, A., Chemli, R., Chreïf, I., & Hammami, M. (2001). Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour and fragrance journal*, 16(5), 337-339.
- Akrouf, A., Gonzalez, L. A., El Jani, H., & Madrid, P. C. (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 342-347.
- Al-Dalaen, S. M., and Al-Qtaitat, A. I. (2014). Oxidative stress versus antioxidants *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2(5), 60-71.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168-4170.
- Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Zaitoun, S. Y. A., and Qasem, I. B. (2014). *In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Func. Foods Health Dis*, 4(9), 381-400.
- Alkhatib, R. (2010). Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss (Apiacées).Thèse de Doctorat Sciences du médicament, Université Lille nord. p. 138.
- Al-Snafi, A. E. (2015). The pharmacological importance of *Artemisia campestris* - A review. *Asian J. Pharm.Res.*, 5(2), 88-92.
- Ambe, A. S., Camara, D., Ouattara, D., Yapo, C. Y., Soumahoro, A., Zirih, G. N., and N'Guessan, K. E. (2016). Etude ethnobotanique, évaluation *in vitro* de l'activité antifongique

## Références bibliographiques

et cytotoxique des extraits de *Enantia polycarpa* (DC) Engl. et Diels (Annonaceae). *Inter. J. Biol. Chem. Sci.*, 10(1), 23-34.

Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 32(7), 671-683.

Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem.Soc.*, 75(2), 199-212.

Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. Ed. InTechopen, London, 2018.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F. and Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.*, 117(4), 426-436.

Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Arom. Plants*, 4(3), 3-8.

Azzi, A., and Stocker, A. (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles. *Pro.Lipid Res*, 39(3), 231-255.

Bachiri, L., Echhegadda, G., Ibijbijen, J., and Nassiri, L. (2016). Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de lavande autochtones au Maroc: «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.»». *Europ. Sci. J*, 12 (30), 313.

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., ... & Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.

Bannwarth, B. (2005). Traitements anti-inflammatoires. Place des AINS classiques et des coxibs. *EMC-Médecine*, 2(5), 524-531.

Beaudeux, J. L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., and Legrand, A. (2006). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote: Implication dans

## Références bibliographiques

la transcription et la régulation des gènes. In : *Annales pharmaceutiques françaises* 64, (6), 373-381).

Belhattab, R., Larous, L., Kalantzakis, G., Boskou, D., & Exarchou, V. (2004). Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2, 69-73.

Belhattab, R., Boudjouref, M., Barroso, J. G., Pedro, L. P., and Figueirido, A. C. (2011). Essential oil composition from *Artemisia campestris* grown in Algeria. *Adv. Environ. Biol.* 5(2), 429-433.

Benkhniq, O., Zidane, L., Fadli, M., Elyacoubi, H., Rochdi, A., & Douira, A. (2010). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Barcinonensia*, 53, 191-216.

Bidgoli, R. D. (2018). Quantitative and qualitative comparaison of essential oils compounds in three *Artemisia* species for central rangeland of Iran

Bolou, G. E. K., Attioua, B., N'guessan, A. C., Coulibaly, A., N'guessan, J. D., and Djaman, A. J. (2011). Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bull. Soc.Royale Sci. Liège* 80, 772 - 790

Boonstra, J., and Post, J. A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337, 1-13

Bougandoura, N., and Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. *Nat. Tech.*, (9), 14

Bouhlel, I., Mansour, H. B., Limem, I., Sghaier, M. B., Mahmoud, A., Chibani, J. B., and Chekir-Ghedira, L. (2007). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 23(1), 56-63.

Bourkhiss, M. B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., and Satrani, B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bull. Soc.Royale Sci.Liège*, (79) 141 – 154.

## Références bibliographiques

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56(11), 317-333.
- Bribi, N., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Maiza, F., ... and Galvez, J. (2015). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of total alkaloid extract from *fumaria capreolata*. *Evidence-Based Compl. Alter. Med*, 1-7.
- Bruneton J (1999). Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition, Tec et Doc (ED) Paris, p. 647-673.
- Bouquet A (1972). Plantes Médicinales du Congo Brazzaville. Ed: O.R.S.T.O.M, Paris, p. 51.
- Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., and Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relation ships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.*, 78(25), 2872-2888.
- Caratini R. (1971). Bordas encyclopedie. Ed. *Bodas*, Belgique, p. 137-195.
- Cheurfa, M., & Allem, R. (2016). Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Phytothérapie*, 14(3), 181-187.
- Dai, J., and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Dan, Y. (2008). Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 44(3), 149-161.
- Defraigne, J. O., and Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev.Méd Liège*, 63, 10-19.
- Dejean, C., and Richard, D. (2013). Mécanismes d'action des glucocorticoïdes. *La Revue de médecine interne*, 34(5), 264-268.
- Diallo, A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense Willd.*(Myrtaceae). PhD. of the University Bamako, Mali, 38-47.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., and Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65(4), 337
- Dib, I., Angenot, L., Mihamou, A., Ziyyat, A., and Tits, M. (2017). *Artemisia campestris* L.: Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. *J. Herb. Med.* 7, 1-10.

## Références bibliographiques

- Dickinson, B. C., and Chang, C. J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.*, 7(8), 504.
- 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., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J. F., and Stocker, P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Tech.*, 224(6), 801-809.
- Dob, T., Dahmane, D., Berramdane, T., and Chelghoum, C. (2005). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris*. L. from Algeria. *Pharm. Biol.*, 43(6), 512-514.
- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5(5), 264-270.
- El Abed, N., Guesmi, F., Mejri, M., Marzouki, M., and Ben Hadj Ahmed, S. (2014). Phytochemical screening and assessment of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of five Tunisian medicinal plants. *Int J Pharm Res Biosci*, 3(4), 770-789
- Eldeen, I. M. S., Elgorashi, E. E., and Van Staden, J. (2005). Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *J. Ethnopharm.*, 102(3), 457-464.
- El Hilah Fatima, F. B. A., Dahmani, J., Belahbib, N., & Zidane, L. (2015). Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des infections du système respiratoire dans le plateau central marocain. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(2), 3886-3897.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Engler, R. (1993). Protéines de la réaction inflammatoire. *Veterinary Research*, 24(4), 337-343.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., and Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *J. Agric. Food Chem.*, 58(14), 8139-8144.
- Faure S., 2009. Les anti- inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités pharmaceutiques* 48, (489), 53-58.

