



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie appliquée

قسم: البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et Biothérapie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Investigations biologiques et pharmacologiques de l'extrait hydro-méthanolique d'*Anastatica hierochuntica* : approches *in vitro* et *in vivo*

Présenté par : Mlle. GUIDOUM Houria

Le : 22/06/2025

Mlle. DENECH Amira Malak

Jury d'évaluation :

Président : Pr. MOSBAH Asma (Professeur – Univ. Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Dr. HALMI Sihem (MCA- Univ. Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinateur(s) : Dr. GHORRI Sana (MCA- Univ. Constantine 1 Frères Mentouri).

**Année universitaire
2024 – 2025**

Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons nos sincères remerciements à Dieu pour nous avoir donné le courage et la force nécessaires pour accomplir ce travail, ainsi que pour sa bienveillance tout au long de notre parcours.

Nous exprimons toute notre gratitude à notre encadrante, Madame **Dr. HALMI Sihem**, pour son encadrement, son soutien constant, ses encouragements, ainsi que pour la confiance qu'elle nous a accordée en acceptant de diriger ce travail. Nous la remercions également pour ses précieux conseils qui nous ont permis de mieux maîtriser notre sujet.

Nous adressons nos vifs remerciements à Madame **Pr. MOSBAH Asma** pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Nos remerciements vont également à Madame **Dr. GHORRI Sana**, membre du jury en tant qu'examinatrice, pour avoir eu l'amabilité de juger notre travail.

Nos remerciements s'adressent également aux ingénieurs des laboratoires de l'Université Constantine 1, en particulier Madame Mouna, pour leur aide précieuse et leurs conseils continus.

Nous remercions l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation tout au long de notre parcours universitaire. Nous tenons à leur exprimer notre sincère reconnaissance pour leur patience, leur bienveillance, leurs sacrifices et leurs encouragements.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire, ainsi que tous ceux qui nous ont soutenus et encouragés durant cette période.

{Citation}

Dédicace

Alhamdulillah.

Sans l'aide d'Allah, je n'aurais jamais pu arriver jusqu'ici.

C'est Lui qui m'a donné la force, la patience et la capacité d'avancer malgré les difficultés.

À ma chère maman,

La personne la plus précieuse dans ma vie.

Tu as toujours été là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments.

Tu es mon premier soutien, celle qui a cru en moi quand moi-même j'avais des doutes.

Ton amour, tes sacrifices et ta patience sont les vraies raisons de ma réussite.

Tu as toujours mis mes besoins avant les tiens, et pour cela, je te serai reconnaissante toute ma vie.

Ce mémoire t'est dédié, maman,

car derrière chaque mot écrit, il y a un peu de ton cœur, de ton courage, et de ton amour.

À tous ceux qui m'ont aidée et encouragée

Merci du fond du cœur pour votre présence votre soutien et vos paroles motivantes tout au long de ce parcours

Houria

Dédicace

À mes parents

Pour votre amour inconditionnel, votre soutien indéfectible et les sacrifices qui m'ont permis de poursuivre mes études dans les meilleures conditions. Ce mémoire est le fruit de vos encouragements constants et de votre foi en mes capacités.

À ma famille

Pour votre présence réconfortante et vos encouragements à chaque étape de ce parcours. Vous êtes ma source de force et de motivation.

À ma sœur

Pour ta patience, tes conseils et ton soutien moral tout au long de cette aventure académique. Ta confiance en moi a été une lumière dans les moments difficiles.

À mes amis

Pour votre camaraderie, vos encouragements et les moments partagés qui ont rendu ce voyage plus agréable et enrichissant.

À tous ceux qui ont cru en moi

Ce mémoire vous est dédié, en témoignage de ma gratitude et de mon admiration pour votre soutien.

Malak

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....	1
Synthèse Bibliographique.....	3
Chapitre1 : Caractéristiques générales d'<i>Anastatica hierochintica</i>	1
 1 Caractéristiques générales d'<i>Anastatica hierochintica</i>	1
 1.1 Généralités sur la plante.....	1
 1.2 Classification botanique et distribution géographique	2
 1.2.1 Classification scientifique	2
 1.2.2 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE	2
 1.3 Composition chimique	3
 2.3.1 Métabolites primaires.....	3
 2.3.2 Métabolites secondaires	3
 2.3.3 Les minéraux.....	3
 1.4 Activités thérapeutiques d'<i>Anastatica hierochintica</i>	4
 2.4.1 Effet sur la fertilité et la grossesse	4
 2.4.2 Effet anti-inflammatoire.....	4
 2.4.3 Effet antibactérien.....	5
 2.4.4 Effet antifongique	5
 2.4.5 Effet gastroprotecteur.....	5
 2.4.6 Effet hépatoprotecteur.....	6
 2.4.7 Effet hypoglycémiant et hypolipidémiant.....	6
 2.4.8 Effet anticancéreux	6
 2.4.9 Effet antioxydant.....	7
 2.4.10 Effet immunostimulateur	7
 1.5 Données toxicologiques et effets indésirables	7
 Chapitre 2 : Stress oxydatif.....	1
 2 Stress oxydatif	1
 2.1 Définition du stress oxydatif.....	1

2.2 Les radicaux libres	2
2.2.1 Sources des radicaux libres	2
2.3 Conséquences du stress oxydatif.....	4
2.3.1 Rôle physiologique	4
2.3.2 Rôle pathologique	4
2.4 Etude sur <i>Anastatica hierochuntica</i>	6
2.5 Les antioxydants.....	6
2.5.1 Le système antioxydant enzymatique	7
2.5.2 Le système antioxydant non enzymatique	9
Partie expérimentale25
3 Matériel et méthodes	13
3.1 Matériel végétal	14
3.1.1 Préparation des extraits	14
3.2 Analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes	15
3.2.1 Dosage des polyphénols totaux.....	15
3.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	16
3.2.3 Expression des résultats	16
3.3 Activités biologiques <i>in vitro</i>	16
3.3.1 Évaluation de l'activité antioxydante par le radical DPPH	16
3.3.2 Activité antibactérienne	18
3.4 Activités <i>in vivo</i>	23
3.4.1 Évaluation de l'activité antiulcèreuse	23
3.4.2 Observation histologique des tissus gastriques.....	26
3.4.3 Evaluation de l'activité Analgésique	27
3.4.4 Évaluation de l'activité sur la cyclicité œstrale chez la rate	29
4 Résultats et discussions	32
4.1 Calcul du rendement.....	33
4.2 Analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes	33
4.2.1 Teneur en polyphénols totaux	33
4.2.2 Teneur en flavonoïdes totaux	34

4.3 Activités <i>in vitro</i>	36
4.3.1 Activité anti-oxydante.....	36
4.3.2 Activité antibactérienne	38
4.4 Activités biologique <i>in vivo</i>	45
4.4.1 Evaluation de l'activité anti-ulcéruse.....	45
4.4.2 Observation histologique des tissus gastriques.....	47
4.4.3 Evaluation de l'activité Analgésique	51
4.4.4 Évaluation de l'activité de sur la cyclicité œstrale chez la rate	55
5 Conclusion.....	57

Références bibliographiques

Résumé

Liste des tableaux

Table 1. Souches bactériennes	18
Table 2. Répartition des différents lots selon le type du traitement administré	24
Table 3. Répartition des différents lots selon le type de suspension administré	28
Table 4. Valeur d'absorbance de l'extrait mesurée à 430 nm	35
Table 5. Variation des absorbances et pourcentage de réduction du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait d' <i>A. hierochuntica</i>	37
Table 6. Activité antibactérienne de l'extrait	40
Table 7. Sensibilité des souches testées a l'extrait.....	43
Table 8. Comparaison de l'effet gastro-protecteur de l'extrait d' <i>Anastatica hierochuntica</i> ..	46
Table 9. Résultats de comptage des crampes	51
Table 10. Récapitulatif des résultats en moyenne et % de réduction	52

Liste des figures

Figure 1. La plante d' <i>Anastatica hierochuntica</i> dans le sud-ouest du Maroc	1
Figure 2. Distribution géographique	2
Figure 3. Illustration botanique de la rose de Jéricho	8
Figure 4. Le stress oxydatif.....	1
Figure 5. Différents mécanismes de production des ROS	3
Figure 6. Piégeage des ROS par différents oxydants : SOD, catalase, GPX	9
Figure 7. Évaporateur rotatif utilisé pour la concentration de l'extrait.....	15
Figure 8. Les différentes concentrations de l'extrait.....	19
Figure 9. Coulage du milieu Mueller-Hinton dans les boîtes de Pétri.....	20
Figure 10. Préparation de l'inoculum bactérien.....	20
Figure 11. Ensemencement des boîtes de Pétri.....	21
Figure 12. Méthodologie appliquée pour l'activité.....	22
Figure 13. Étape de préincubation à froid.....	22
Figure 14. Répartition des rats albinos dans les groupes expérimentaux	24
Figure 15. La paillasse de travail	25
Figure 16. Dissection de rat	26
Figure 17. Injection intrapéritonéale d'acide acétique.....	29
Figure 18. Les types cellulaires de chaque phase de cycle œstral Reference Robinson.....	31
Figure 19. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	34
Figure 20. Coloration de l'échantillon après 10 min d'incubation	35
Figure 21. Courbe d'étalonnage de la Quercétine.....	35
Figure 22. Décoloration du radicale DPPH en présence des différentes concentrations de l'extrait d' <i>A.hierochuntica</i>	36
Figure 23. Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,020$ mg/ml).....	37
Figure 24. Détermination de l' IC_{50} de l'extrait d' <i>A. hierochuntica</i>	38
Figure 25. Résultat de l'effet de l'extrait sur la souche <i>Escherichia coli</i>	41
Figure 26. Résultat de l'effet de l'extrait sur la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Figure 27. Résultat de l'effet de l'extrait sur la souche <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figure 28. Résultat de l'effet de l'extrait sur la souche <i>Bacillus spizizenii</i>	42
Figure 29. Observation macroscopique des estomacs des rats	45

Figure 30. Coupe histologique de la muqueuse gastrique chez le rat du groupe témoin négatif	47
Figure 31. Coupe histologique de l'estomac de rat traité par HCl/éthanol	48
Figure 32. Coupe histologique de l'estomac de rat traité par Lomac + HCl/éthanol.	49
Figure 33. Coupe histologique de l'estomac de rat traité par l'extrait d' <i>Anastatica hierochuntica</i> à 500 mg/kg + HCl/éthanol.....	50
Figure 34. Coupe histologique de l'estomac de rat traité par l'extrait d' <i>Anastatica hierochuntica</i> à 1000 mg/kg + HCl/éthanol	51
Figure 35. Histogramme représentant la moyenne des crampes de chaque lot	53
Figure 36. Histogramme qui représente le pourcentage de réduction des différents lots	53
Figure 37. Observation microscopique d'un frottis vaginal chez une rate	55

Liste des abréviations

EOA Espèces Oxygénées Activées

AGPI Acides Gras PolyInsaturés

NADH Nicotinamide Adénine Dinucléotide

LDL Low Density Lipoprotein

ROS Reactive Oxygen Species

BHT Butyl Hydroxy Toluène

BHA Butyl Hydroxy Anisole

ERO Espèces Réactives d'Oxygène

SOD Super Oxyde Dismutase

GPX Glutathion PeroXydase

CAT Catalase

Introduction

Introduction

À travers les âges, les civilisations humaines ont toujours entretenu un lien étroit avec la nature, en particulier avec les plantes. Bien avant que les laboratoires ne dominent le paysage médical, les sociétés humaines avaient compris que certaines espèces végétales possédaient des vertus capables de soulager, prévenir ou même guérir divers maux. Ces usages empiriques, bien que souvent transmis par la tradition orale, trouvent aujourd’hui un écho nouveau dans la recherche scientifique moderne (Miraldi and Baini, 2019).

Dans un monde confronté à l’augmentation des maladies chroniques telles que le cancer, le diabète, les affections cardiovasculaires ou les troubles inflammatoires, les limites des traitements conventionnels ont mis en lumière l’urgence de trouver des alternatives naturelles, plus sûres et parfois plus accessibles. Ce besoin a ravivé l’intérêt pour les plantes médicinales, perçues à la fois comme des remèdes anciens et des solutions d’avenir.

Parmi ces plantes figure une espèce remarquable : *Anastatica hierochuntica L.*, connue sous les noms de *Kaf Mariam* ou *Rose de Jéricho*. Originaire des zones arides, cette plante est réputée pour sa capacité unique à « revenir à la vie » après dessèchement, un phénomène botanique fascinant appelé reviviscence. Mais au-delà de cette propriété symbolique, *A. hierochuntica* suscite un réel intérêt pour ses applications thérapeutiques multiples : régulation hormonale, activité antioxydante, effets anti-inflammatoires, gastroprotecteurs, antibactériens, et bien d’autres encore. Utilisée depuis des générations dans la médecine populaire, notamment pour accompagner la grossesse, soulager les douleurs ou traiter les infections, cette plante mérite aujourd’hui une validation rigoureuse de ses effets (Zin *et al.*, 2017).

À l’heure où les radicaux libres et le stress oxydatif sont reconnus comme des facteurs majeurs dans la physiopathologie de nombreuses affections, l’étude des propriétés antioxydantes naturelles devient essentielle. La capacité de certaines plantes à neutraliser ces espèces réactives d’oxygène offre des perspectives intéressantes pour la prévention et la prise en charge de divers troubles (Zbadi *et al.*, 2018).

C’est dans ce cadre que s’inscrit le présent mémoire, qui vise à étudier *Anastatica hierochuntica* sous un angle scientifique, à travers une approche expérimentale combinant :
L’analyse phytochimique (dosage des polyphénols et flavonoïdes),
L’évaluation des activités biologiques *in vitro*, et l’exploration des effets *in vivo*.

Ce travail se veut à la fois contributif et valorisant, dans une logique de pont entre la connaissance ancestrale et l’évidence scientifique moderne. Il ambitionne non seulement

Introduction

d'éclairer les mécanismes biologiques qui sous-tendent les effets de cette plante, mais aussi d'encourager la valorisation de la biodiversité algérienne et des pratiques thérapeutiques naturelles, avec prudence, rigueur et ouverture.

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Caractéristiques générales d'*Anastatica* *hierochintica*

1 Caractéristiques générales d'*Anastatica hierochintica*

1.1 Généralités sur la plante

Anastatica hierochuntica, généralement appelée *Rose de Jéricho* ou *kaff Mariam*, est une plante du désert. Elle est connue pour son mécanisme unique de reviviscence, qui lui permet de survivre dans des conditions extrêmement sèches en se recroquevillant en boule et en se réhydratant lorsqu'elle est exposée à l'eau. (Rostan and Manshoor, 2024). Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle, notamment pour ses effets reconnus sur la fertilité, faciliter l'accouchement. Les hémorragies utérines, les douleurs menstruelles et soigner les infections en raison de ses propriétés adaptatives et médicinales (Aati *et al.*, 2019).

Anastatica hierochuntica est une plante annuelle de petite taille (environ 5 à 15 cm), caractérisée par une ramification à la base. Ses tiges fines et de teinte grisâtre, adoptent une forme sphérique lorsqu'elles se dessèchent, formant une rosette distinctive. Les feuilles, simples, alternes et lancéolées, s'insèrent le long des tiges (Figure 1). La floraison donne lieu à de petites fleurs blanches à quatre pétales, caractéristiques de la famille des *Brassicacées*. Le fruit est une silicule renfermant de fines graines, capables de germer rapidement dès les premières pluies, illustrant ainsi l'adaptation remarquable de l'espèce aux milieux arides (Figure 1) (Hegazy and Kabi, 2010).



Figure 1. La plante d'*Anastatica hierochuntica*
(Anonyme 1)

1.2 Classification botanique et distribution géographique

1.2.1 Classification scientifique

La classification scientifique d'*Anastatica hierochintica* suit le système (APG IV) tel que présenté par le Royal Botanic Gardens, Kew (2019) dans la base de données Plants of the World Online.

Règne : Plantae
Sous-règne : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous-classe : Dilleniidae
Ordre : Brassicales
Famille : *Brassicaceae*
Genre : *Anastatica*
Espèce : *Anastatica hierochintica L*

1.2.2 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

Anastatica hierochintica est native des zones arides et désertiques, avec une répartition couvrante (Figure 02) :

- Afrique du Nord : Algérie, Égypte, Libye, Maroc, Mauritanie, Soudan, Tunisie, Sahara occidental.
- Péninsule Arabique : Arabie Saoudite, Yémen, Oman, Koweït, Qatar, Bahreïn.
- Moyen-Orient : Irak, Iran, Jordanie, Liban, Syrie, Palestine.
- Asie du Sud-Ouest : Pakistan (Plants of the World Online, 2019).



Figure 2. Distribution géographique (Plants of the World Online, 2019).

1.3 Composition chimique

Une analyse élémentaire des différentes parties de la plante *Anastatica hierochuntica* (feuilles, tiges et graines) a permis de mettre en évidence une richesse remarquable en macro et oligo-éléments essentiels.

1.3.1 Métabolites primaires

Les métabolites primaires sont essentiels à la croissance, le développement et le métabolisme cellulaire des plantes (Thotathil *et al.*, 2023).

Selon (Saranya *et al.*, 2019), Chez *Anastatica hierochuntica* la composition chimique de la plante varie selon les différentes parties :

- Les graines contiennent de protéines (14,95 %) et de lipides (8,24 %). Ces éléments aident l'embryon à se développer au début de la germination.
- Les feuilles sont riches en glucides (42,68 %), ce qui montre leur rôle important dans la photosynthèse et la production de sucres.
- Les tiges contiennent surtout des fibres (13,59 %) et des cendres (17,32 %), ce qui montre leur fonction de soutien et de transport des éléments minéraux.