## Références bibliographiques

- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108-115
- Fiedor, J., and Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488.
- Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, S., and Mouloud, Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12(1), 15-24.
- Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., and Oueld-Mokhtar, S. M. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : *structure*, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- Gheffour, K., Boucherit, K., and Boucherit-Otmani, Z. (2015). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 13(5), 288-294.
- Ghlissi, Z., Sayari, N., Kallel, R., Bougatef, A., and Sahnoun, Z. (2016). Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous extract in rat. *Biomed. Pharm.*, 84, 115-122.
- Guillonnet, M., & Jacqz-Aigrain, E. (1997). Traitement de la fièvre par l'acide acétylsalicylique. *Journal de pédiatrie et de puericulture*, 10(3), 136-143.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91(3), S14-S22.
- Halliwell, B., and Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*, 281(1-2), 9-19.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 476(2), 107-112.
- Hamed, B. N., Serria, H. T., Lobna, M., and Khaled, Z. (2014). Aqueous leaves extract of *Artemisia campestris* inhibition of the scorpion venom induced hypertension. *J. Med. Plants Res.*, 8(13), 538-542.
- Harborne JB, 1998. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman et Hall Thomson Science (UK), 234p

## **Références bibliographiques**

- Hennebelle, T., Sahpaz, S., and Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- Heo, S. J., Yoon, W. J., Kim, K. N., Ahn, G. N., Kang, S. M., Kang, D. H., and Jeon, Y. J. (2010). Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem. Toxicol.*, 48(8-9), 2045-2051.
- Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., & Drevet, J. R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. *The FEBS journal*, 274(9), 2163-2180.
- Herrera, E., and Barbas, C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.*, 57(1), 43-56.
- Hix, L. M., Lockwood, S. F., and Bertram, J. S. (2004). Bioactive carotenoids: potent antioxidants and regulators of gene expression. *Redox Report*, 9(4), 181-191.
- Hvoslef, J. (1968). The crystal structure of l-ascorbic acid, vitamin C'. I. The X-ray analysis. *Acta Crystallographica Section B*, 24(1), 23-35.
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A., and Sasner, J. J. (2003). Utilization of Folin–Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 51(7), 1811-1815.
- Ivanescu, B., Lungu, C., Vlase, L., Gheldiu, A. M., Grigorescu, C., & Corciova, A. (2018). Bioactive Compounds from *Artemisia campestris L. Subsp. Campestris*. *dementia*, 2, 3.
- Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., and Eloff, J. N. (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6(25).
- Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.*, 15(5), 755-766.
- Jenkins, R. R., Friedland, R., and Howald, H. (1984). The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. *Inter. J. Sports Med.*, 5(01), 11-14.
- Jung, H. A., Jin, S. E., Ahn, B. R., Lee, C. M., and Choi, J. S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages. *Food Chem. Toxicol.*, 59, 199-206.

## **Références bibliographiques**

- Kang, S. M., Kim, K. N., Lee, S. H., Ahn, G., Cha, S. H., Kim, A. D., ... and Jeon, Y. J. (2011). Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 80-85.
- Karabegović, I., Nikolova, M., Veličković, D., Stojičević, S., Veljković, V., & Lazić, M. (2011). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. recovered by different extraction techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(3), 504-511.
- Kassim, M., Achoui, M., Mustafa, M. R., Mohd, M. A., and Yusoff, K. M. (2010). Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate *in vitro* anti-inflammatory activity. *Nutr. Res.*, 30(9), 650-659.
- Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C. C., Yang, W. C., and Tsai, G. J. (2010). Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *J. Ethnopharm.*, 128(1), 123-130.
- Khettaf, A., Belloula, N., & Dridi, S. (2016). Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents of some wild medicinal plants in southeastern Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 15(13), 524-530.
- Khelifi, D., Sghaier, R. M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., and Bouajila, J. (2013). Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem.Toxicol.*, 55, 202-208.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., and Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharm. Sci.*, 96(3), 229-245.
- King, A. M. Y., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213-218.
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knezevic, S. A. N. D. A. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica*, 54(1), 65-72.
- Koldes S., Demirtas I., Ozen T., Demirci M.A. and Brhçte L. (2015). Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. viride (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J Sci Food Agric*, 95: 786–798.

## **Références bibliographiques**

- Kruidenier, L. A., and Verspaget, H. W. (2002). Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Alim. Pharm. Ther.*, 16(12), 1997-2015.
- Lee, J., Koo, N., and Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 3(1), 21-33.
- 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. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7292-7295.
- MacKenzie, S., Fernández-Troy, N., & Espel, E. (2002). Post-transcriptional regulation of TNF- $\alpha$  during in vitro differentiation of human monocytes/macrophages in primary culture. *Journal of leukocyte biology*, 71(6), 1026-1032.
- Mahmoudi, S., Khali, M., and Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nat.Tech.*, (9), 35.
- Martin, S., et Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In : *Ann. Cardiol.Angéol.*, 51, N°6, pp. 304-315).
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., and De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, 32(8), 595-603.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428.
- Megdiche-Ksouri, W., Trabelsi, N., Mkadmini, K., Bourgou, S., Noumi, A., Snoussi, M., ... and Ksouri, R. (2015). *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind. Crops Prod.*, 63, 104-113.
- Moreno, S., Mugnaini, E., and Cerù, M. P. (1995). Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 43(12), 1253-1267.
- Moualek, I., Aiche, G. I., Guechaoui, N. M., Lahcene, S., & Houali, K. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 937-944.
- Naili, M. B., Alghazeer, R. O., Saleh, N. A., & Al-Najjar, A. Y. (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arabian Journal of Chemistry*, 3(2), 79-84.

## ***Références bibliographiques***

- Nyau, V., Prakash, S., Rodrigues, J., and Farrant, J. (2015). Antioxidant activities of Bambara groundnuts as assessed by FRAP and DPPH assays. *Am. J. Food Nutr.*, 3, 7-11.
- Ognjanović, B. I., Pavlovic, S. Z., Maletic, S. D., Zikic, R. V., Stajin, A. S., Radojicic, R. M., and Petrovic, V. M. (2003). Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiol. Res.*, 52(5), 563-570.
- Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C., Ferreres, F., and Pereira, J. A. (2007). Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food chem.*, 105(3), 1018-1025.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., and Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (11), 3122-3128.
- Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology and medicine*, 19(2), 227-250.
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., ... and Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.*, 22(1), 18-35.
- Paiva, S. A., & Russell, R. M. (1999).  $\beta$ -carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American college of nutrition*, 18(5), 426-433.
- Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A., and Shah, A. (2009). In-vitro cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against Hela cell line and Vero cell line. *Inter. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 1(1), 38-46.
- Paul, A., Bryant, C., Lawson, M. F., Chilvers, E. R., & Plevin, R. (1997). Dissociation of lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide synthase and inhibition of DNA synthesis in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *British journal of pharmacology*, 120(8), 1439-1444.
- Pavela, R. (2009). Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.*, 105(3), 887-892

## **Références bibliographiques**

- Pavithra, K. S., Annadurai, J., & Ragunathan, R. (2018). Phytochemical, antioxidant and a study of bioactive compounds from *Artemisia pallens*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), 664-675.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Phatak, R. S., & Hendre, A. S. (2014). Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), 32-35
- Quezel et Santa. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Centre National de la Recherche Scientifique. 988-989.
- Raymondjean, M. (2007). Les mécanismes de l'inflammation périphérique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2007(389), 21-28.
- Razafindrambao, R. S. (1973). Etude d'une plante médicinale malgache *Buxus madagascariensis* Baill. et ses variétés. Ed. O.R.S.T.O.M, Paris, p. 28-29
- Riahi, L., Chograni, H., Elferchichi, M., Zaouali, Y., Zoghalmi, N., and MLiki, A. (2013). Variations in Tunisian worm wood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. *Ind.Crops Prod.*, 46, 290-296.
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., & Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 35(3), 275-283.
- Salah- Fatnassi, K. B. H., Slim- Bannour, A., Harzallah- Skhiri, F., Mahjoub, M. A., Mighri, Z., Chaumont, J. P., and Aouni, M. (2010). Activités antivirale et antioxydante *in vitro* d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. and Link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica*, 157(3), 433-444.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., and Masella, R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Isti. Sup.Sanita*, 43(4), 394.
- Saoudi, M., Ncir, M., Ben Ali, M., Grati, M., Jamoussi, K., Allouche, N., & El Feki, A. (2017). Chemical components, antioxidant potential and hepatoprotective effects of *Artemisia*

## **Références bibliographiques**

*campestris* essential oil against deltamethrin-induced genotoxicity and oxidative damage in rats. *Gen. Physiol. Biophys.*, 36, 331-342.

Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 11(4), 173-186.

Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F., & Aouni, M. (2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharmaceutical biology*, 45(5), 421-428.

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38(7), 995-1014.

Schofield, P., Mbugua, D. M., and Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 91(1-2), 21-40.

Sebai, H., Jabri, M. A., Souli, A., Hosni, K., Selmi, S., Tounsi, H., ... and Sakly, M. (2014). Protective effect of *Artemisia campestris* extract against aspirin-induced gastric lesions and oxidative stress in rat. *Rsc Advances*, 4(91), 49831-49841.

Sefi, M., Fetoui, H., Soudani, N., Chtourou, Y., Makni, M., and Zeghal, N. (2012). *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products. *Pathol.Res.Prac.*, 208(3), 157-162.

SFM (2008), Société Française de Microbiologie, Recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. P. 49.

Sgherri, C., Quartacci, M. F., Izzo, R., and Navari-Izzo, F. (2002). Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. *Plant Physiol. Biochem.*, 40 (6-8), 591-597.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In Methods in enzymology* 299, 152-178.

Shon, M. Y., Lee, J., Choi, J. H., Choi, S. Y., Nam, S. H., Seo, K. I., ... & Park, S. K. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of chungkukjang. *Journal of food composition and analysis*, 20(2), 113-118.

Stahl, W., and Sies, H. (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, 46 (2),14-18.