1.3.2 Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ne sont pas essentiels à la croissance des plantes comme les métabolites primaires, mais ils leur permettent de survivre dans un environnement compétitif. Ils contribuent à la défense des plantes contre les stress abiotiques (sécheresse, salinité, chaleur) et biotiques (champignons, insectes, virus) qui affectent leur croissance (Al-Khayri *et al.*, 2023).

Anastatica hierochuntica est riche en composés bioactifs notamment les flavonoïdes (quercétine), les acides phénoliques (acide gallique), les terpènes, les tanins, qui sont responsables de nombreuses activités telles que les effets antioxydant, anti-inflammatoire et antimicrobien (Rameshbabu *et al.*, 2024).

1.3.3 Les minéraux

Anastatica hierochuntica possède une valeur médicinale et nutritionnelle grâce à sa composition minérale riche et variée jouant un rôle important dans la régulation des contractions utérines, le maintien de l'équilibre électrolytique ainsi que le bon fonctionnement du système immunitaire. Ces effets sont notamment attribuables à la présence d'oligo-éléments essentiels au métabolisme humain. Les analyses ont révélé que les feuilles contiennent les concentrations les plus élevées en sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca), fer (Fe), baryum

Caractéristiques générales d'*Anastatica hierochintica*

(Ba), cobalt (Co) et manganèse (Mn). De leur côté, les graines se distinguent par des teneurs particulièrement importantes en magnésium (Mg), nickel (Ni) et zinc (Zn). Enfin, les tiges affichent une concentration remarquable en cuivre (Cu). (Saranya et al., 2019)

1.4 Activités thérapeutiques d'*Anastatica hierochuntica*

Anastatica hierochuntica, utilisée en médecine traditionnelle, présente une vaste gamme d'effets pharmacologiques validés par la recherche scientifique. Les extraits méthanoliques et aqueux affichent des propriétés antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, hypoglycémiantes et hypolipidémiantes, ainsi que des effets protecteurs pour le foie (hépatoprotecteurs), l'estomac (gastroprotecteurs), ainsi que des activités anti-inflammatoires et anticancéreuses. (Zin et al., 2017)

1.4.1 Effet sur la fertilité et la grossesse

Dans la médecine traditionnelle, les femmes consomment l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* dans le but d'améliorer leurs chances de concevoir. Cette pratique repose sur des croyances populaires transmises de génération en génération.

Une étude a montré que l'extrait aqueux des parties aériennes d'*Anastatica hierochuntica*, administré par voie orale quotidiennement pendant un mois et comparé à l'effet du médicament (Clomid), peut favoriser la fertilité féminine en stimulant la sécrétion de certaines hormones reproductives telles que la FSH, la LH, la prolactine et la progestérone, contribuant ainsi à la régulation du cycle ovarien et à l'ovulation. (Baker et al., 2013)

Ainsi, une autre étude a mis en évidence que cet extrait pourrait également faciliter l'accouchement, en augmentant l'hypertrophie des cellules myométriales et les niveaux de prostaglandines PGE2 et PGF2α, des composés impliqués dans le déclenchement des contractions utérines. (Astutik et al., 2020)

1.4.2 Effet anti-inflammatoire

L'inflammation est à l'origine d'une grande variété de processus physiologiques et pathologiques. Bien que les aspects pathologiques de nombreux types d'inflammation soient bien compris, leurs fonctions physiologiques restent en grande partie méconnues. (Medzhitov, 2008).

La plante est utilisée depuis longtemps pour le traitement des affections liées à l'inflammation et à la douleur. Ces effets anti-inflammatoires observés avec les extraits aqueux (AQAH) et de la fraction au chloroforme (CHAH) de cette plante pourraient être attribués à la

*Caractéristiques générales d'*Anastatica hierochintica**

présence de certains composés bioactifs extraits lors de la préparation, notamment des flavonoïdes et des alcaloïdes. À titre d'exemple, des flavones telles que la lutéoline, la silybine et l'apigénine ont démontré une activité inhibitrice dépendante de la dose sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat, en agissant par l'inhibition des enzymes inflammatoires, des cytokines pro-inflammatoires et de l'oxyde nitrique. (Alatshan *et al.*, 2018)

1.4.3 Effet antibactérien

Les agents antimicrobiens sont des substances capables d'éliminer les micro-organismes pathogènes. En général, ces agents tels que bactéricides et les désinfectants sont constitués de composés de faible poids moléculaire. Parmi eux, les phénols et les composés cationiques représentent deux groupes majeurs largement utilisés, principalement comme désinfectants. (Kenawy, 2001)

L'activité antibactérienne d'*Anastatica hierochuntica* a été étudiée par la méthode de diffusion en puits d'agar dans des extraits d'éthanol, de méthanol et d'eau contre des bactéries pathogènes. Tous les extraits ont montré une activité antibactérienne importante contre les agents pathogènes sélectionnés. La zone d'inhibition la plus élevée a été observée avec l'extrait d'éthanol, suivi par l'extrait de méthanol et l'extrait d'eau. (Sobeai *et al.*, 2015)

1.4.4 Effet antifongique

L'activité antifongique est la capacité d'un extrait à inhiber la croissance ou à éliminer des champignons pathogènes. (Bene *et al.*, 2023)

L'extrait éthanolique d'*A. hierochuntica* a montré une activité antifongique contre tous les champignons testés. La croissance de *Microsporum audouinii* est inhibée par 150 mg/mL, tandis qu'une concentration plus faible de 100 mg/mL n'a pas eu d'effet significatif sur l'inhibition de la croissance par rapport à 50 mg/mL. (Al-Ghanayem *et al.*, 2018)

1.4.5 Effet gastro-protecteur

Un protecteur gastrique désigne toute substance qui contribue à protéger la muqueuse de l'estomac contre les agressions telles que l'acidité gastrique, les médicaments irritants ou certaines infections. Il peut s'agir de médicaments, d'aliments, de plantes ou de compléments utilisés pour prévenir ou soulager des troubles gastriques comme les ulcères ou les brûlures d'estomac (Anonyme 1).

Caractéristiques générales d'*Anastatica hierochintica*

Les résultats de l'étude ont démontré que *Kaff Maryam* exerce une activité gastroprotectrice. L'extrait éthanolique de la plante a permis de réduire de manière significative les lésions gastriques induites expérimentalement par divers agents ulcérogènes (l'éthanol, l'acide chlorhydrique, le chlorure de sodium, l'hydroxyde de sodium et l'indométacine). Les analyses histopathologiques ont confirmé que le traitement préventif avec *A. hierochuntica* atténue les altérations de la muqueuse gastrique, notamment la nécrose, la congestion, les hémorragies et l'œdème. (Mp Bhandari, 2014a)

1.4.6 Effet hépato-protecteur

Les anastatines A et B ont été isolées de l'extrait méthanolique de la plante entière d'*Anastatica hierochuntica*. Leurs structures flavanones à groupement benzofurane ont été déterminées sur la base de données chimiques et physicochimiques. Ces composés ont montré une activité hépatoprotectrice sur la cytotoxicité induite par la d-galactosamine dans des hépatocytes de souris en culture primaire, et leur activité était plus forte que celle des flavonoïdes apparentés et de la silybine commerciale. (Yoshikawa *et al.*, 2003)

1.4.7 Effet hypoglycémiant et hypolipidémiant

L'activité hypoglycémiant désigne la capacité d'une substance à abaisser le taux de glucose sanguin, (Étamé-Loe *et al.*, 2018) tandis que l'activité hypolipidémiant correspond à sa capacité à réduire les concentrations de lipides plasmatiques, notamment le cholestérol et les triglycérides. (Alyahya *et al.*, 2023)

Une étude a montré que l'administration orale d'un extrait alcoolique de la plante à des rats diabétiques pendant quatre semaines (100 mg/kg) a permis de réduire efficacement la glycémie et d'améliorer le profil lipidique (cholestérol et triglycérides). Le traitement a aussi aidé à normaliser certaines enzymes du foie, souvent perturbées en cas de diabète, et à rétablir l'activité des défenses antioxydantes naturelles de l'organisme, suggérant un effet protecteur contre les dommages cellulaires liés au stress oxydatif. (Shaban *et al.*, 2011)

1.4.8 Effet anticancéreux

Des études ont montré que les extraits aqueux et méthanoliques de différentes parties (graines, tiges et feuilles) d'*A. hierochuntica* possèdent des effets antiprolifératifs significatifs sur les cellules MCF-7 du cancer du sein humain, de manière dose-dépendante. La propriété antiproliférative des extraits végétaux a été révélée par la mort cellulaire rapide des cellules MCF-7 via l'induction de l'apoptose, entraînant une fragmentation de l'ADN. Le mécanisme

Caractéristiques générales d'*Anastatica hierochintica*

d'apoptose dans les cellules MCF-7 se produit via la voie mitochondriale dépendante de p53. (Rameshbabu *et al.*, 2020)

1.4.9 Effet antioxydant

Les antioxydants sont des molécules capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO), y compris les radicaux libres, ou d'en inhiber la formation, contribuant ainsi à protéger les cellules contre les dommages oxydatifs. (Favier, 2003)

Les composés phénoliques ce sont des métabolites végétaux secondaires caractérisés par la présence de noyaux aromatiques portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, leur conférant une activité de piégeage des radicaux libres. (Soong and Barlow, 2004)

L'activité antioxydante d'*Anastatica hierochuntica* est liée à sa richesse en composés phénoliques et flavonoïdes. Selon (Almundarij *et al.*, 2021), l'extrait est capable d'inhiber les radicaux libres et de chélater les métaux pro-oxydants en interrompant les réactions de peroxydation lipidique.

1.4.10 Effet immunostimulateur

Une recherche menée sur des souris mâles albinos a montré que l'extrait méthanolique d'*Anastatica hierochuntica* entraînait une augmentation significative du taux d'immunoglobuline G (IgG) et de l'activité phagocytaire, tout en réduisant l'activité de l'adénosine désaminase (ADA), ce qui suggère un effet immunostimulant marqué. (Abdulfattah, 2013)

1.5 Données toxicologiques et effets indésirables

Des chercheurs ont administré des extraits aqueux et hydroéthanoliques d'*Anastatica hierochuntica* à des souris à une dose unique de 2000 mg/kg. Ils ont observé une respiration rapide et une somnolence transitoire dans les 30 premières minutes suivant l'administration, mais aucun décès n'a été enregistré. La dose létale médiane (DL50) a été estimée supérieure à 2000 mg/kg, indiquant une faible toxicité aiguë. (Esther *et al.*, 2023)

De même Tawfeeq (2014) a montré que l'administration d'extrait aqueux de *Kaff Maryam* chez les souris n'a provoqué aucune altération histologique significative au niveau des reins, ce qui suggère une faible toxicité aiguë au niveau rénal.

À la lumière des nombreuses propriétés thérapeutiques rapportées pour *Anastatica hierochuntica*, notamment ses effets anti-inflammatoires, gastroprotecteurs et antioxydants, il apparaît essentiel de mieux comprendre l'un des mécanismes biologiques majeurs impliqués

Caractéristiques générales d'*Anastatica hierochintica*

dans ces activités : le stress oxydatif joue un rôle important dans la genèse de nombreuses pathologies chroniques, et la capacité antioxydante des plantes médicinales constitue aujourd’hui un axe majeur de recherche.

Ainsi, le chapitre suivant s’intéressera aux bases biochimiques du stress oxydatif, aux types de radicaux libres, à leurs effets délétères, ainsi qu’aux systèmes de défense antioxydante mis en œuvre par l’organisme. Une attention particulière sera portée au rôle potentiel d’*Anastatica hierochuntica* dans la modulation de ces mécanismes (voir Figure 3)

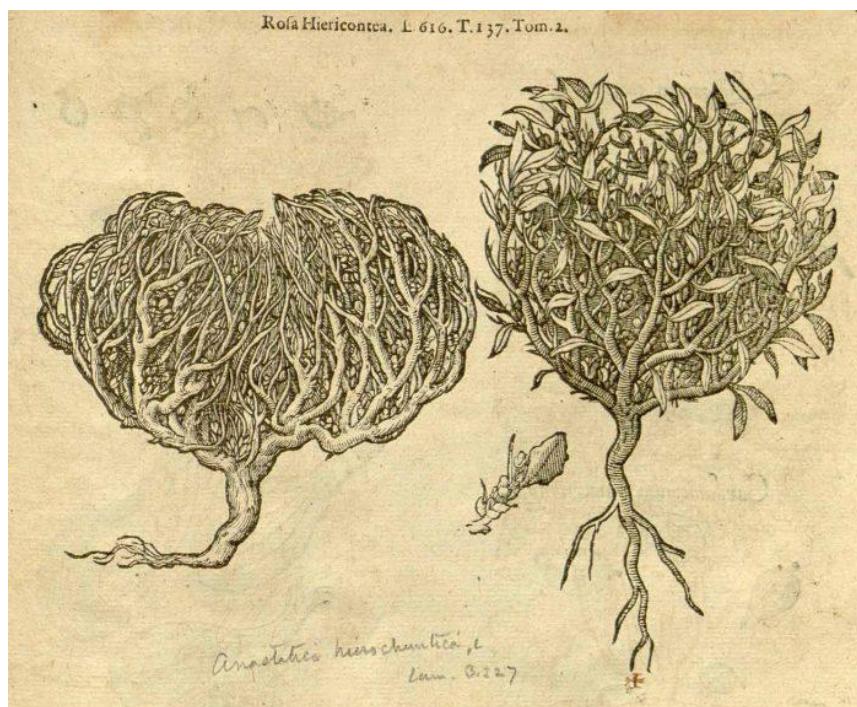


Figure 3. Illustration botanique de la rose de Jéricho (Anonyme 3)

Chapitre 2 : Stress oxydatif

2 Stress oxydatif

2.1 Définition du stress oxydatif

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. (Favier, 2003). Le stress oxydatif, au même titre que l'inflammation, est aujourd'hui considéré comme un facteur central dans l'émergence et l'aggravation de nombreuses maladies chroniques. Dans une optique de prévention, il est donc essentiel de disposer d'outils fiables et performants permettant une évaluation précise du statut oxydatif. Cela permet d'adapter les interventions nécessaires pour renforcer les systèmes de défense antioxydante et limiter les dommages causés par les espèces oxygénées réactives (EOA) sur l'ADN, les protéines et les lipides (Zbadi *et al.*, 2018) (voir Figure 4)



Figure 4. Le stress oxydatif (Anonyme3)

Classiquement, le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre en faveur de la production de Reactive Oxygen Species (ROS), conduisant à une oxydation excessive des constituants cellulaires essentiels. Ce déséquilibre entre les agents pro-oxydants et les systèmes antioxydants peut avoir une origine exogène comme l'exposition à des molécules oxydantes, à des toxines ou à des métaux lourds ou endogène, en raison de dysfonctionnements des sources de production ou des mécanismes d'élimination des ROS. (Khamadj et Dahmani, 2019)

2.2 Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, qui a la particularité de porter un électron célibataire sur sa couche externe, ce qui le rend généralement instable, à durée de vie très courte, mais il est capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques. (Khamadj et Dahmani, 2019)

Parmi les nombreuses espèces radicalaires pouvant être générées dans les cellules, un petit groupe se distingue par son rôle physiologique spécifique : ce sont les radicaux dits primaires. Les autres, appelés radicaux secondaires, sont produits à la suite de réactions entre ces radicaux primaires et divers composants biochimiques cellulaires. Les radicaux primaires proviennent principalement de l'oxygène, par réduction monoélectronique, comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), ou de l'azote, comme le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}). Par ailleurs, certaines molécules dérivées de l'oxygène, bien que non radicalaires telles que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le peroxynitrite ($ONOOH$) sont très réactives et peuvent donner naissance à des radicaux libres. L'ensemble de ces radicaux et de leurs précurseurs est regroupé sous le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Il est important de noter que tous les radicaux de l'oxygène ne présentent pas la même réactivité, celle-ci variant considérablement selon leur nature. (Favier, 2003)

2.2.1 Sources des radicaux libres

Sources endogènes : En raison de sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire est considéré comme un radical libre, car il possède deux électrons non appariés. Dans l'organisme, une fraction de cet oxygène peut capter un électron de manière univaleure et séquentielle, menant ainsi à la formation de la principale espèce réactive de l'oxygène : l'anion superoxyde ($O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$). (Khamadj et Dahmani, 2019).

Certaines enzymes oxydases, telles que la xanthine oxydase, la NO synthase, les eicosanoïdes, ainsi que les réactions de transition des métaux, représentent des sources importantes de production de l'anion superoxyde au sein des cellules. Ce radical, par des réactions successives d'oxydoréduction, conduit à la formation d'autres espèces très réactives.

Par ailleurs, au niveau mitochondrial, même dans des conditions physiologiques normales, il existe une fuite d'électrons lors du transport le long de la chaîne respiratoire, notamment au niveau du complexe III. Ces électrons, issus du NADH et du succinate réagissent

Stress oxydatif

avec l'oxygène et participent à la production de l'anion superoxyde. (Khamadj et Dahmani, 2019).

Sources exogènes : D'après Bagchi et Puri (1998) et Sen (2010), on peut citer :

- Les rayons UV, les rayons X, les radiations gamma et les micro-ondes.
- L'interaction avec les produits chimiques, les échappements d'automobiles et la fumée de cigarette.
- Les brûlures de matières organiques pendant la cuisson, incendies de forêt, activités volcaniques.
- Les effluents industriels, les produits chimiques en excès, la consommation de certains médicaments et de produits alcooliques, certains pesticides et herbicides, des ions métalliques, des toxines fongiques et xénobiotiques (Figure 05). (Khamadj et Dahmani, 2019)

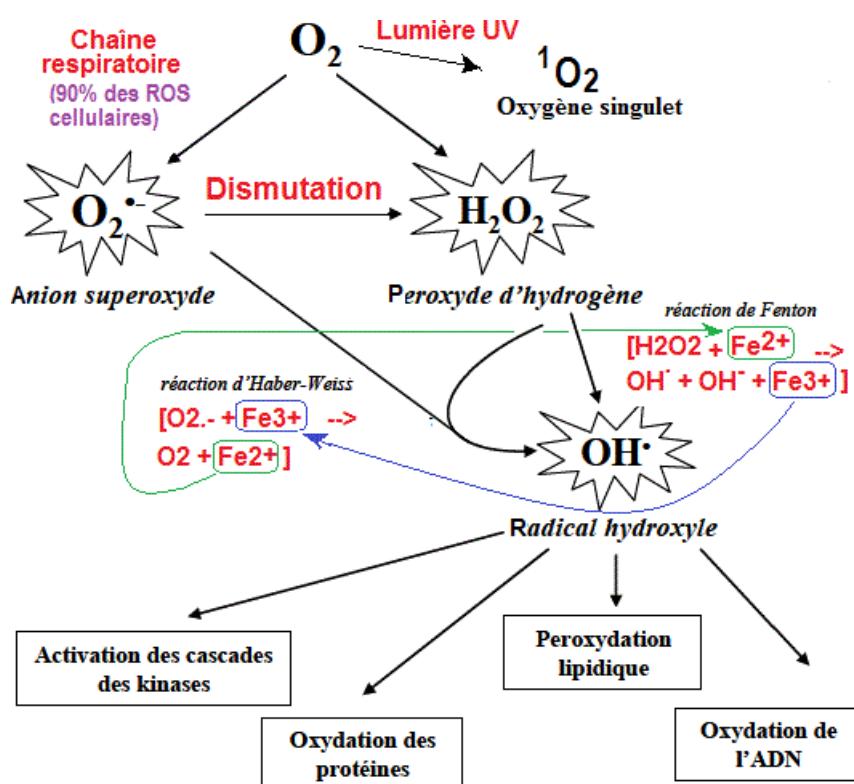


Figure 5. Différents mécanismes de production des ROS
(Benbouhafs, Y., 2024).

2.3 Conséquences du stress oxydatif

2.3.1 Rôle physiologique

Les radicaux libres, bien qu'ils soient souvent associés à des effets délétères, jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques. Ils interviennent dans le fonctionnement de certaines enzymes, la transmission des signaux cellulaires, la défense immunitaire contre les agents pathogènes, l'élimination des cellules tumorales par apoptose, ainsi que dans la régulation du cycle et de la différenciation cellulaire. Ils participent également à la modulation de la dilatation des capillaires, au bon fonctionnement de certains neurones — notamment ceux impliqués dans la mémoire —, à la fécondation de l'ovule, ainsi qu'au contrôle redox de l'expression génétique. Par exemple, au niveau musculaire, les travaux de Reid et collaborateurs (2001) ont montré que l'exposition des fibres musculaires au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) améliore l'ensemble des caractéristiques de la contraction musculaire. De plus, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) régulent divers facteurs de transcription, comme la protéine AP-1, qui induit l'expression de gènes dits « protecteurs ». Ces gènes contrôlent la production de molécules de défense, telles que les antioxydants, jouant un rôle crucial dans les mécanismes de réparation et de régénération cellulaire. (Favier, 2003)

2.3.2 Rôle pathologique

En raison de leur forte réactivité, les espèces oxygénées activées (EOA) peuvent s'attaquer à diverses cibles biologiques dans l'organisme, ce qui les rend particulièrement dangereuses.

2.3.2.1 Principales cibles biologiques des ROS

2.3.2.1.1 Oxydation de l'ADN

L'ADN constitue l'une des principales cibles des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Parmi les bases azotées, la guanine est particulièrement vulnérable, notamment face au radical hydroxyle ($OH\cdot$), avec lequel elle peut réagir pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG). Cette lésion provoque un mésappariement avec l'adénine au lieu de la cytosine, ce qui induit des mutations au sein du matériel génétique. Ces altérations peuvent compromettre l'intégrité du message génétique et sont impliquées dans des processus pathologiques tels que le vieillissement cellulaire et le développement de cancers (Haleng et al., 2007).

2.3.2.1.2 Oxydation protéique

Les acides aminés présentent une sensibilité variable aux ROS. L'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine sont parmi les plus réactifs. Une attaque radicalaire ciblant un acide aminé peut entraîner l'oxydation de certains résidus, conduisant à la formation de groupements carbonylés, à des ruptures dans les chaînes peptidiques ou à la formation de ponts bi-tyrosine intra- et intermoléculaires. Ces modifications, souvent irréversibles, peuvent altérer gravement la fonction des protéines, par exemple en empêchant la reconnaissance ligand-récepteur ou en abolissant l'activité enzymatique (Haleng *et al.*, 2007).

2.3.2.1.3 Oxydation lipidique

Le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) est capable d'extraire un atome d'hydrogène des acides gras polyinsaturés (AGPI), notamment sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette étape, dite d'initiation, conduit à la formation d'un radical lipidique. Celui-ci réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$), qui à son tour peut extraire un atome d'hydrogène d'un AGPI voisin, propageant ainsi la peroxydation lipidique. Ce processus engendre une altération de la fluidité membranaire, compromettant l'intégrité cellulaire et menant inévitablement à la mort cellulaire (Haleng *et al.*, 2007).

2.3.2.1.4 Les lipoprotéines

Les ROS peuvent également cibler les lipoprotéines circulantes, entraînant l'oxydation des LDL. Ces LDL oxydées sont ensuite internalisées par des récepteurs spécifiques des macrophages, dont l'activité n'est pas régulée par les taux intracellulaires de cholestérol. Cela conduit à une accumulation excessive de cholestérol et à la formation de cellules spumeuses, un événement clé dans le développement de l'athérosclérose. De plus, les LDL oxydées sont immunogènes, capables d'induire la formation de complexes immuns qui activent la voie classique du complément et stimulent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. Ainsi, des concentrations élevées de ROS participent non seulement au vieillissement, mais également à diverses pathologies telles que le cancer, l'ischémie, ainsi que les dysfonctionnements immunitaires et endocriniens (Haleng *et al.*, 2007).

2.4 Etude sur *Anastatica hierochuntica*

Les résultats de plusieurs études ont clairement démontré qu'*Anastatica hierochuntica* est une plante médicinale riche en composés phénoliques polaires et non polaires, lui conférant une capacité antioxydante remarquable. En particulier, l'extrait aqueux a montré une efficacité protectrice contre le stress oxydatif et les lésions rénales aiguës induites par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) chez le rat, caractérisée par une diminution significative des niveaux de malondialdéhyde (MDA) et une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes tellesque la glutathion peroxydase (GSH) et la Super Oxyde Dismutase (SOD).

Cette activité antioxydante supérieure est également attribuée à la capacité de *A.hierochuntica* à inhiber les radicaux libres de l'acide linoléique et à chélater les métaux pro-oxydants. Ces propriétés suggèrent un rôle prometteur de cette plante dans la prévention des dommages oxydatifs et ouvrent la voie à son utilisation potentielle dans le domaine thérapeutique naturel. (Almundarij *et al.*, 2021)

2.5 Les antioxydants

Les antioxydants sont définis comme un groupe de substances qui aident à lutter contre le cancer et d'autres maladies graves comme l'athérosclérose, Alzheimer, Parkinson, le diabète et les maladies cardiaques. Ils peuvent être synthétiques (comme le butylhydroxytoluène BHT et le butylhydroxyanisole BHA) ou naturels (présents dans les légumes, fruits, céréales, écorces, racines, épices, etc.). Les antioxydants naturels sont aujourd'hui de plus en plus privilégiés, car certains antioxydants synthétiques ont été associés à des effets secondaires comme la cancérogénèse.

L'inflammation joue un rôle essentiel dans les lésions des membranes. Ce processus est en partie dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les neutrophiles et les macrophages activés. Une production excessive de ces ERO cause des dommages aux tissus, en altérant les macromolécules et en induisant la peroxydation lipidique des membranes. De plus, les ERO aggravent l'inflammation en stimulant la libération de cytokines, comme le facteur de nécrose tumorale et l'interleukine 1, qui favorisent à leur tour le recrutement de nouveaux neutrophiles et macrophages. Ainsi, les radicaux libres jouent un rôle clé dans le déclenchement et le maintien de l'inflammation. Leur neutralisation par des antioxydants ou des piègeurs de radicaux libres pourrait donc contribuer à réduire l'inflammation. Dans ce

contexte, la présente étude avait pour objectif d'analyser en détail les contenus en phénols totaux, flavonoïdes totaux, ainsi que les activités antioxydantes, anti-inflammatoires et cytotoxiques de différentes fractions d'*A. hierochuntica L.* (Abou-Elella *et al.*, 2016).

Les antioxydants se répartissent en deux grandes catégories : les enzymatiques et les non enzymatiques. Certains sont produits naturellement par l'organisme, tels que des enzymes spécifiques, des molécules de faible poids moléculaire et des cofacteurs enzymatiques. D'autres, principalement non enzymatiques, sont apportés par l'alimentation.

Parmi ces antioxydants d'origine alimentaire, les polyphénols constituent la classe la plus importante, incluant notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes. D'autres groupes d'antioxydants alimentaires comprennent les vitamines, les caroténoïdes, les composés organosulfurés et certains minéraux essentiels, tous reconnus pour leur capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène.

2.5.1 Le système antioxydant enzymatique

Trois enzymes antioxydantes majeures ont été identifiées pour leur rôle dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (CAT). Ces enzymes, appartenant à la classe des métalloprotéines, fonctionnent de manière concertée afin de protéger les cellules contre les dommages induits par les radicaux libres générés au cours du métabolisme cellulaire normal. Elles représentent ainsi la première barrière antioxydante endogène de l'organisme.

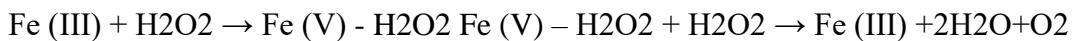
L'activité catalytique de ces enzymes dépend strictement de la présence de métaux de transition, indispensables à l'activation de leurs centres actifs. Toute carence en éléments métalliques peut entraîner une altération significative de leur efficacité antioxydante. À titre d'exemple, une déficience en cuivre est associée à une réduction de l'activité de la Cu/Zn SOD, entraînant une susceptibilité accrue des cellules au stress oxydatif. (Benfettoume et Khalla., 2014).

2.5.1.1 Les superoxydes dismutases (SOD)

C'est un groupe de métalloenzymes retrouvées dans toutes les cellules animales et végétales qui catalyse la réaction de dismutation du radical superoxyde. Leur structure forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, puits dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au centre de l'enzyme dont la nature distingue un type précis. Les superoxydes dismutases peuvent être inhibés par différents composés (Fe SOD) est inactivée par le peroxyde d'hydrogène, de même que la Cu/Zn SOD qui est également affectée par la présence d'autres types d'oxydants. L'inactivation de la SOD par le produit de la réaction qu'elle catalyse suggère un phénomène de rétrocontrôle, mais il semble que son interaction avec le peroxyde d'hydrogène donne lieu à la formation de radicaux hydroxyles hautement nocifs. La suppression des métaux de transition par l'ajout de chélateurs dans le milieu inhibe également les SOD. Certaines substances affectent spécifiquement un type d'isoforme : le cyanure inhibe la Cu/Zn SOD et le sodium dodecyl sulfate (SDS) inhibe la Mn SOD. (Benfettoume et Khalla., 2014).

2.5.1.2 La catalase (CAT)

La catalase (CAT) est une enzyme tétramérique contenant un groupe hémecatalyseur, d'où son nom est dérivé, la réaction catalytique conduit à une décomposition du H₂O₂ en H₂O et O₂. Cette action a été découverte début du 19ème siècle. La catalase est située au niveau des peroxysomes de façon ubiquitaire dans tous les tissus. Elle est constituée d'un nombre variable selon les espèces de sous-unités d'environ 60 kDa contenant un hème, dont le fer participe à la réaction catalysée. Celle-ci consiste principalement à réduire le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène selon la réaction suivante :



La catalase catalyse uniquement la peroxydation de molécules de petite taille car le ou les noyaux hémiques sont situés assez profondément dans la structure quaternaire, au bout d'un canal tapissé de groupements hydrophobes. L'activité CAT est stimulée de façon assez claire et rapide par les contaminants générateurs de stress oxydant, ce qui en fait un biomarqueur largement utilisé. (Benfettoume et Khalla., 2014)

2.5.1.3 La glutathion peroxydase (GPX)

La glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H₂O₂. Elle agit plus lentement que la catalase mais elle possède une meilleure affinité pour le H₂O₂ que cette dernière. La GPX est donc essentielle à la décomposition du H₂O₂. La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule. 2O₂ en H₂O et O₂. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique. (Benfettoume et Khalla., 2014)

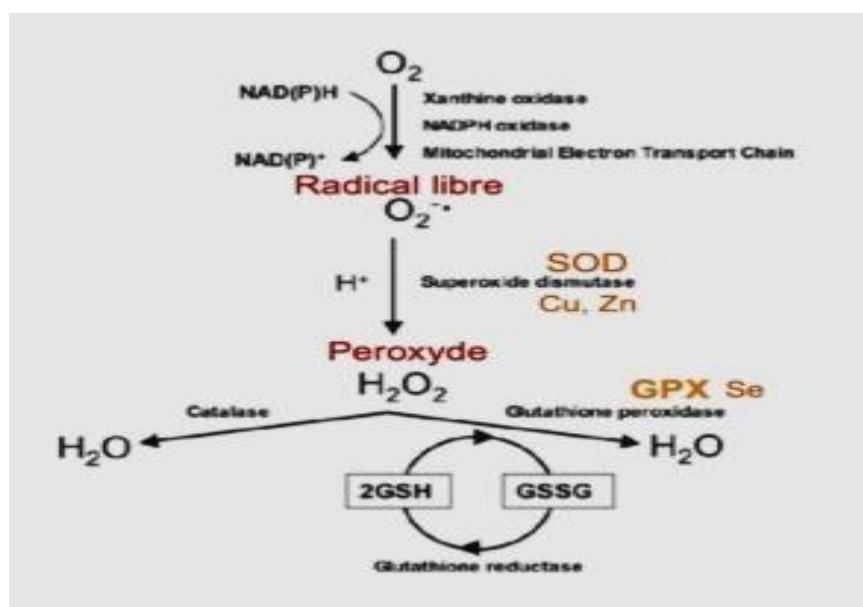


Figure 6. Piégeage des ROS par différents oxydants : SOD, catalase, GPX (Chen, Y., et al. 2020)

2.5.2 Le système antioxydant non enzymatique

Les antioxydants non enzymatiques se répartissent en deux grandes catégories : les antioxydants métaboliques (ou endogènes) et les antioxydants d'origine alimentaire (ou exogènes). Parmi les antioxydants produits par l'organisme, on retrouve l'acide lipoïque, le glutathion, la L-arginine, la coenzyme Q10, la mélatonine, l'acide urique, ainsi que certaines

protéines capables de chélater les métaux. En parallèle, les antioxydants apportés par l'alimentation incluent notamment les vitamines E et C, Les polyphénols, les caroténoïdes, les oligoéléments tels que le sélénium, le manganèse et le zinc, ainsi que les flavonoïdes, les acides gras oméga-3 et oméga-6, entre autres.

2.5.2.1 Les polyphénols

Le groupement phénol correspond à une structure aromatique plane de type benzénique, portant une ou plusieurs fonctions hydroxyle (-OH). Les phénols jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes tels que les microbes et les champignons. Chez l'être humain, ces composés et leurs dérivés présentent un intérêt pharmacologique notable ; toutefois, à fortes doses ou à l'état pur, ils peuvent s'avérer hautement toxiques. Très répandus dans le règne végétal, les phénols existent sous forme simple (comme les phénols simples et les acides phénoliques) ou sous forme complexe (polyphénols), englobant notamment les coumarines, flavonoïdes, tanins, lignanes, quinones, etc. Les groupements phénoliques peuvent également être liés à des glucides, formant des hétérosides phénoliques, tels que le salicoside. (Elie, 2022).

2.5.2.2 Les flavonoïdes

Ces composés sont largement présents dans le règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation quotidienne, notamment à travers la consommation de fruits, de légumes, ainsi que de boissons comme le vin et le thé. Ils ont la capacité de moduler l'activité de diverses enzymes et d'influencer le fonctionnement de plusieurs systèmes cellulaires. Ces propriétés suggèrent qu'ils pourraient exercer un large éventail d'effets biologiques, parmi lesquels des activités antioxydantes, vasculoprotectrices, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-ulcérées, et même des effets antitumoraux notables. (Ghedira, 2005)

2.5.2.3 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments essentiels qui jouent un rôle majeur dans la protection des plantes contre les processus de photo-oxydation. Ils agissent comme de puissants antioxydants capables de neutraliser l'oxygène singulier ainsi que les radicaux peroxydes. Chez l'être humain, les caroténoïdes s'intègrent au système de défense antioxydant, où ils interagissent en synergie avec d'autres composés antioxydants. Il a d'ailleurs été démontré que les mélanges de caroténoïdes sont plus efficaces que les molécules isolées. En raison de leur structure chimique, la majorité des caroténoïdes présentent un pic d'absorption

Stress oxydatif

maximal aux alentours de 450 nm. Le filtrage de la lumière bleue constitue l'un des mécanismes proposés pour expliquer leur rôle protecteur au niveau de la macula lutea, face aux dommages induits par la photo-oxydation. Par ailleurs, un nombre croissant d'études cliniques suggèrent que les caroténoïdes contribuent également à la protection de la peau contre les agressions oxydatives liées à la lumière.(Stahl et Sies,2003)

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

3 Matériel et méthodes

3.1 Matériel végétal

Nom scientifique : *Anastatica hierochuntica L.*

Partie utilisée : Parties aériennes de la plante (tiges, feuilles, fleurs).