## **Références bibliographiques**

- Stamenic, M., Vulic, J., Djilas, S., Misic, D., Tadic, V., Petrovic, S., and Zizovic, I. (2014). Free-radical scavenging activity and antibacterial impact of Greek oregano isolates obtained by SFE. *Food chem.*, 165, 307-315.
- Sultana, B., Anwar, F., and Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167-2180.
- Széles, L., Töröcsik, D., and Nagy, L. (2007). PPAR $\gamma$  in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. Lipids*, 1771(8), 1014-1030.
- Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N., & Mathe, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(4), 200-207.
- Techer, S. (2013). Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion-Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Thèse de doctorat, Université de la Réunion). p. 69
- Thabit, R. A., Cheng, X. R., Al-Hajj, N. A. B. I. L., Rahman, M. R. T., and Lei, G. (2014). Antioxidant and Conyza bonariensis: A review. *Eur. Acad. Res*, 2, 8454-8474.
- Valant-Vetschera, K. M., Fischer, R., & Wollenweber, E. (2003). Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae—Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochemical systematics and ecology*, 31(5), 487-498.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, 39(1), 44-84.
- Yun, K. W., Maun, A., and Kim, J. H. (2007). Effects of the aqueous extract from *Artemisia campestris* ssp. caudata on mycorrhizal fungi colonization and growth of sand dune grasses. *J. Plant Biol.*, 50(3), 358-361.
- Yoon, S. B., Lee, Y. J., Park, S. K., Kim, H. C., Bae, H., Kim, H. M., ... & Park, W. (2009). Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of ethnopharmacology*, 125(2), 286-290.
- Younsi, F., Trimech, R., Boulila, A., Ezzine, O., Dhahri, S., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2016). Essential oil and phenolic compounds of *Artemisia herba-alba* (Asso.): Composition, antioxidant, antiacetylcholinesterase, and antibacterial activities. *International journal of food properties*, 19(7), 1425-1438.

## ***Références bibliographiques***

Younsi, F., Mehdi, S., Aissi, O., Rahali, N., Jaouadi, R., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2017). Essential Oil Variability in Natural Populations of *Artemisia campestris* (L.) and *Artemisia herba-alba* (Asso) and Incidence on Antiacetylcholinesterase and Antioxidant Activities. *Chemistry & biodiversity*, 14(7), e1700017.

Xu, Q., Zhang, L., Yu, S., Xia, G., Zhu, J., & Zang, H. (2019). Chemical composition and biological activities of an essential oil from the aerial parts of *Artemisia Gmelinii weber ex Stechm. Natural product research*, 1-4.

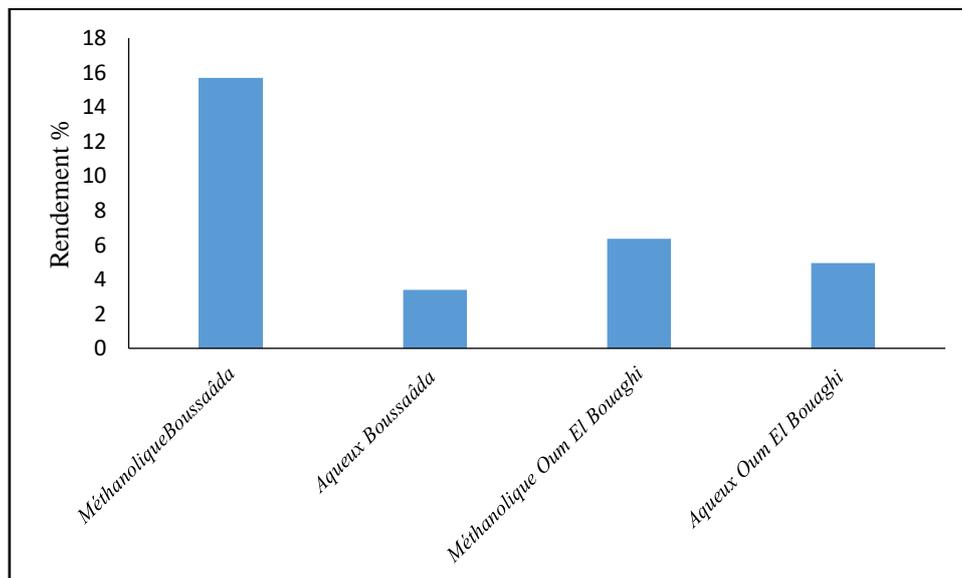
Zelko, I. N., Mariani, T. J., and Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad. Biol.Med.*, 33(3), 337-349.

Zerbato, M. (2010). Intérêt du dosage par micro méthode de la Protéine C Réactive au cabinet de pédiatrie, Thèse de doctorat Université Henri Poincaré. p. 8