Origine de l'échantillon : La plante a été achetée dans un magasin d'herboristerie à Constantine (Algérie) le 3 mars 2025. Selon les informations fournies par le vendeur elle aurait été récoltée en Arabie Saoudite environ deux mois avant l'achat

Méthode de séchage et de broyage : La plante est déjà sèche au moment de l'achat, a été broyée à l'aide d'un moulin électrique pour obtenir une poudre homogène.

Stockage : La poudre végétale a été conservée dans des flacons en verre ambré hermétiques, à température ambiante.

3.1.1 Préparation des extraits

Méthode d'extraction : macération.

Solvant utilisé : Méthanol /eau (7/3 ; v/v).

Un total de 200 g de poudre végétale a été extrait par macération avec le solvant méthanol/eau pendant 72 heures avec agitation occasionnelle, puis filtré. L'extrait obtenu a été concentré à l'évaporateur rotatif à 40 °C jusqu'à évaporation complète du solvant (Figure 7).

Calcul du rendement

$$\text{Rendement (\%)} = \{\text{Masse de l'extrait sec (g)}\} / \{\text{Masse de la plante sèche (g)}\} \times 100$$



Figure 7. Évaporateur rotatif utilisé pour la concentration de l'extrait

3.2 Analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes

3.2.1 Dosage des polyphénols totaux

Principe

Le dosage des polyphénols totaux repose sur la réaction d'oxydoréduction entre les composés phénoliques et le réactif de Folin-Ciocalteu. Les polyphénols réduisent les phosphomolybdates et les phosphotungstates présents dans le réactif, formant un complexe bleu mesurable par spectrophotométrie à 765 nm (Zbadi *et al.*, 2018).

Mode opératoire

1. Préparer un extrait méthanolique de l'échantillon à analyser (1mg/ml).
2. Dans un tube à essai introduire :
 - 200 µl d'extrait.
 - 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1 V+ 9 V de l'eau distillée).
 - 2,5 mL de solution de Na₂CO₃ à 7,5 %.
3. Incuber le mélange à obscurité pendant 2 h.
4. Lire l'absorbance à 765 nm contre un blanc (méthanol).
5. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des concentrations croissantes d'acide gallique.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g), en se basant sur la courbe d'étalonnage.

3.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux

Principe

Le dosage est basé sur la formation d'un complexe flavonoïdes-chlorure d'aluminium (AlCl_3) qui donne une coloration jaune mesurable par spectrophotométrie à 415 nm. (Zbadi *et al.*, 2018).

Mode opératoire

1. Dans un tube à essai mélanger :
 - 1 mL d'extrait
 - 1 mL de solution de AlCl_3 à 2 %.
2. Incuber le mélange pendant 10 minutes.
3. Lire l'absorbance à 415 nm contre un blanc.
4. Une courbe d'étalonnage est construite à partir de concentrations croissantes de la Quercétine.

3.2.3 Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent Quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g).

3.3 Activités biologiques *in vitro*

3.3.1 Évaluation de l'activité antioxydante par le radical DPPH

Matériel végétal

Extrait sec méthanoïque d'*Anastatica hierochuntica*, préparé comme décrit précédemment.

Principe de la méthode DPPH

La méthode repose sur la capacité des antioxydants à piéger le radical libre stable DPPH, qui est de couleur violette. En présence d'un antioxydant, le DPPH est réduit et sa couleur devient jaune pâle. Cette réaction est suivie par spectrophotométrie à 515 nm (Popovici *et al.*, 2009). La baisse de l'absorbance est proportionnelle à l'activité antioxydante de l'échantillon testé.

Méthode expérimentale

➤ Préparation des solutions

Éthanol à 70 % : préparé par dilution de l'éthanol à 96 % avec de l'eau distillée (14,6 mL + 5,4 mL pour 20 mL).

Solution mère de l'extrait : 0.01 g d'extrait sec dissous dans 10 mL d'éthanol à 70 % (1 mg/mL).

Dilutions : Quatre concentrations ont été préparées à partir de la solution mère :

0.025, 0.05, 0,1 et 0,2 mg/mL.

Solution de DPPH[•] : 5 mg de DPPH[•] dissous dans 20 mL d'éthanol à 90 %, laissée au repos 2 h dans l'obscurité.

➤ Réaction avec DPPH[•]

Dans chaque tube à essai :

- 0.1 mL de l'extrait dilué
- 3 mL de solution de DPPH
- Agitation pendant 10 secondes avec un vortex
- Incubation 30 minutes à température ambiante, dans l'obscurité

Blanc : 0.1 mL d'éthanol à 70 % à la place de l'extrait.

Contrôle positif : L'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant de référence. Les mêmes concentrations que celles de l'extrait (0.025 à 0.2 mg/mL) ont été utilisées.

Analyse des résultats

➤ **Pourcentage d'inhibition**

Activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs témoin} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs témoin} \times 100$$

Abs témoin : Absorbance du contrôle négatif après 30 minutes d'incubation

Abs échantillon : Absorbance de l'échantillon après 30 minutes d'incubation

➤ **Détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC50)**

Les résultats sont exprimés en valeur IC50 (la concentration inhibitrice de 50%). C'est la concentration nécessaire de l'échantillon testé pour réduire 50% du radical DPPH. Les IC50 ont été calculées graphiquement à partir des équations de régression linéaire des graphes tracés. Une faible valeur des IC50 indique une forte activité antioxydante.

3.3.2 Activité antibactérienne

Méthode de diffusion sur milieu solide

Tester l'activité antimicrobienne de l'extrait végétal contre une souche bactérienne.

Principe

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, en fonction du diamètre d'inhibition (Thotathil et al., 2023).

Matériel

➤ **Matériel végétal**

Extrait de plante (préparé à différentes concentrations : 12.5 à 200 mg/mL).

➤ **Matériel biologique**

Les souches bactériennes utilisées dans notre travail sont : *Escherichia coli*, *Bacillus spizizenii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Elles sont fournies au sein du laboratoire de Microbiologie, Département de Microbiologie, FSNV, UFMC1, Constantine (Tableau 1).

Table 1. Souches bactériennes

Souches	Etat frais	Gram	Code
<i>Escherichia coli</i>	Bacille	Négatif	NCTC 10538
<i>Bacillus spizizenii</i>	Bacille	Positif	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci	Positif	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille	Négatif	NCIMB 8626

Méthode expérimentale

➤ **Préparation du matériel et des milieux**

- Nettoyer la paillasse à l'aide d'eau de Javel pour éviter toute contamination.
- Allumer le bec Bunsen pour stériliser l'air ambiant autour de la zone de travail.
- Préparer différentes concentrations de l'extrait dans du DMSO stérile (12,5 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 200 mg/mL) : Dans un tube Eppendorf stérile déposer chaque concentration dans 1ml de DMSO et homogénéiser soigneusement au vortex (Figure 8).



Figure 8. Les différentes concentrations de l'extrait

- Couler le milieu Mueller-Hinton stérile dans des boîtes de Pétri, puis le laisser solidifier à température ambiante (Figure 9).

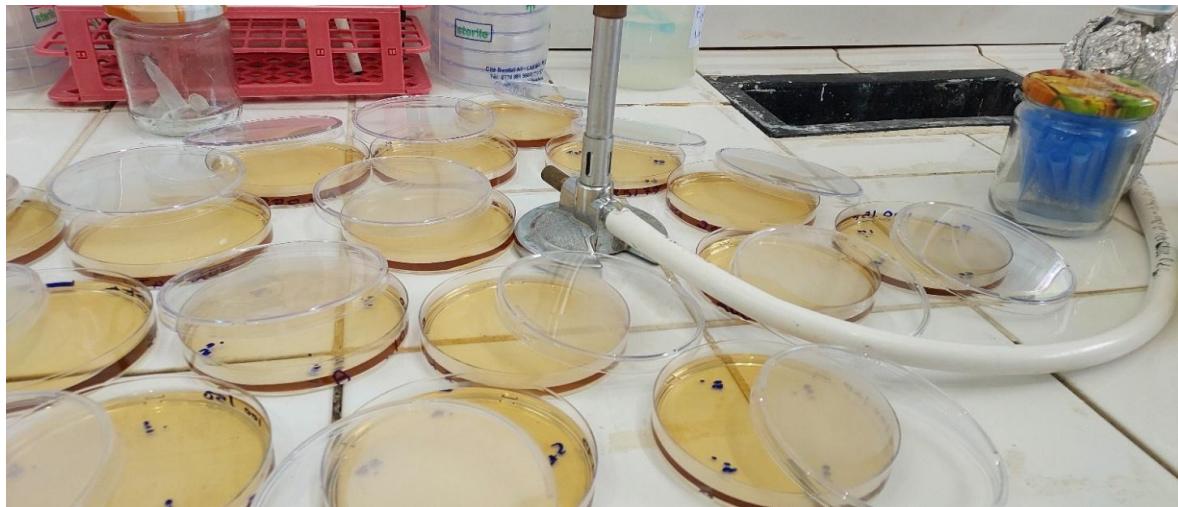


Figure 9. Coulage du milieu Mueller-Hinton dans les boîtes de Pétri

➤ Préparation de l'inoculum bactérien

À l'aide d'une anse de platine stérile, prélever 1 à 2 colonies bien isolées de chaque souche bactérienne et les transférer dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile (0,9 % NaCl). Homogénéiser la suspension au vortex pour obtenir une turbidité équivalente au standard de *McFarland 0,5* ($\approx 10^7$ UFC/mL)



Figure 10. Préparation de l'inoculum bactérien

➤ Ensemencement des boîtes de Pétri

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne standardisée.
- Ensemencer uniformément toute la surface du milieu Mueller-Hinton dans les boîtes de Pétri (Figure 11).
- Laisser sécher la surface de la gélose pendant environ 5 minutes à température ambiante



Figure 11. Ensemencement des boîtes de Pétri

➤ Application des extraits

A- Méthode des trous

On a fait des trous à l'aide d'une pipette Pasteur.

À l'aide d'une micropipette stérile, on a déposé 100 µL de chaque concentration d'extrait dans les trous de la gélose et déposé également 100 µL de DMSO seul comme témoin négatif. Nous avons également mis 100 µL de l'antibiotique que nous avons préparé au centre d'une boîte en tant que témoin positif.

B- Méthode des disques

Des disques de papier stériles (6 mm de diamètre) ont été imprégnés avec l'extrait testé (les différentes concentrations). Après séchage, les disques ont été déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile (Figure 12).

De même des disques contenant le témoin positif (l'antibiotique) ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats de l'extrait testé et les disques imprégnés de DMSO (témoin négatif).



Figure 12. Méthodologie appliquée pour l'activité

➤ Pré-diffusion et incubation

Placer les boîtes de Pétri au réfrigérateur (+4°C) pendant 15 à 30 minutes afin de permettre la pré-diffusion des extraits dans la gélose. Ensuite, incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 heures (Figure 13).



Figure 13. Étape de pré-incubation
à froid

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre des zones d'inhibition (en mm), observées autour des puits ou des disques sur les boîtes de Pétri, après 24h d'incubation à 37°C.

3.4 Activités *in vivo*

3.4.1 Évaluation de l'activité antiulcéreuse

Principe

L'évaluation de l'activité antiulcéreuse repose sur l'utilisation d'un modèle expérimental d'ulcération gastrique induite par un mélange d'acide chlorhydrique et d'éthanol (HCl/EtOH, 20/80) selon la méthode Roberts et Wink, 1998. Ce modèle permet d'observer les effets protecteurs de l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* comparés à un médicament de référence.

Matériel

➤ Matériel végétal

Extrait hydro-méthanolique d'*Anastatica hierochuntica*, dissous dans de l'eau distillée.

Les doses testées :

Dose 1 : 500 mg/kg

Dose 2 : 1000 mg/kg

➤ Matériel Animal

Rats (150–200 g), à jeun pendant 48 heures, avec accès à l'eau jusqu'à 2 heures avant l'expérimentation. Fournis par l'animalerie de l'Université Constantine (Figure 14).

Méthode

➤ Répartition des groupes expérimentaux

Les rats sont répartis en cinq groupes ($n = 3$ rats/groupe) recevant chacun un traitement par voie orale, ajusté en fonction du poids (0,2 mL pour 20 g) selon le tableau 2 :



Figure 14. Répartition des rats albinos dans les groupes expérimentaux

Table 2. Répartition des différents lots selon le type du traitement administré

Les Lots	Traitement administré
Témoin négatif	Eau distillée uniquement
Témoin positif	Agent ulcérogène uniquement (HCl/EtOH 20/80).
Référence	Les rats reçoivent Lomac 100mg/ml Après une heure les rats reçoivent de l'agent ulcérogène
Lot Dose 1	Les rats reçoivent la dose 1 de l'extrait. après une heure les rats reçoivent de l'agent ulcérogène.
Lot Dose 2	Les rats reçoivent la dose 2 de l'extrait. après une heure les rats reçoivent de l'agent ulcérogène.

➤ Procédure post-induction

Une heure et demie après l'induction des ulcères, les rats sont sacrifiés sous anesthésie au chloroforme (Figure 15-16). Les estomacs sont prélevés, rincés à l'eau distillée, puis ouverts le long de la grande courbure. Ils sont transférés dans des boîtes de Pétri, chaque estomac est photographié, et les lésions sont tracées sur papier transparent, puis transférées sur papier millimétré afin de mesurer la surface ulcérée.



Figure 15. La paillasse de travail

➤ Calcul du pourcentage de protection

Le pourcentage de protection calculé selon la formule suivante :

$$\text{Protection (\%)} = [(\text{Usc} - \text{Ust}) / \text{Usc}] \times 100$$

Usc : surface ulcérée du contrôle.

Ust : surface ulcérée du test.



Figure 16. Dissection de rat

3.4.2 Observation histologique des tissus gastriques

Afin d'évaluer les altérations microscopiques au niveau des estomacs prélevés, une analyse histologique a été réalisée au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt). Les étapes ont été menées selon les techniques classiques utilisées en histologie tissulaire.

Échantillons biologiques : Fragments d'estomac prélevés chez les animaux étudiés.

Méthodes

➤ Prélèvement et fixation

Les estomacs ont été prélevés immédiatement après dissection, rincés à l'eau physiologique, puis des fragments représentatifs ont été fixés dans du formol tamponné à 10 % pendant 24 heures pour stabiliser les structures cellulaires.

➤ Déshydratation

Les échantillons ont été déshydratés par immersion dans des bains d'alcool de concentrations croissantes :

- 70° : 1 h × 2
- 80° : 1 h

- 96° : 1 h × 3

➤ **Inclusion**

Les échantillons ont ensuite été moulés dans des blocs de paraffine.

➤ **Coupe**

Les blocs paraffinés ont été coupés au microtome en tranches de 3 µm. Les coupes ont été montées sur lames.

➤ **Coloration Hématoxyline-Éosine**

1. Déparaffinage au Xylène : 2 × 15 min
2. Alcool 96° : 5 min
3. Alcool 80° : 3 min ×2
4. Rinçage à l'eau : 3 min
5. Hématoxyline : 2–4 min
6. Rinçages : eau froide, eau chaude (3 min), eau froide (2 min)
7. Contre coloration à l'éosine : 1 min 30 s à 2 min
8. Rinçage à l'eau
9. Séchage pendant 10 min
10. Montage final

➤ **Observation sous microscope grossissement ×20**

3.4.3 Evaluation de l'activité Analgésique

Test de torsion (Writhing Test)

Principe

Le test de torsion (Writhing Test) consiste à injecter de l'acide acétique (1 %) par voie intrapéritonéale chez des souris. Cette injection induit des douleurs caractérisées par des torsions abdominales (writhings), qui peuvent être atténuées par des substances à effet analgésique(Gutiérrez-Sarmiento and Robledo-Abarca, 2022).

Matériel

➤ Matériel végétal

Extrait d'*Anastatica hierochuntica* dissous dans de l'eau distillée.

➤ Matériel animal

Souris albinos femelles (20 à 35 g), à jeun pendant 24h.

Méthode

➤ Doses testées

Dose 1 : 150 mg/kg ; Dose 2 : 400 mg/kg

➤ Répartition expérimentale

Quatre groupes de trois souris chacun reçoivent les traitements suivants (Tableau 3) :

Table 3. Répartition des différents lots selon le type de suspension administré

Les lots	Suspension administée
Lot Témoin	eau physiologique
Lot Dose 1	extrait (150 mg/ml)
Lot Dose 2	extrait (400 mg/ml)
Lot Médicament	Médicament (Paracétamol)

➤ Protocole expérimental

À T0 : administration orale des suspensions selon le poids (0,2 mL pour 20 g)

À T0 + 30 min : injection intrapéritonéale d'acide acétique à 1 % (Figure 17)

À T0 + 35 min : observation des souris pendant 20 minutes et comptage des torsions abdominales



Figure 17. Injection intrapéritonéale d'acide acétique

3.4.4 Évaluation de l'activité sur la cyclicité œstrale chez la rate

Matériel

➤ Matériel Animal

L'expérimentation a été menée sur des rats adultes de souche Wistar, âgés de 4 à 6 mois, pesant entre 160 et 200g. Les animaux ont été hébergés dans des cages en polypropylène (3 rats par cage), dans une salle à température ambiante avec une humidité relative constante et une photopériode naturelle. La nourriture et l'eau étaient disponibles ad libitum.

➤ Matériel végétal

Extrait de la plante

Principe

La cyclicité œstrale chez la rate est un indicateur biologique de l'état fonctionnel du système reproducteur. Elle comprend quatre phases successives – proestrus, œstrus, metœstrus et diœstrus – qui peuvent être identifiées à l'aide de frottis vaginaux quotidiens. Cette méthode,

largement utilisée dans la recherche préclinique, permet d'évaluer l'effet de substances naturelles sur la régularité du cycle hormonal (Ngadjui *et al.*, 2013).

Méthode

➤ Suivi du cycle œstral

Avant toute administration, les cycles œstraux doivent être suivis pendant 21 jours consécutifs chez chaque rate.

Deux méthodes de prélèvement des cellules vaginales ont été utilisées pour réaliser les frottis :

A- Lavage vaginal par pipette

Environ 0,1 mL de sérum physiologique a été introduit dans le vagin à l'aide d'une pipette Pasteur, puis aspiré pour récupérer les cellules. Le liquide a été étalé sur une lame, séché à l'air, fixé avec du méthanol, coloré au bleu de méthylène et observé au microscope.

B- Frottis par écouvillon

Un écouvillon stérile humidifié avec du sérum physiologique a été inséré délicatement dans le vagin pour prélever les cellules. L'écouvillon a ensuite été frotté sur une lame (en suivant les mêmes étapes de fixation et de coloration).

➤ Observation microscopique

Les lames ont été observées chaque jour à un grossissement de 10x à 40x. L'objectif était de différencier les phases du cycle œstral en se basant sur les types cellulaires présents.

➤ Expression des résultats

Les résultats attendus devaient être exprimés sous forme de séquences journalières des phases œstrales pour chaque animal. L'identification répétée d'un cycle complet (proestrus → œstrus → metœstrus → diœstrus) sur une durée de 4 à 5 jours était nécessaire pour confirmer la cyclicité normale.

Les types cellulaires attendus pour chaque phase sont (Figure 18) :

Proestrus : cellules épithéliales nucléées.

Œstrus : cellules kératinisées, sans noyaux.

Metœstrus : mélange de cellules kératinisées et de leucocytes.

Dioestrus : prédominance de leucocyte

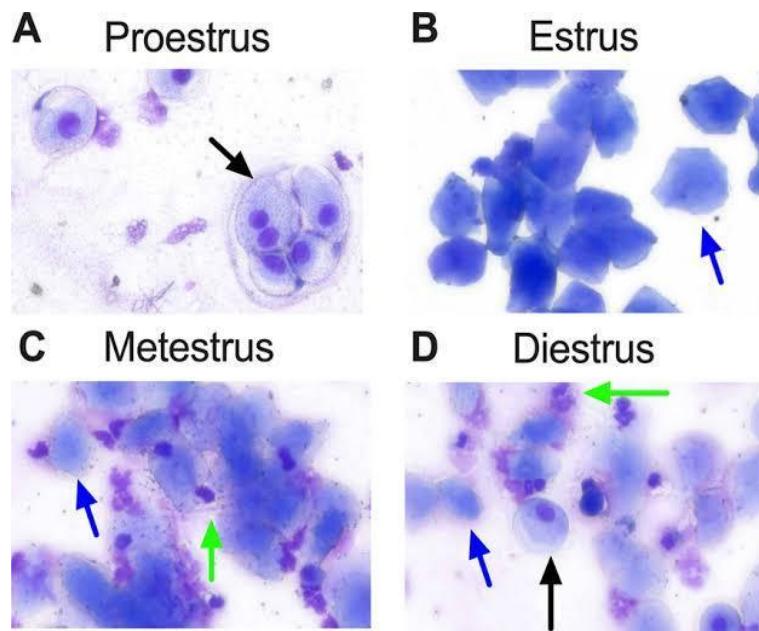


Figure 18. Les types cellulaires de chaque phase de cycle œstral Reference Robinson (Christen et al. 2022).

Résultats et Discussion

4 Résultats et discussions

4.1 Calcul du rendement

Le rendement d'extraction permet d'évaluer l'efficacité de la méthode employée pour récupérer les constituants solubles de la plante. Il est exprimé en pourcentage et se calcule selon la formule suivante

$$\text{Rendement (\%)} = \{\text{Masse de l'extrait sec (g)}\} / \{\text{Masse de la plante sèche (g)}\} \times 100$$

200 g de plante sèche ont été soumis à une extraction hydro-méthanolique, ce qui a permis d'obtenir 17 g d'extrait sec.

$$\text{Rendement (\%)} = (17 / 200) \times 100 = 8,5 \%$$

Le rendement d'extraction obtenu dans cette étude est de **8,5 %**, ce qui reste dans les valeurs couramment rapportées pour des extraits méthanoliques de plantes médicinales. En effet, (Adam *et al.*, 2019) soulignent que le rendement peut varier selon plusieurs facteurs, notamment la nature de la plante, le solvant utilisé, ainsi que les conditions d'extraction. Le méthanol, en tant que solvant polaire est souvent associé à des rendements modérés à élevés ce qui corrobore les résultats obtenus ici.

4.2 Analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes

4.2.1 Teneur en polyphénols totaux

Après l'addition du réactif Folin-Ciocalteu et de la solution de Na₂CO₃ à l'extrait, l'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La courbe d'étalonnage avec l'acide gallique (standard) a été établie en mesurant l'absorbance de différentes concentrations standards à 765 nm. Cette courbe permet de déterminer la teneur en composés phénoliques totaux des extraits à partir de leur absorbance mesurée (Figure 19).

Absorbance moyenne mesurée : 0,280

Résultats et discussions

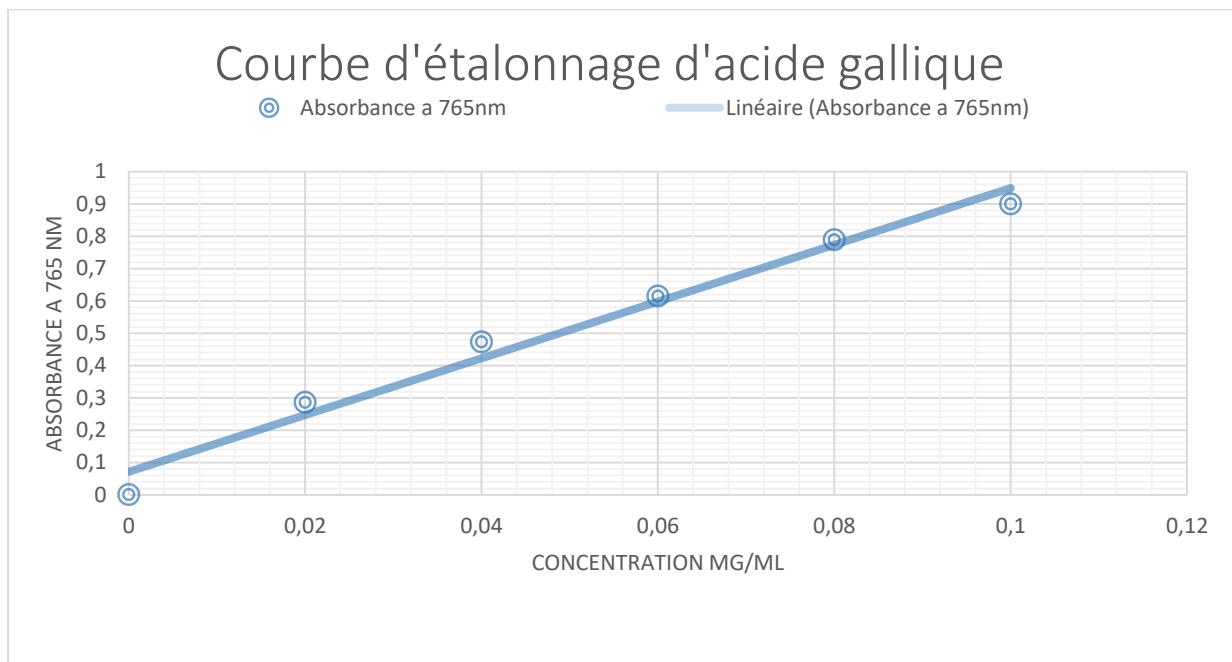


Figure 19. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur en polyphénols totaux dans l'extrait a été estimée à :**23,77 mg EAG/gE**

Les résultats obtenus dans notre étude montrent une teneur modérée en polyphénols totaux (23,77 mg EAG/gE), inférieure à celle rapportée par (Mohamed *et al.*, 2010) dans un extrait méthanolique pur (51,97 mg EAG/gE). Cette différence pourrait être liée à plusieurs facteurs, notamment la variabilité biologique de la plante ou la méthode de séchage de la plante (à l'air libre, au four, ou par lyophilisation) peuvent fortement influencer la conservation des composés phénoliques. Certains de ces composés, notamment les tanins et les acides phénoliques, sont sensibles à la chaleur et à l'oxydation. Il est donc probable qu'une partie des polyphénols ait été dégradée ou altérée lors du séchage ou du stockage de l'échantillon végétal.

4.2.2 Teneur en flavonoïdes totaux

Après l'addition du AlCl_3 , une coloration jaune est apparue, indiquant la présence de flavonoïdes. L'absorbance mesurée à 415 nm a permis de déterminer leur teneur dans l'extrait

Résultats et discussions



Figure 20. Coloration de l'échantillon après 10 min d'incubation

La valeur d'absorbance mesurée par le spectrophotomètre (Tableau 4) :

Table 4. Valeur d'absorbance de l'extrait mesurée à 430 nm

Absorbance à 430 nm
0,269

La courbe d'étalonnage de la quercitrine (standard) a été établie en mesurant l'absorbance de différentes concentrations standards à 430 nm. Cette courbe permet de déterminer la teneur en flavonoïdes d'extraits à partir de leur absorbance mesurée (Figure 21).

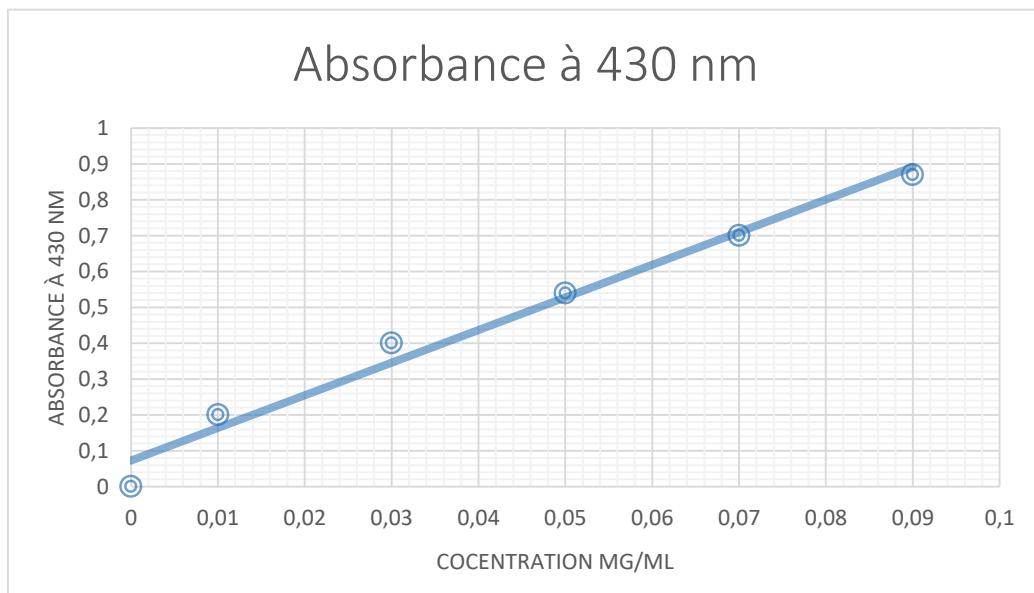


Figure 21. Courbe d'étalonnage de la Quercétine

Teneur en flavonoïdes : 22,4 mg EQ /gE

Résultats et discussions

L'extrait d'*Anastatica hierochuntica* présente une teneur en flavonoïdes totaux de **22,4 mg EQ/g**, une valeur relativement proche de celle rapportée par (Almundarij *et al.*, 2021), qui a obtenu **17,45 mg EQ/g** dans un extrait de la même plante. Ce qui confirme la bonne extraction de cette sous-classe des polyphénols, indépendamment de la méthode utilisée. Cela suggère que les flavonoïdes présents dans la plante sont majoritairement solubles dans les deux types de solvants (méthanol pur et mélange hydroalcoolique), contrairement à d'autres classes phénoliques plus sensibles.

4.3 Activités *in vitro*

4.3.1 3.1. Activité anti-oxydante

L'activité antioxydante a été évaluée par le test DPPH basé sur la capacité de l'extrait à piéger le radical libre DPPH[•], provoquant une décoloration mesurée à 517 nm.



Figure 22. Décoloration du radicale DPPH en présence des différentes concentrations de l'extrait d'*A.hieriochuntica*

Cette décoloration visuelle témoigne de la capacité de l'extrait à réduire le DPPH[•], confirmant une activité antioxydante (Figure 22).

Les valeurs d'absorbance mesurées par le spectrophotomètre des différentes concentrations (Tableau 5) ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition du radical selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs témoin} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs témoin}) \times 100$$

Résultats et discussions

Table 5. Variation des absorbances et pourcentage de réduction du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'*A. hierochuntica*

Concentration (mg/ml)	Absorbance	Pourcentage d'inhibition
Témoin	0,862	0%
0,025	0,595	30,97%
0,05	0,481	44,20%
0,1	0,415	51,85%
0,2	0,449	47,91%

La diminution du pourcentage d'inhibition à 0,2 mg/mL pourrait être due à un effet pro-oxydant à forte concentration ou à une saturation du système DPPH

L'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant de référence (témoin positif) pour comparer l'efficacité relative de l'extrait.

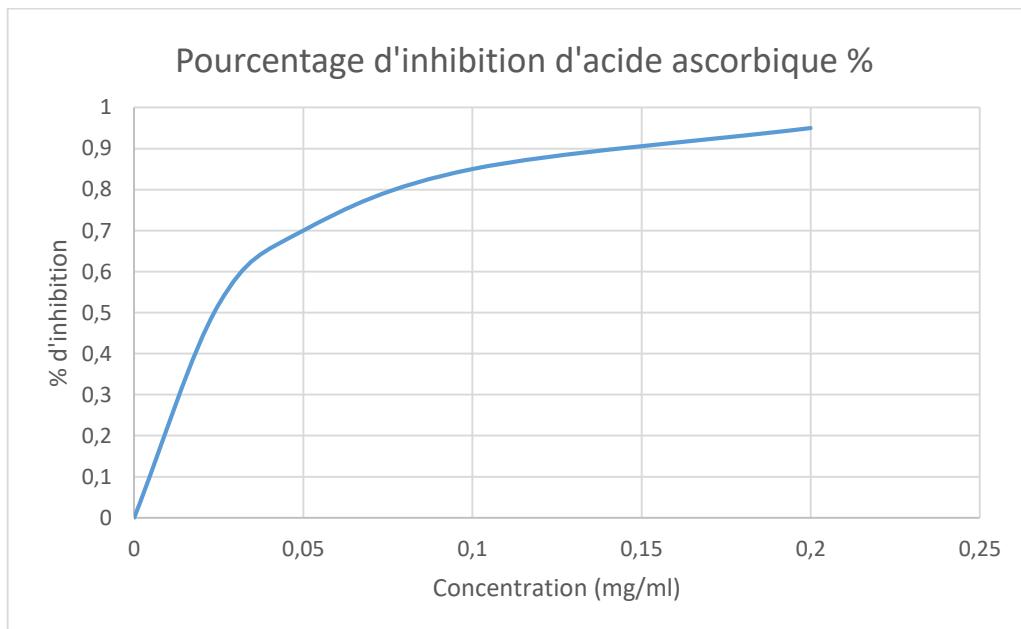


Figure 23. Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,020 \text{ mg/ml}$)

Résultats et discussions

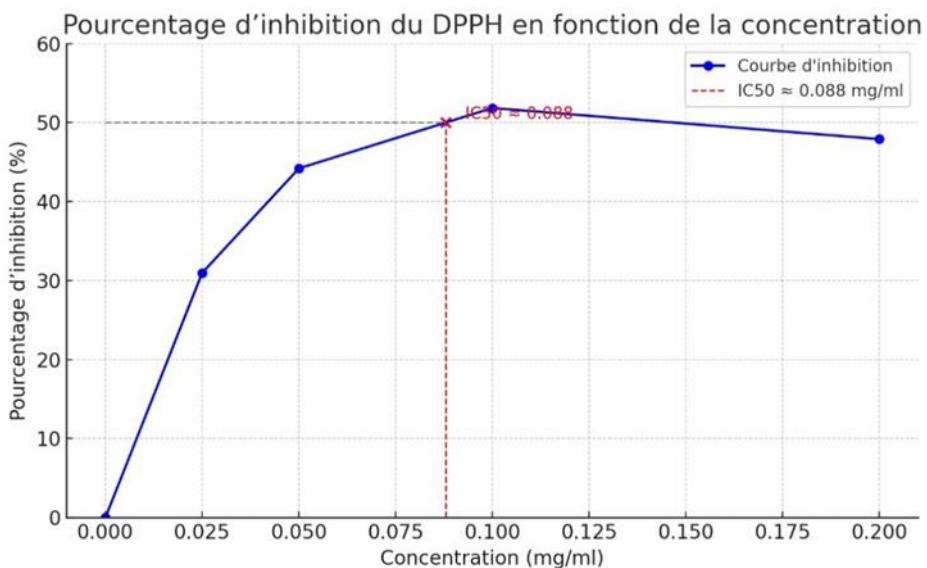


Figure 24. Détermination de l'IC₅₀ de l'extrait *d'A. hierochuntica*

➤ Détermination d'IC₅₀

L'IC₅₀, concentration nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux DPPH•, a été déterminée graphiquement à partir de la courbe de régression reliant les pourcentages d'inhibition aux différentes concentrations testées.