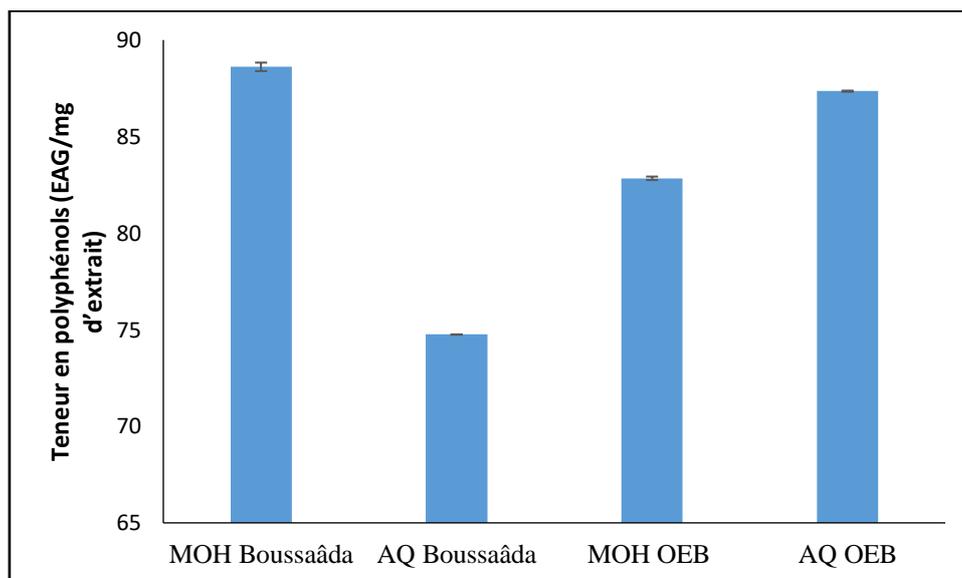
# ANNEXES

## Annexes

### Annexe 1 : Les rendements des extraits d'*Artemisia campestris*

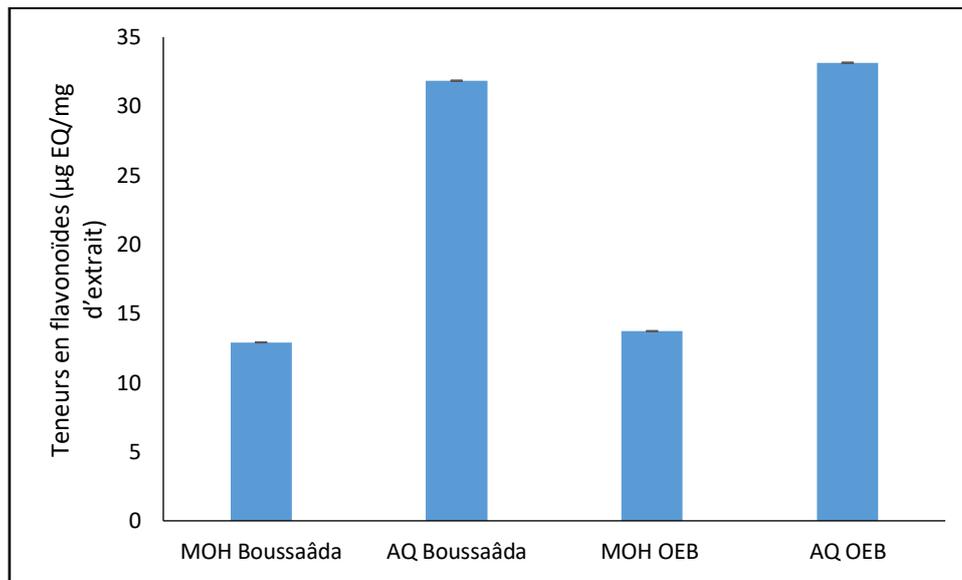


### Annexe 2 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits d'*Artemisia campestris*

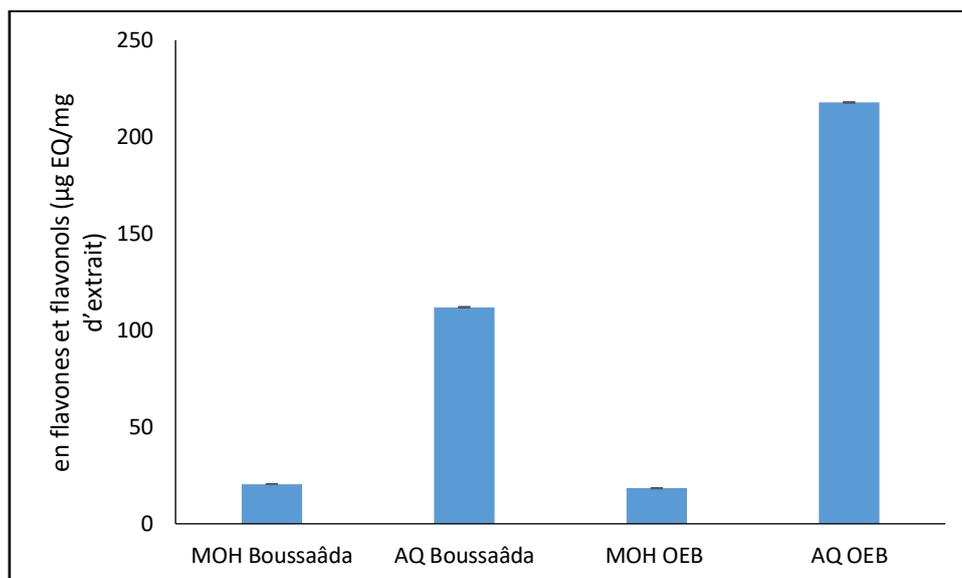


## Annexes

### Annexe 3 : Teneurs en flavonoïdes des extraits d'*Artemisia campestris*

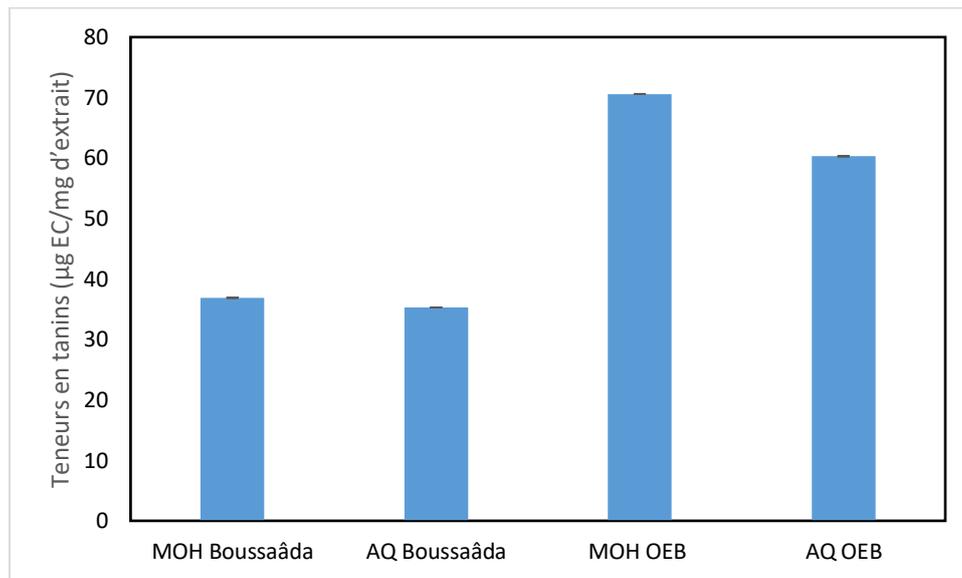


### Annexe 3 : Teneurs en flavones et flavonols des extraits d'*Artemisia campestris*

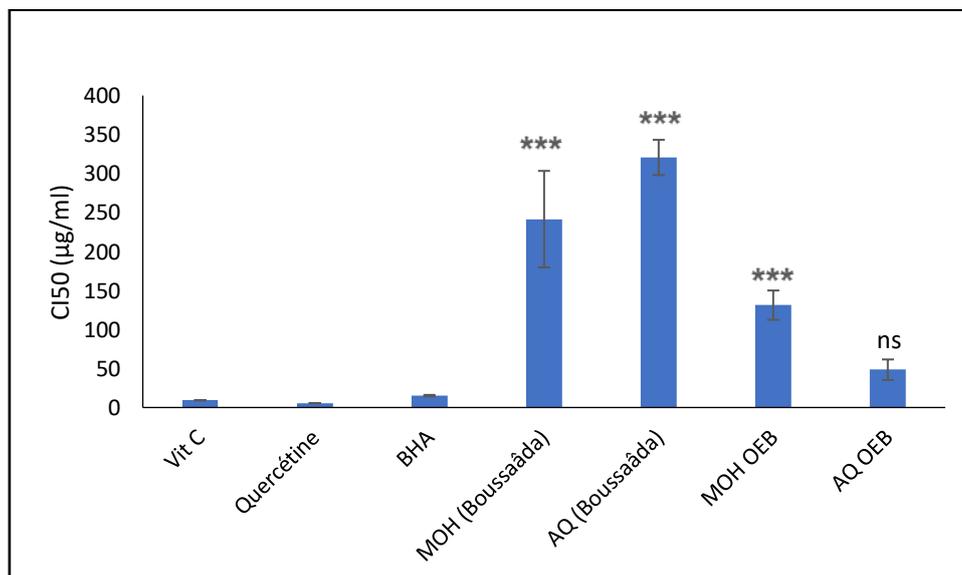


## Annexes

### Annexe 4 : Teneurs en tanins dans les extraits d'*Artemisia campestris*

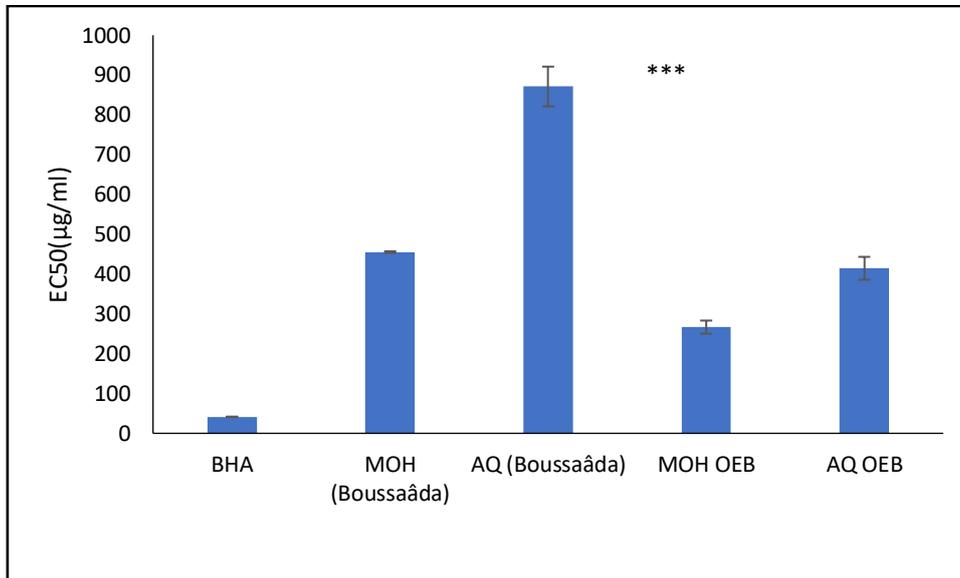


**Annexe 5 :** Activité anti-radicalaire des extraits d'*Artemisia campestris* et des témoins positifs (BHA, Ac ascorbique, quercétine). Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. La comparaison est réalisée avec le BHA. ns: non significatif, \*\*\* :  $P \leq 0,0001$

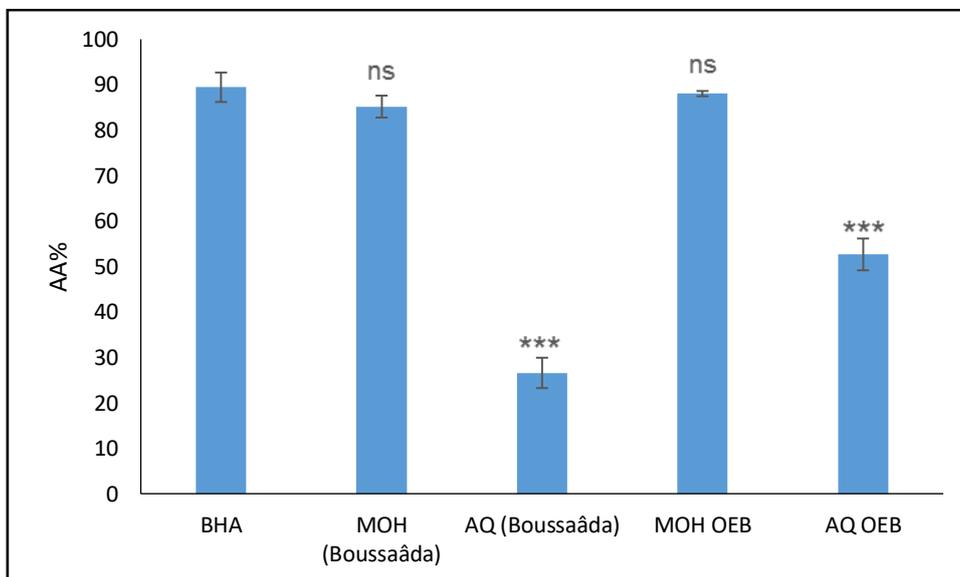


## Annexes

**Annexe 6 :** Le pouvoir réducteur des extraits d'*Artemisia campestris* et de BHA. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. La comparaison est réalisée avec le BHA. \*\*\* :  $P \leq 0,0001$



**Annexe 7 :** Activité antioxydante des extraits d'*Artemisia campestris*, de BHA dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique. Les valeurs sont la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. La comparaison est réalisée avec le BHA. ns: non significatif, \*\*\* :  $P \leq 0,0001$ .