Le calcul graphique de l'IC₅₀ (Figure 24) de l'extrait a permis d'estimer une valeur d'environ 0,088 mg/ml, indiquant une activité antioxydante modérée, bien que moins efficace que l'acide ascorbique (IC₅₀ = 0,020 mg/ml).

L'IC₅₀ mesurée dans notre étude (0,088 mg/mL) est inférieure à celle rapportée par Faten et al. (2016), qui ont obtenu une valeur d'environ 0,172 mg/mL pour un extrait Alcoolique. Cette différence d'activité antioxydante pourrait être liée à la teneur en composés phénoliques, au type de solvant utilisé pour l'extraction, ainsi qu'aux conditions environnementales propres à la provenance botanique de la plante. Ainsi, l'extrait méthanolique *d>Anastatica hierochuntica* étudié ici présente une activité antioxydante modérée.

4.3.2 Activité antibactérienne

Afin d'évaluer le degré d'activité antibactérienne des extraits *d>Anastatica hierochuntica*, nous avons adopté les critères de classification proposés par Thotathil *et al.* (2023). Selon ces auteurs, l'activité antimicrobienne est catégorisée comme suit en fonction du diamètre moyen de la zone d'inhibition :

- Bonne activité antibactérienne : Diamètres \geq 14 mm
- Activité antibactérienne moyenne : Diamètres entre 10 et 13 mm

Résultats et discussions

- Pas d'activité antibactériennes : Diamètres < 10 mm

L'antibiotique (Amoclan) a été utilisé comme témoin positif dans notre étude. Il a induit des zones d'inhibition bien visibles contre toutes les souches testées, ce qui confirme l'efficacité de la méthode appliquée et sert de référence pour comparer l'activité de l'extrait végétal.

Les solvants utilisés pour la préparation des extraits, à savoir le méthanol et le DMSO (stérile), ont été également testés séparément en tant que témoins négatifs. Aucune zone d'inhibition n'a été observé avec ces solvants, ce qui confirme que l'effet antibactérien observé est bien attribuable aux composés actifs présents dans l'extrait d'*A. hierochuntica*, et non aux solvants.



Figure 25. Control négatif et méthanol (solvant de l'extrait)

➤ Méthode des puits

Dans notre cas, aucune zone d'inhibition n'a été observée avec cette méthode, ce qui peut être dû à une mauvaise diffusion du composé ou à une concentration insuffisante.

Résultats et discussions

➤ Méthode des disques

Les résultats sont présentés dans le tableau 6 et les figures (26, 27, 28 et 29)

Table 6. Activité antibactérienne de l'extrait

Souche CN	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus spizizenii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25mg/ml	2mm	0mm	8mm	0mm
50mg/ml	10mm	7mm	10mm	0mm
75mg/ml	13mm	0mm	19mm	5mm
100mg/ml	15mm	9mm	20mm	10mm
200mg/ml	16mm	0mm	25mm	28mm

Résultats et discussions

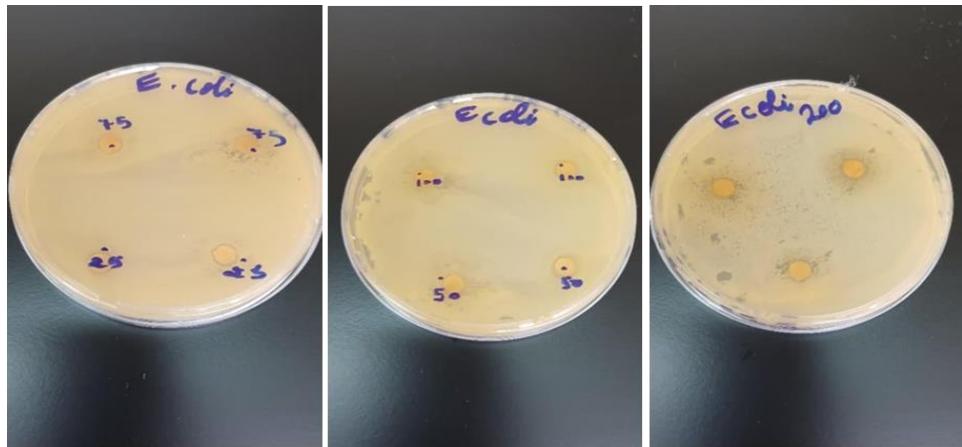


Figure 26. Résultat de l'effet de l'extrait sur la souche *Escherichia coli*

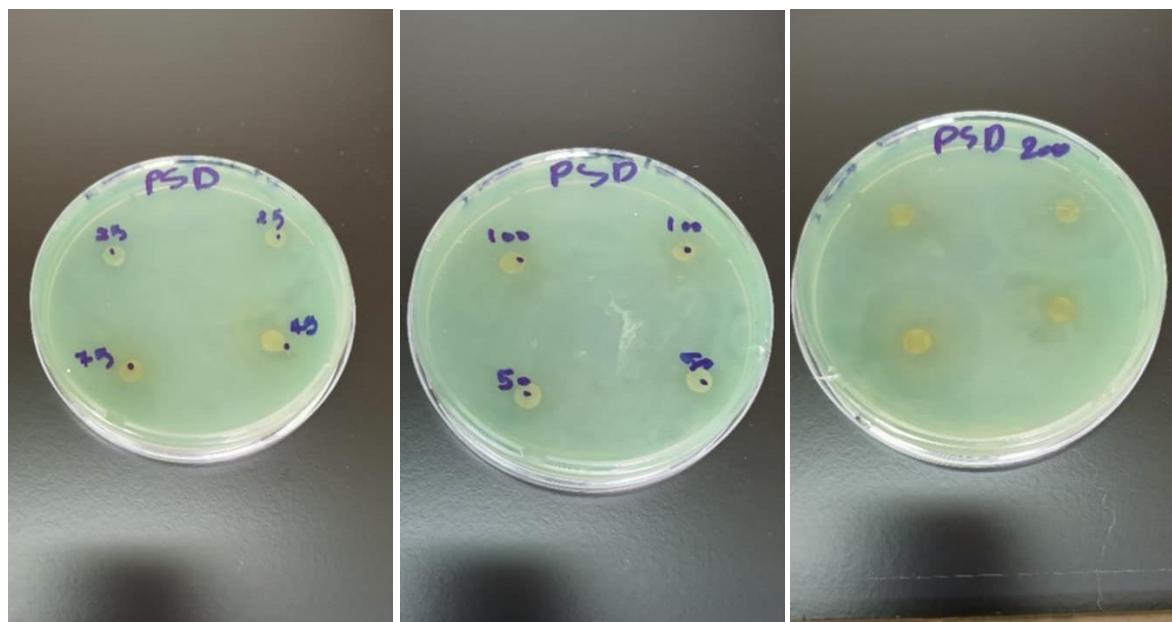


Figure 27. Résultat de l'effet de l'extrait sur la souche *Pseudomonas aeruginosa*

Résultats et discussions

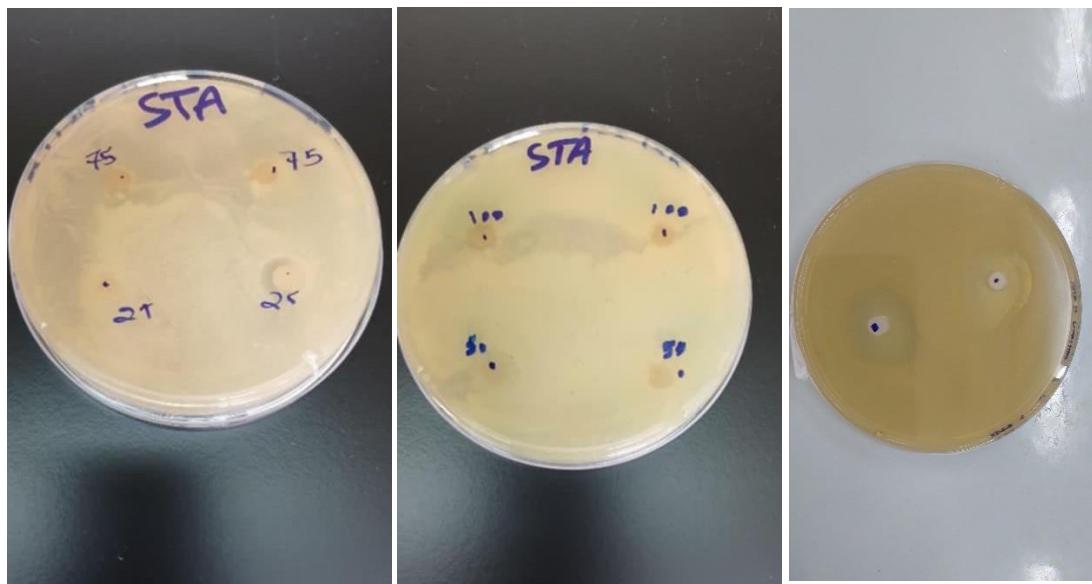


Figure 29. Résultat de l'effet de l'extrait sur la souche *Staphylococcus aureus*



Figure 28. Résultat de l'effet de l'extrait sur la souche *Bacillus spizizenii*

Table 7. Sensibilité des souches testées a l'extrait

Souche CN	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus spizizenii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25mg/ml	Pas d'activité antibactérienne	Pas d'activité antibactérienne	Pas d'activité antibactérienne	Pas d'activité antibactérienne
50mg/ml	activité antibactérienne moyenne	Pas d'activité antibactérienne	activité antibactérienne moyenne	Pas d'activité antibactérienne
75mg/ml	activité antibactérienne moyenne	Pas d'activité antibactérienne	Bonne activité antibactérienne	Pas d'activité antibactérienne
100mg/ml	Bonne activité antibactérienne	Pas d'activité antibactérienne	Bonne activité antibactérienne	activité antibactérienne moyenne
200mg/ml	Bonne activité antibactérienne	Pas d'activité antibactérienne	Bonne activité antibactérienne	Bonne activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* a révélé une variation notable de l'effet inhibiteur selon la souche bactérienne testée et la concentration de l'extrait.

***Escherichia coli* (Gram -) :** L'extrait a montré une activité croissante en fonction de la concentration, passant de 2 mm (à 25 mg/ml) à 16 mm (à 200 mg/ml). À partir de 100 mg/ml, l'activité est classée comme bonne, indiquant une efficacité dose-dépendante contre *E. coli*. Ceci suggère que certains composés bioactifs de l'extrait sont capables de perturber la paroi cellulaire de cette bactérie Gram-négative, malgré leur plus grande résistance naturelle.

***Bacillus spizizenii* (Gram +) :** Les résultats montrent une activité très limitée. Une inhibition n'est apparue qu'à 50 mg/ml (7 mm) et 100 mg/ml (9 mm), avec aucune activité détectée aux

Résultats et discussions

autres concentrations. Ces résultats indiquent que *B. spizizenii* est probablement moins sensible aux composés présents dans l'extrait, ou que leur diffusion dans le disque est insuffisante.

***Staphylococcus aureus* (Gram +) :** L'extrait a montré une activité antibactérienne forte dès 75 mg/ml (19 mm), atteignant 25 mm à 200 mg/ml. Ceci classe l'extrait comme hautement efficace contre *S. aureus*, une bactérie souvent impliquée dans les infections cutanées et résistante à plusieurs antibiotiques. Ces résultats sont prometteurs et confirment le potentiel thérapeutique de *A. hierochuntica* contre les souches Gram positives.

***Pseudomonas aeruginosa* (Gram -) :** L'activité contre cette souche est apparue seulement à partir de 75 mg/ml (5 mm), pour atteindre 28 mm à 200 mg/ml, ce qui indique une excellente activité antibactérienne à forte concentration. Étant donné la résistance naturelle de *P. aeruginosa* à plusieurs antibiotiques, cette sensibilité tardive mais marquée à haute concentration suggère que certains constituants de l'extrait sont actifs mais nécessitent une dose élevée pour traverser la barrière externe complexe de cette bactérie.

Selon Thotathil *et al.* (2023), les extraits de *A. hierochuntica* inhibent la croissance des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Ils ont identifié des composés tels que le β-sitostérol et le campestérol, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Ces composés pourraient expliquer l'efficacité observée contre *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. (Thotathil *et al.*, 2023)

L'extrait méthanolique de *A. hierochuntica* possède des activités antimicrobiennes et antioxydantes. Il est suggéré que ces effets sont dus à la présence de flavonoïdes, tanins et saponines, qui peuvent perturber les membranes bactériennes et inhiber la synthèse des protéines microbiennes. Ces composés ont démontré leur capacité à activer les phagocytes et à exercer une activité microbicide, augmentant ainsi la résistance aux infections. (Zin *et al.*, 2017)

En revanche, *Bacillus spizizenii* s'est révélé résistant à la majorité des concentrations testées, ce qui pourrait indiquer une résistance intrinsèque ou une inefficacité de l'extrait contre cette souche.

L'extrait d'*Anastatica hierochuntica* présente une activité antibactérienne prometteuse, particulièrement contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, soutenant son utilisation traditionnelle dans le traitement des infections.

4.4 Activités biologique *in vivo*

4.4.1 Evaluation de l'activité anti-ulcèreuse

L'extrait hydro-méthanolique d'*Anastatica hierochuntica* a été évalué pour son effet gastro-protecteur contre les ulcères gastriques induits par un mélange acide/alcool (80 % éthanol, 20 % HCl) chez des rats Wistar. Pour évaluer son efficacité, l'extrait a été comparé à celui d'un médicament commercial, Lomac.

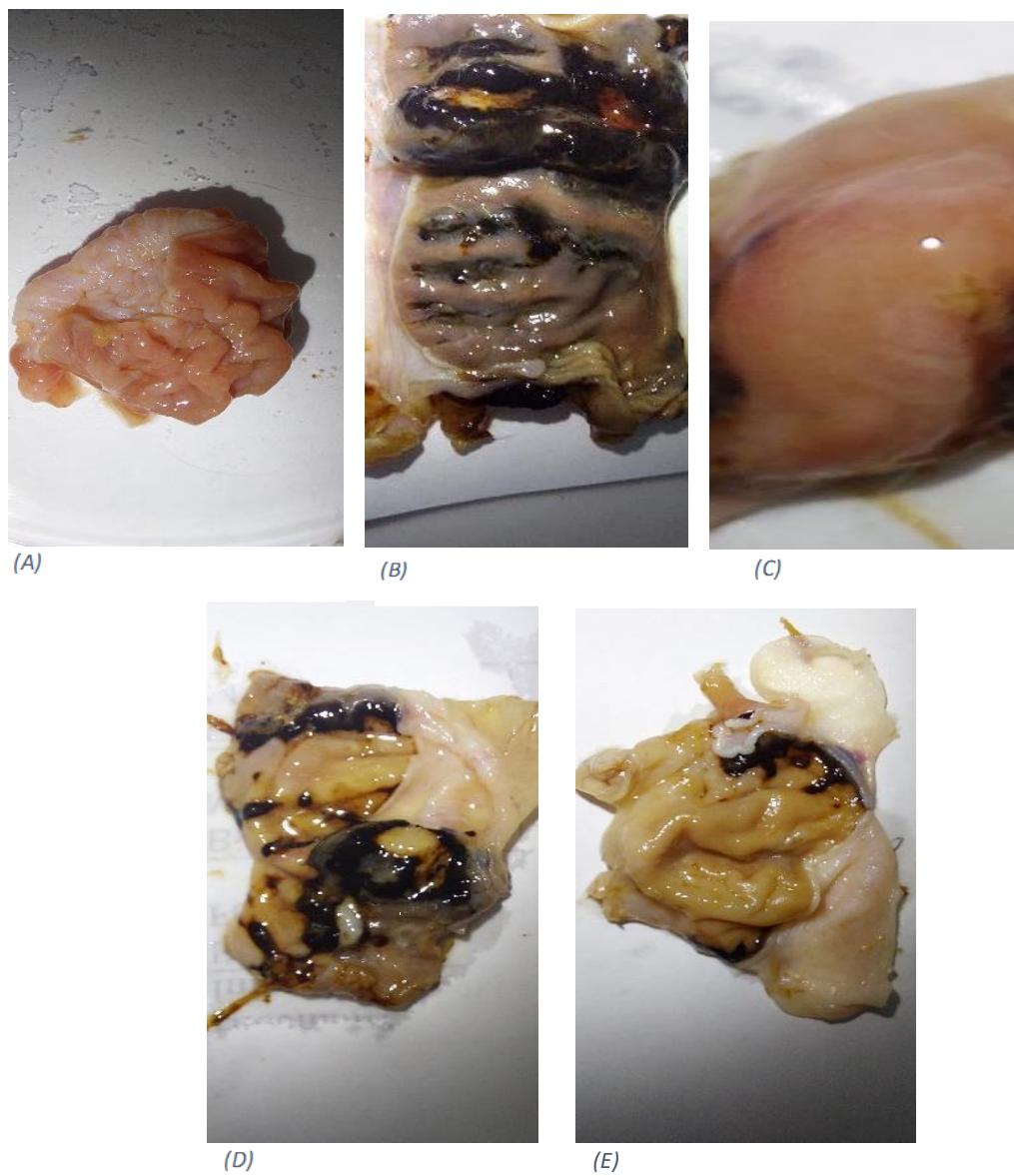


Figure 30. Observation macroscopique des estomacs des rats (A) Témoin négatif (eau distillée) / (B) Témoin positif (HCl/éthanol) / (C) Groupe traité par Lomac / (D) Groupe traité par l'extrait à 500 mg/kg / (E) Groupe traité par l'extrait à 1000 mg/kg

Résultats et discussions

➤ Observation macroscopique

Après dissection et ouverture des estomacs (Figures 30), les muqueuses ont été examinées à l'œil nu. Le groupe témoin négatif (eau distillée) montre une muqueuse gastrique normale, sans lésions apparentes. Le groupe contrôle positif (HCl/éthanol seul) présente des lésions hémorragiques étendues traduisant une forte ulcération.

Chez les rats prétraités par Lomac une nette réduction des lésions est observée. De même, l'administration de l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* à 500 mg/kg entraîne une réduction modeste des lésions ulcérées. Mais, à la dose de 1000 mg/kg, une réduction marquée des lésions est observée, indiquant un effet gastroprotecteur dose-dépendant.

Le pourcentage de protection a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Protection} = [(U\text{Sc} - U\text{St}) / U\text{Sc}] \times 100$$

USc : surface ulcérée moyenne chez le groupe témoin positif

USt : surface ulcérée moyenne chez le groupe traité

Les résultats sont montrés dans le tableau 7 :

Table 8. Comparaison de l'effet gastro-protecteur de l'extrait d'*Anastatica hierochuntica*

Lots (2 rat)	Substance administrée	Surface ulcérée mm	Effet gastroprotecteur (%)
Témoin négatif	Eau distillée	0	-
Témoin positif (agent ulcérogène)	HCL+ éthanol	550	-
Traité par médicament	Lomac + HCL+ éthanol	62 mm	88,73%
La dose 1	Extrait 500mg/kg + HCL+ éthanol	381,25 mm	30,68%
La dose 2	Extrait 1000mg /kg + HCL+ éthanol	190 mm	65,45%

Les résultats montrent que l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* à 500 mg/kg exerce un effet protecteur modéré, avec un pourcentage de protection de 30,68 %. À 1000 mg/kg, l'effet

Résultats et discussions

est plus prononcé, atteignant 65,45 %, et devient comparable à celui du médicament de référence Lomac (88,73%). Ces données suggèrent que l'extrait possède une activité anti-ulcéreuse dose-dépendante, plus efficace à dose élevée.

Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par (Mp Bhandari, 2014b), qui ont évalué un extrait éthanolique de la plante contre des ulcères gastriques induits par divers agents nécrosants, dont l'éthanol à 80 %. Leur étude a montré une protection significative, particulièrement à forte dose, ce qui rejoint nos propres observations.

4.4.2 Observation histologique des tissus gastriques

- **Observation microscopique**
- **Groupe témoin négatif (eau distillée)**

L'examen histologique de la muqueuse gastrique du groupe témoin négatif montre une structure normale et bien conservée de la paroi de l'estomac. La muqueuse est intacte, sans signes d'érosion, d'œdème, ni infiltration inflammatoire. L'épithélium est régulier, les glandes gastriques sont bien organisées, et la muscularis mucosae reste continue. L'absence de lésions histopathologiques indique que le protocole d'expérimentation (sans agent ulcérogène) n'a pas induit de dommage tissulaire (Figure 31).

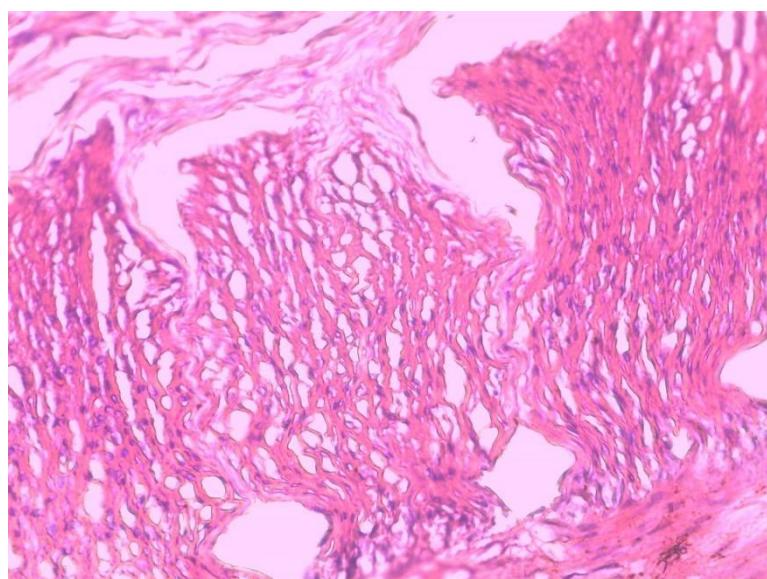


Figure 31. Coupe histologique de la muqueuse gastrique chez le rat du groupe témoin négatif, colorée à l'hématoxyline-éosine, grossissement $\times 20$. On observe une architecture normale de la muqueuse sans altérations apparentes.

Résultats et discussions

- Groupe témoin positif (HCl + éthanol)

L'analyse histologique des tissus gastriques chez les rats traités uniquement par le mélange acide/alcool (80 % éthanol + 20 % HCl) révèle des altérations sévères de la muqueuse gastrique. On observe une désorganisation marquée de la structure épithéliale, associée à une dénudation de la muqueuse, une perte d'intégrité des glandes gastriques, et une infiltration cellulaire importante, traduisant une inflammation aiguë.

La couche muqueuse est fortement affectée, avec présence de zones de nécrose, d'œdème, et une architecture globale effondrée. Ces résultats confirment l'induction efficace d'ulcères gastriques par l'agent ulcérogène (Figure 32).

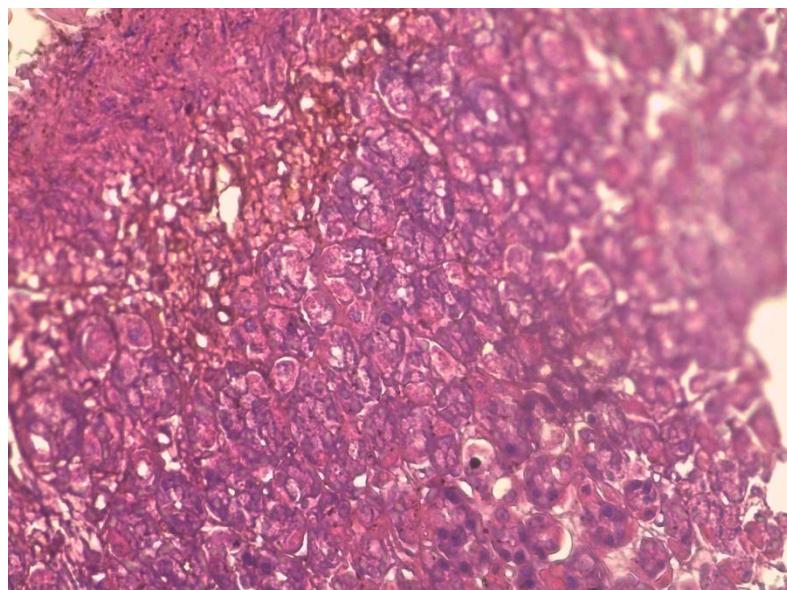


Figure 32. Coupe histologique de l'estomac de rat traité par HCl/éthanol (agent ulcérogène), colorée à l'hématoxylène-éosine, grossissement $\times 20$. On observe une perte de la structure normale, une infiltration inflammatoire et une destruction tissulaire.

- Groupe traité par le médicament de référence (Lomac)

Chez les rats ayant reçu le traitement par Lomac avant l'induction des ulcères, l'analyse histologique révèle une régénération tissulaire plus avancée. La muqueuse gastrique présente une structure glandulaire bien organisée, avec peu de signes de dégénérescence cellulaire. La densité des cellules inflammatoires est faible et aucun signe évident de nécrose

Résultats et discussions

n'est observé. Ces observations confirment l'efficacité du médicament de référence dans la protection contre les lésions gastriques induites, avec une récupération tissulaire quasi complète (Figure 33).

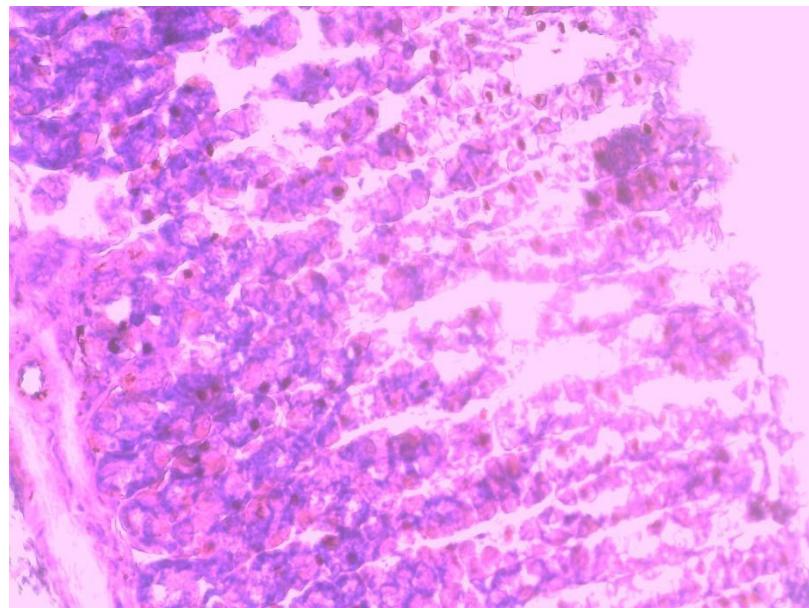


Figure 33. Coupe histologique de l'estomac de rat traité par Lomac + HCl/éthanol, colorée à l'hématoxyline-éosine, grossissement $\times 20$. On observe une architecture muqueuse largement préservée, avec une faible infiltration inflammatoire.

- Groupe traité par l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* à 500 mg/kg

L'examen histologique de l'estomac des rats ayant reçu l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* à 500 mg/kg montre une protection modérée contre les lésions induites par le mélange HCl/éthanol. La muqueuse gastrique présente une meilleure organisation cellulaire que le groupe témoin positif, bien qu'on observe encore des zones de désorganisation et une infiltration inflammatoire modérée.

La couche épithéliale est partiellement intacte, et les glandes gastriques sont visibles mais altérées. La présence de noyaux bien visibles et d'une structure cellulaire plus dense indique un effet protecteur partiel de l'extrait à cette dose, suggérant une action dose-dépendante (Figure 34).

Résultats et discussions

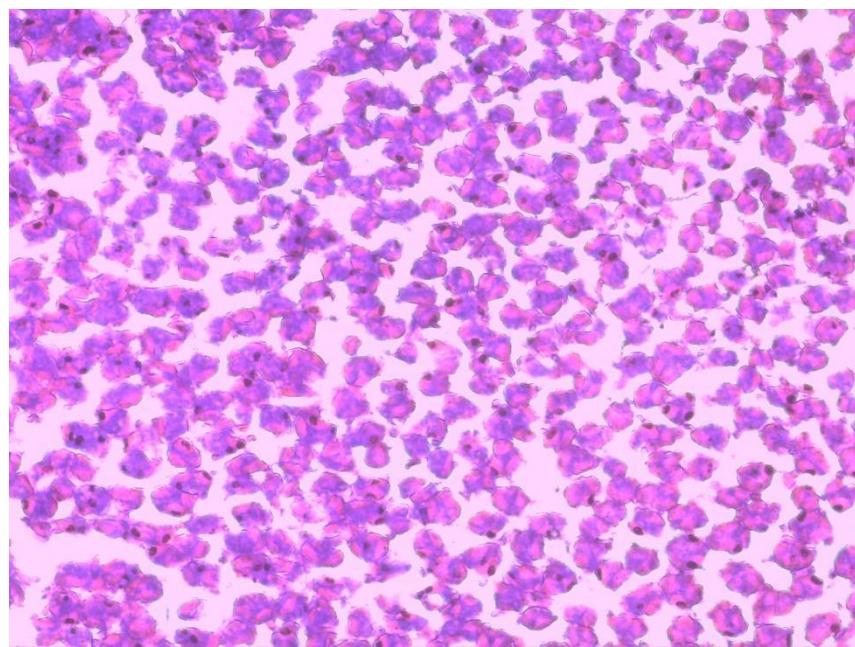


Figure 34. Coupe histologique de l'estomac de rat traité par l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* à 500 mg/kg + HCl/éthanol, colorée à l'hématoxyline-éosine, grossissement ×20. L'organisation glandulaire est partiellement restaurée avec des signes d'inflammation

- Groupe traité par extrait d'*Anastatica hierochuntica* à 1000 mg/kg

L'analyse histologique de l'estomac des rats prétraités par l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* à 1000 mg/kg montre une amélioration notable de l'état de la muqueuse gastrique. La structure glandulaire est partiellement préservée, avec une organisation relativement ordonnée des cellules épithéliales.

Bien qu'une légère infiltration inflammatoire soit encore présente, elle est nettement moins marquée que dans le groupe témoin positif. On note également une réduction des zones de nécrose et une meilleure intégrité de la couche muqueuse, traduisant une activité gastroprotectrice significative à dose élevée (Figure 35).

Résultats et discussions

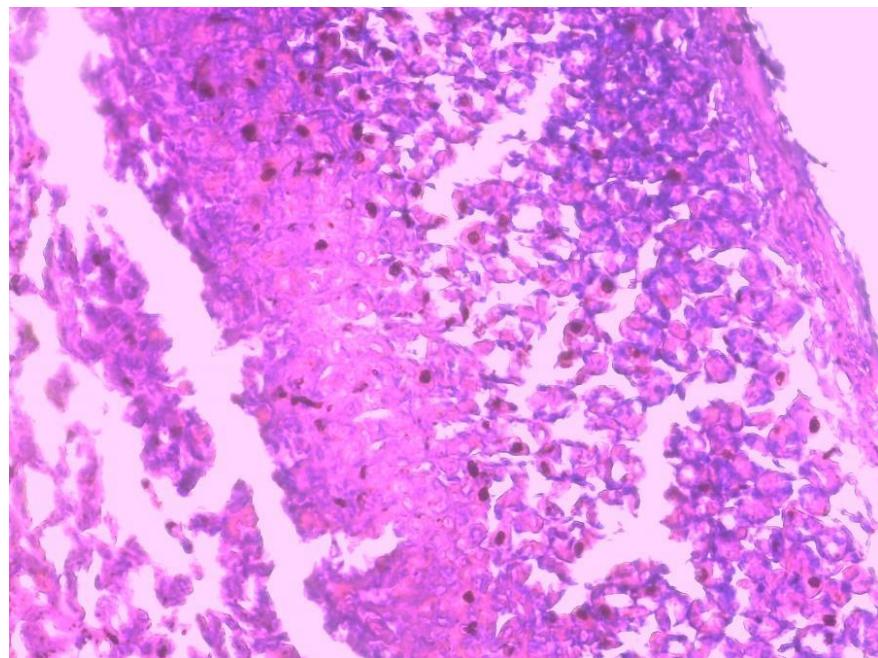


Figure 35. Coupe histologique de l'estomac de rat traité par l'extrait *d'Anastatica hierochuntica* à 1000 mg/kg + HCl/éthanol, colorée à l'hématoxyline-éosine, grossissement $\times 20$. La muqueuse apparaît mieux préservée avec une architecture glandulaire partiellement

4.4.3 Evaluation de l'activité Analgésique

Après avoir compté les crampes, les résultats sont présentés dans le tableau 8.

Table 9. Résultats de comptage des crampes

Lots	Lot témoin	Lot D1	Lot D2	Lot médicament
Nombre des crampes	37.3±4	19.6±3	12±2	8.3±1

Le lot témoin ayant reçu de l'eau physiologique à T0 présente une moyenne de contractions de 37.3 observées pendant 15 minutes après administration de l'acide acétique à 1% par voie intra- péritonéale.

Le lot D1 ayant reçu de l'extrait présente une moyenne de contractions de 19.6 observées pendant 15 minutes après l'administration de l'acide acétique à 1% par voie intra péritonéale.

Résultats et discussions

Le lot D2 ayant reçu de l'extrait présente une moyenne de contractions de 12 observées pendant 15 minutes après avoir administré de l'acide acétique à 1% par voie intra-péritonéale.

Le lot Médicament ayant reçu de Médicament présente une moyenne de contractions de 8.3 observées pendant 15 minutes après avoir administré de l'acide acétique à 1% par voie intra- péritonéale.