**Annexes**

**Annexe 8 :**

**Composition du milieu Mueller-Hinton :**

Extrait de viande de boeuf : 2.0g.

Peptone de caséine : 17.5g.

Amidon de maïs : 1.5g.

Agar : 17.0g.

pH : 7.4.

**Annexe 9 :**

**Composition du milieu Sabouraud :**

Peptone : 10,0 g.

Glucose massé : 20,0 g.

Agar : 15,0 g.

pH = 6,0.

**Annexe 10 : Absorbance des extraits lors de test de l'acétyl choline estérase**

	AM (OEB)				AA (OEB)			AM (BOU)			AA (BOU)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	4,95901639	13,0532787	5,06147541	3,54508197	9,32377049	0,45081967	16,2704918	1,12704918	3,91393443	41,4139344	20,8196721	10,307377	<b>200</b>
<b>B</b>	-12,6229508	21,2909836	5,45081967	14,4877049	29,795082	7,02868852	22,1721311	11,045082	23,4631148	32,4385246	14,3032787	31,7622951	<b>100</b>
<b>C</b>	-28,7295082	6,65983607	4,32377049	18,2377049	92,2540984	20,3688525	14,1188525	21,1885246	18,2991803	21,0040984	29,9795082	28,9344262	<b>50</b>
<b>D</b>	11,352459	6,96721311	-22,397541	90,3483607	8,64754098	16,7418033	6,72131148	25,6557377	24,7540984	39,8770492	36,9877049	25,3688525	<b>25</b>
<b>E</b>	5,32786885	17,1721311	11,7622951	32,2336066	19,0163934	1,70081967	0,16393443	1,12704918	6,35245902	24,692623	40,3688525	37,3565574	<b>12,5</b>
<b>F</b>	9,32377049	4,87704918	35,1844262	10,7377049	5,94262295	8,27868852	5,32786885	1,63934426	8,70901639	24,2008197	45,5327869	48,9754098	<b>6,25</b>
<b>G</b>	0,71721311	33,2172131	5,36885246	5,0204918	9,11885246	8,83196721	5,6352459	0,84016393	17,4385246	27,9508197	41,1680328	31,147541	<b>3,125</b>

## Annexes

### Annexe 11 : Changement de couleur après temps $t = 0$ min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,998	1,145	1,057	0,868	0,496	0,928	0,875	0,925	0,956	0,311	0,511	0,600
B	1,132	1,170	0,878	0,526	0,407	0,877	0,659	0,751	0,676	0,353	0,593	0,392
C	1,248	1,006	0,920	0,564	0,119	1,060	0,678	0,699	0,648	0,587	0,427	0,415
D	0,758	1,016	1,094	0,147	0,833	0,961	0,852	0,938	0,598	0,415	0,318	0,551
E	0,865	1,090	0,956	1,279	1,089	0,769	0,783	0,794	0,791	0,512	0,320	0,428
F	0,698	1,086	1,179	0,710	0,832	0,818	0,758	0,734	0,753	0,592	0,340	0,308
G	0,973	1,225	0,995	0,786	0,920	0,752	0,769	0,790	0,621	0,511	0,366	0,507
H	0,990	0,859	1,062	0,888	0,911	0,648	0,752	0,748	0,597	0,468	0,422	0,463

### Annexe 12 : Changement de couleur après temps $t = 15$ min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,546	1,839	1,709	1,569	1,475	1,634	1,362	1,645	1,563	0,953	1,288	1,459
B	1,832	1,973	1,538	1,391	1,142	1,741	1,266	1,447	1,245	1,099	1,394	1,110
C	2,094	1,735	1,697	1,330	0,126	1,958	1,397	1,282	1,329	1,285	1,139	1,156
D	1,442	1,740	1,991	0,157	1,486	1,899	1,736	2,044	1,224	0,978	1,025	1,214
E	1,540	1,906	1,818	2,151	1,936	1,599	1,624	1,645	1,730	1,225	0,970	1,019
F	1,475	1,706	2,199	1,452	1,530	1,492	1,540	1,600	1,485	1,233	0,886	0,830
G	1,615	2,167	1,714	1,545	1,775	1,483	1,535	1,613	1,343	1,172	0,957	1,120
H	1,649	1,588	1,945	1,587	1,716	1,275	1,412	1,462	1,228	1,161	1,108	0,999

## الملخص

تهدف هذه الدراسة لمعرفة التركيب الكيميائي للجزء العلوي لنباتة *Artemisia campestris* من جهة وتقدير النشاط المضاد للأكسدة، المضاد للمكروبات والمضاد للالتهابات من جهة أخرى. تم الحصول على المستخلصات باستعمال طريقة الغلي (المستخلص المائي) والنقع (المستخلص الميثانولي). تم إجراء عمليات التحليل الكيميائي بغية تحديد كمية عديدات الفينول الكلية، الفلافونيدات والديباغ، تحديد المركبات الفينولية تم باستخدام كروماتوغرافيا الضغط العالي.

تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة باستعمال طريقة DPPH، ابيضاض بيتاكاروتين/حمض اللينوليك، خلب الحديد و القوة الارجاعية. أما النشاط المضاد للميكروبات تم تحديدها باستخدام طريقة قياس قطر التثبيط وتحديد التراكيز الدنيا المثبطة، بينما تم تحديد النشاط المضاد للالتهابات باستخدام اختبار النترت باستعمال الخلايا البالعة RAW264.7.

يتراوح المحتوى الفينولي بين  $0,01 \pm 74,75$  و  $0,22 \pm 88,61$  مع مكافئ من حمض الغاليك لكل غرام من المستخلص، محتوى الفلافونيدات ما بين  $12,91 \pm 0,01$  و  $33,14 \pm 0,01$  مع مكافئ الكرسيتين /غرام من المستخلص و الديباغ تتراوح ما بين  $35,29$  و  $70,59$  مع مكافئ من الكاتشين / غرام من المستخلص. اظهر المستخلص الميثانولي نشاطا مضادا للأكسدة بدرجة معتبرة في اختبار DPPH ( $131,19 \pm 18,81$  ميكروغرام /مل)، البيتاكاروتين /حمض اللينوليك ( $58 \pm 88,03$  بالمئة)، خلب الحديد ( $16,51 \pm 266,74$  ميكروغرام /مل). أظهرت كل المستخلصات انعدام النشاط المضاد للأستيل كولين استيراز في حين كانت النشاطية المضادة للالتهابات قوية. النشاطية المضادة للميكروبات كانت ضعيفة مع جميع المستخلصات.

**كلمات البحث:** *Artemisia campestris*, التحليل الكيميائي، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط المضاد للميكروبات.

## Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer la composition phytochimique des extraits de la partie aérienne de la plante *Artemisia campestris* d'une part et d'évaluer les activités antioxydantes, anticholinestérase, antiinflammatoire et antibactérienne d'autre part.

Les extraits sont obtenus par décoction (extrait aqueux) et macération (extrait méthanolique). Un screening chimique suivi par le dosage des polyphénols, des flavonoïdes, flavones et flavonols et des tanins a été effectué. La séparation et l'identification des composés phénoliques a été réalisée par HPLC TOF / MS. L'activité antioxydante a été évaluée par les tests DPPH,  $\beta$ -carotène/acide linoléique, chélation du fer et le pouvoir réducteur. L'activité anticholinestérase a été évaluée par la méthode d'Ellman alors que l'activité antiinflammatoire des extraits a été évaluée selon le test de nitrite en utilisant des macrophages RAW 264.7. L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant la zone d'inhibition autour des disques et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). La teneur en polyphénol totaux variait entre  $74,75 \pm 0,01$  et  $88,61 \pm 0,22$  mg EAG / g d'extrait; Les flavonoïdes totaux entre  $12,91 \pm 0,01$  et  $33,14 \pm 0,01$  mg EQ / g d'extrait; les flavones et les flavonols entre  $18,37 \pm 0,01$  à  $217,75 \pm 0,01$  mg EQ / g d'extrait et celle des tanins entre  $35,29$  et  $70,59$  mg EC / g d'extrait. L'extrait de méthanol a montré une activité antioxydante modérée; DPPH (CI50 =  $131,19 \pm 18,81$   $\mu$ g/mL),  $\beta$ -carotène / acide linoléique (AA% =  $88,03 \pm 0,58$ ), la chélation du fer (CI50 =  $266,74 \pm 16,51$   $\mu$ g/mL). Cependant, aucun extrait n'a montré une activité anticholinestérase, au contraire tous les extraits ont manifesté une forte activité antiinflammatoire. Une activité antimicrobienne faible a été observée avec l'ensemble des extraits.

**Mots clés :** *Artemisia campestris*, screening chimique, activité antioxydante, activité antiinflammatoire, activité antimicrobienne.

## Abstract

The aim of this study was to determine the phytochemical composition of *Artemisia campestris* aerial part extracts on one hand and to evaluate the antioxidant, anti-cholinesterase, anti-inflammatory and the antimicrobial activities on another hand. The extracts were obtained by decoction (aqueous extract) and maceration (hydro-methanolic extract). A phytochemical screening followed by the determination of polyphenols, flavonoids, flavons and flavonols and tannins was carried out. Separation and identification of phenolic compounds were achieved using HPLC TOF/MS. The antioxidant activity was assessed according to DPPH,  $\beta$ -carotene/linoleic acid, iron chelating ability and reducing power methods. The anticholinesterase activity was evaluated by using Ellman's method whether the antiinflammatory activity according to the nitrite test using RAW 264.7 macrophage cell. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition zone and determination of the minimal inhibitory concentrations (MIC). Total phenol content varied from  $74,75 \pm 0,01$  to  $88,61 \pm 0,22$  mg EAG / g extract; total flavonoids ranged from  $12,91 \pm 0,01$  to  $33,14 \pm 0,01$  mg QE/g extract; the flavons and flavonols ranged from  $18,37 \pm 0,01$  to  $217,75 \pm 0,01$  mg QE/g extract; and tannins ranged between  $35,29$  and  $70,59$  mg EC / g extract. The methanol extract showed moderate antioxidant activity; against the free radical DPPH (IC 50 =  $131,19 \pm 18,81$   $\mu$ g / mL),  $\beta$ -carotene / linoleic acid (AA% =  $88,03 \pm 0,58$ ), iron chelating ability (IC 50 =  $266,74 \pm 16,51$   $\mu$ g / mL). However, no extract showed anticholinesterase activity, in contrast all extracts showed a strong anti-inflammatory activity. A weak antimicrobial activity was observed with all extracts.

**Key words:** *Artemisia campestris*, chemical screening, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, anticholinesterase activity, antimicrobial activity