Le pourcentage de réduction

Le calcul du pourcentage de réduction (Tableau 9) :

$$\% \text{ de réduction} = [(\text{moyennes des crampes du lot } T - \text{moyenne des crampes du lot } E) / \text{moyenne des crampes du lot } T] \times 100$$

$$\% \text{ de réduction de lot Dose 1} = [(37.3 - 19.6) / 37.3] \times 100 = 47.45\%$$

$$\% \text{ de réduction de lot Dose 2} = [(37.3 - 12) / 37.3] \times 100 = 67.82\%$$

$$\% \text{ de réduction de lot Médicament} = [(37.3 - 8.3) / 37.3] \times 100 = 77.74\%$$

Table 10. Récapitulatif des résultats en moyenne et % de réduction

Lots	Moyenne de cramps	Pourcentage (%) de réduction
Lot témoin	37.3	0%
Lot D1	19.6	47.45%
Lot D2	12	67.82%
Lot Médicament	8.3	77.74%

Résultats et discussions

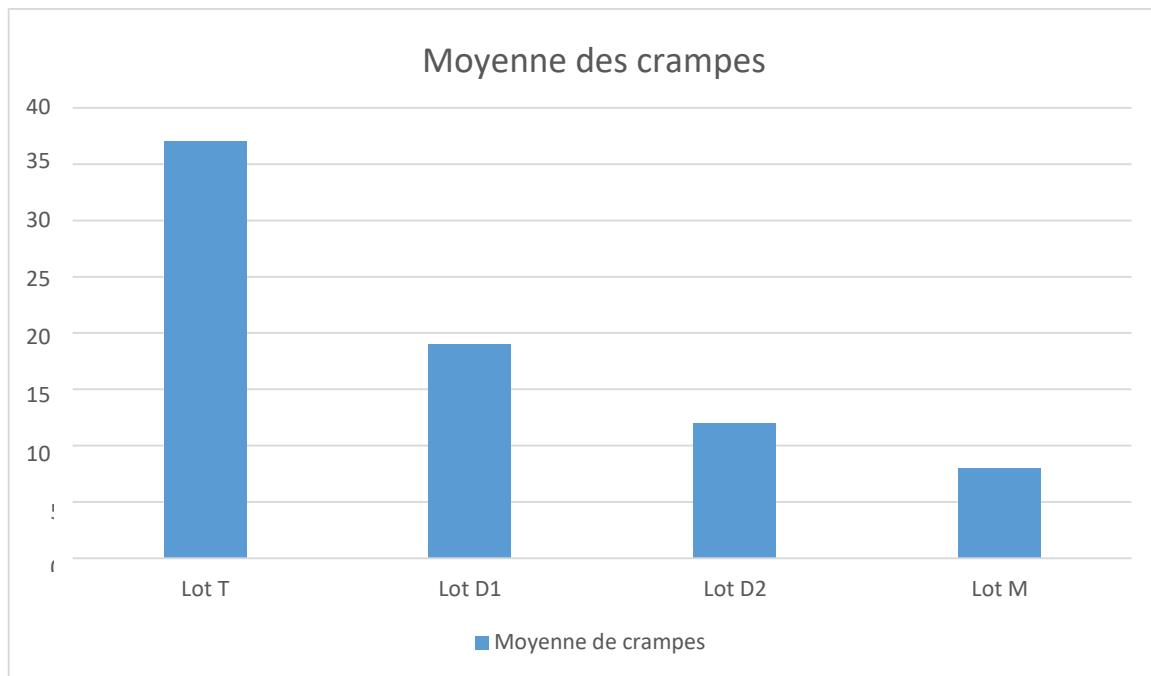


Figure 36. Histogramme représentant la moyenne des crampes de chaque lot

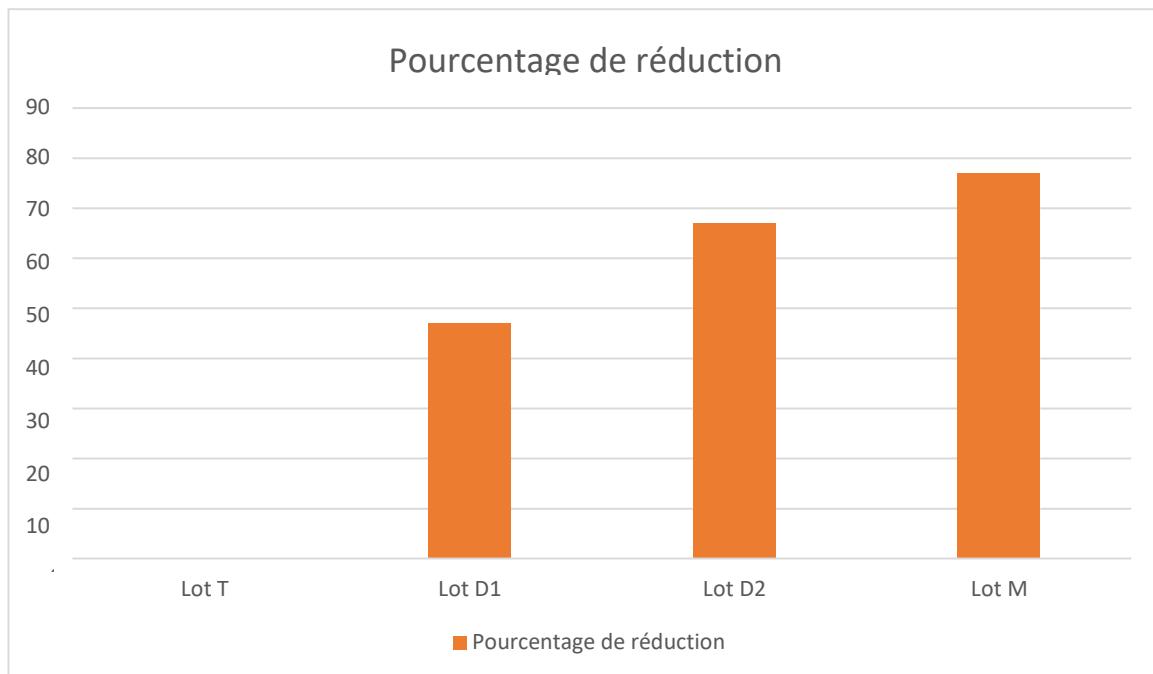


Figure 37. Histogramme qui représente le pourcentage de réduction des différents lots

Résultats et discussions

Dans cette étude, l'extrait d'*Anastatica hierochuntica* a démontré une activité analgésique significative chez la souris, évaluée par le test de contorsions induites par l'acide acétique.

L'acide acétique est un outil très sensible et très utile pour élucider la propriété analgésique des médicaments de base et des médicaments en cours de développement. (Sulaiman *et al.*, 2008)

La réduction du nombre de contorsions observée était dose-dépendante (Tableau 11 ; Figures 28,29), atteignant une inhibition de 47,45 % avec la dose D1 et 67,82 % avec la dose D2, comparativement au lot témoin. Ces résultats suggèrent que l'extrait possède des propriétés analgésiques notables.

Ces observations sont cohérentes avec les travaux d'Alatshan *et al.* (2018), qui ont évalué les activités antinociceptives et anti-inflammatoires de l'extrait aqueux et de la fraction chloroforme d'*A. hierochuntica* chez des souris albinos suisses et des rats Wistar. Ils ont utilisé plusieurs modèles expérimentaux, notamment les tests de la plaque chauffante, de l'immersion de la queue, des contorsions et du léchage de la patte induit par le formol, ainsi que le test d'œdème de la patte induit par la carraghénine. Leurs résultats ont montré que les extraits possédaient des effets antinociceptifs, analgésiques, et anti-inflammatoires significatifs, suggérant une action centrale et périphérique. (Alatshan *et al.*, 2018)

Les composés bioactifs présents dans *A. hierochuntica*, tels que les flavonoïdes, les tanins et les saponines, sont connus pour leurs propriétés pharmacologiques. Par exemple, les flavonoïdes peuvent inhiber la synthèse des prostaglandines, des médiateurs clés de la douleur et de l'inflammation. Cette inhibition pourrait expliquer l'effet analgésique observé dans cette étude.

L'extrait d'*Anastatica hierochuntica* présente une activité analgésique prometteuse dans le modèle de douleur induite chez la souris. Ces résultats soutiennent son utilisation traditionnelle pour le soulagement de la douleur et justifient des investigations supplémentaires pour explorer son potentiel thérapeutique.

4.4.4 Évaluation de l'activité sur la cyclicité œstrale chez la rate

Au cours de cette activité des tentatives de frottis vaginaux limitées ont été réalisées sur les ratten Wistar, afin d'observer les cellules vaginales et d'identifier les différentes phases du cycle œstral. Toutefois, en raison d'une expérience limitée dans la reconnaissance des types cellulaires, l'identification précise des phases n'a pas pu être confirmée.

Les observations au microscope ont révélé la présence de cellules épithéliales de formes variées, mais l'absence de critères différenciés nets n'a pas permis une attribution certaine aux phases œstrales spécifiques (proestrus, œstrus, metœstrus ou diœstrus). Les frottis étaient généralement peu contrastés malgré la coloration au bleu de méthylène, ce qui a pu limiter la qualité de l'analyse.

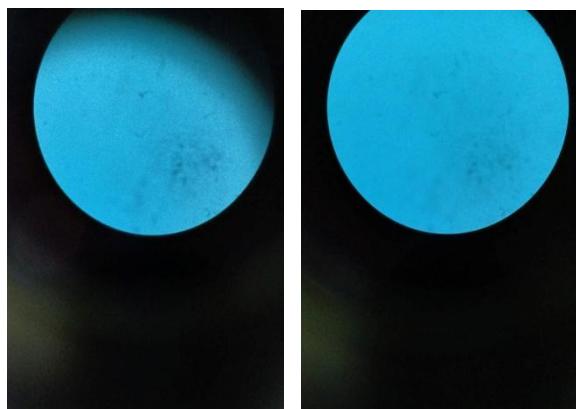


Figure 38. Observation microscopique d'un frottis vaginal chez une rate

Il a été démontré dans plusieurs études que les extraits de plantes médicinales ont un effet notable sur la cyclicité œstrale chez les rongeurs. Des extraits de plantes contenant des flavonoïdes ou des phytoestrogènes, ont montré une perturbation du cycle œstral, soit par un allongement de la phase de diœstrus, soit par une prolongation de la phase d'œstrus, ce qui témoigne d'une activité sur la cyclicité œstrale.(Circosta *et al.*, 2001)

Concernant *Anastatica hierochuntica*, bien que peu d'études aient porté spécifiquement sur la cyclicité œstrale, certaines données suggèrent un effet hormonal réel. En effet, l'extrait aqueux de cette plante a montré une augmentation significative des taux plasmatiques de LH, FSH et de prolactine chez la souris femelle, ce qui pourrait influencer le cycle œstral par modulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien.(Baker *et al.*, 2013)

Conclusion

5 Conclusion

Ce travail de recherche avait pour objectif d'évaluer les propriétés biologiques de l'extrait hydro-méthanolique d'*Anastatica hierochuntica*, une plante médicinale réputée pour ses usages traditionnels variés. Les différentes expérimentations menées ont permis de mettre en évidence plusieurs activités pharmacologiques prometteuses.

L'analyse chimique a révélé une teneur importante en composés phénoliques et flavonoïdes, corroborant les résultats obtenus lors du test antioxydant, où l'extrait a montré une capacité notable à neutraliser les radicaux libres. L'étude de l'activité antimicrobienne a confirmé l'efficacité de l'extrait contre plusieurs souches bactériennes, Gram-positives et Gram-négatives, appuyant son potentiel comme agent antibactérien naturel.

L'activité analgésique a été évaluée à l'aide du test de torsion induit par l'acide acétique chez la souris. Les résultats ont montré une réduction significative du nombre de contorsions abdominales, indiquant un effet antinociceptif de l'extrait, probablement lié à ses composés anti-inflammatoires et antioxydants.

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité gastro-protectrice a mis en évidence une protection significative contre les lésions gastriques induites par un mélange acide/alcool, comparable à celle du médicament de référence. L'étude de la cyclicité œstrale a été explorée de manière préliminaire : bien que les résultats aient été limités par une faible qualité des frottis et un manque d'expertise dans la lecture cellulaire, elle constitue une base pour des investigations futures.

En conclusion, *Anastatica hierochuntica* se révèle être une plante aux multiples effets biologiques : antioxydant, antimicrobien, analgésique et gastroprotecteur, justifiant ainsi son usage en médecine traditionnelle. Toutefois, des études approfondies restent nécessaires pour isoler les principes actifs responsables de ces effets et évaluer leur innocuité et efficacité dans un cadre clinique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aati, H., El-Gamal, A., Shaheen, H., Kayser, O., 2019. Traditional use of ethnomedicinal native plants in the Kingdom of Saudi Arabia. *J Ethnobiology Ethnomedicine* 15. <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0263-2>
- Abdulfattah, S.Y., 2013. Study of immunological effect of *Anastatica hierochuntica* (Kaff Maryam) plant Methanolic extract on albino male mice. *JoBRC* 7, 3–10. <https://doi.org/10.24126/jobrc.2013.7.2.256>
- Abou-Elella1, F., A. Hanafy,E., Yahaya Gavamukulya,Y., 2016. Determination of antioxidant and anti-inflammatory activities, as well as in vitro cytotoxic activities of extracts of *Anastatica hierochuntica* (Kaff Maryam) against HeLa cell lines. Vol. 10(7), pp. 77-87, 17 DOI: 10.5897/JMPR2015.6030
- Adam, O.A.O., Abadi, R.S.M., Ayoub, S.M.H., 2019. The Effect of Extraction method and Solvents on yield and Antioxidant Activity of Certain Sudanese Medicinal Plant Extracts. *J Phytopharmacol* 8, 248–252. <https://doi.org/10.31254/phyto.2019.8507>
- Alatshan, A., Qnais, E., Wedyan, M., Bseiso, Y., Alzyoud, E., Banat, R., Alkhateeb, H., 2018. Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of *Anastatica hierochuntica* and Possible Mechanism of Action. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Al-Ghanayem, A.A., Alhussaini, M.S.R., Babu Joseph, Saadabi, A.M., 2018. Antifungal Activity of *Anastatica hierochuntica L.* extracts against different groups of fungal pathogens: An in- vitro test. University of Bucharest, RO.
- Al-Khayri, J.M., Rashmi, R., Toppo, V., Chole, P.B., Banadka, A., Sudheer, W.N., Nagella, P., Shehata, W.F., Al-Mssallem, M.Q., Alessa, F.M., Almaghasla, M.I., Rezk, A.A.-S., 2023. Plant Secondary Metabolites: The Weapons for Biotic Stress Management. *Metabolites* 13, 716. <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>
- Almundarij, T.I., Alharbi, Y.M., Abdel-Rahman, H.A., Barakat, H., 2021. Antioxidant Activity, Phenolic Profile, and Nephroprotective Potential of *Anastatica hierochuntica* Ethanolic and Aqueous Extracts against CCl₄-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Nutrients* 13, 2973. <https://doi.org/10.3390/nu13092973>
- Al Yasmina 1 : 5/1-9 - L'Art de l'illustration botanique : la Rose de Jéricho [WWW Document], 2020. URL <https://www.alyasmina.org/alyasmina-2020/anastatica-hierochuntica.html> (accessed 6.18.25).

Références bibliographiques

- Alyahya, A.A.I., Asad, M., Alrouji, M., Abdelsalam, K.E.A., Al-Mutairi, A.M.R., Ahmed, M.A.I., 2023. Hypolipidemic and Antihyperlipidemic Effects of *Holarrhena pubescens* Methanolic Extract Is Mediated through Inhibition of Lipase Activity and Lipid Accumulation.
- Alatshan, A., Qnais, E., Wedyan, M., Bseiso, Y., Alzyoud, E., Banat, R., Alkhateeb, H., 2018. Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of *Anastatica hierochuntica* and Possible Mechanism of Action. Indian J. Pharm. Sci. 80.<https://doi.org/10.4172/pharmaceuticalsciences.1000403>
- Anastatica hierochuntica* [WWW Document], n.d.. teline.fr - Biodiversité végétale du sud-ouest marocain. URL <https://www.teline.fr/fr/photos/brassicaceae/anastatica-hierochuntica> (accessed 6.19.25).
- Anastatica hierochuntica L. | Plants of the World Online | Kew Science [WWW Document], 2019. Plants of the World Online. URL <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:277878-1> (accessed 5.23.25).
- Antony, A.; Farid, M., 2022. Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. 12, 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- Astutik, H., Santoso, B., Agil, M., 2020. The Effect of *Anastatica hierochuntica* L. Extract on the Histology of Myometrial Cells and Prostaglandin levels (PGE2, PGF2 α) in Pregnant Mice, in: Proceedings of the 4th International Symposium on Health Research (ISHR 2019). Presented at the 4th International Symposium on Health Research (ISHR 2019), Atlantis Press, Bali, Indonesia. <https://doi.org/10.2991/ahsr.k.200215.016>
- Baker, R.K., Mohammd, T.U., Ali, B.H., Jameel, N.M., 2013. The Effect Of Aqueous Extract Of *Anastatica Hierochuntica* On Some Hormones In Mouse Females 26.
- Bene, K., Camara, D., Kanga, Y., Zirihi, G.N., 2023. Activité antidermatophytique in vitro d'un extrait hydroéthanolique d'*Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. & Perr. (Combretaceae). Phytothérapie 21, 209–213. <https://doi.org/10.3166/phyto-2022-0379>
- BENBOUHAFS, Y., 2024. Etude QSAR de l'activité antioxydante des dérivés du benzofurane. En ligne. Université de Tlemcen. Tlemcen. Algérie
- Benfettoume, A., Khalla, N., 2014. Impact toxicologique des métaux lourds sur le système antioxydant enzymatique chez les Mollusques (bivalves). En ligne. UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA. Guelma. Algérie.

Références bibliographiques

- Carmona-Hernandez, J.C., Le, M., Idárraga-Mejía, A.M., González-Correa, C.H., 2021. Flavonoid/Polyphenol Ratio in Mauritia flexuosa and Theobroma grandiflorum as an Indicator of Effective Antioxidant Action. *Molecules* 26, 6431. <https://doi.org/10.3390/molecules26216431>
- Circosta, C., Sanogo, R., Occhiuto, F., 2001. Effects of Calotropis procera on oestrous cycle and on oestrogenic functionality in rats. *Il Farmaco* 56, 373–378. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01089-8](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01089-8)
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C., 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10.
- Chen, Y., Bai, Y., Hu, X., Yang, X., & Xu, S. (2020). Effects of chronic exposure of waterborne copper on the antioxidant system and tissue accumulation in golden trout (*Oncorhynchus mykiss aguabonita*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46, 1537-1547.
- Elie, F., 2022. Les phénols et les polyphénols. <http://fred.elie.free.fr>,
- Esther, B.-K., Mathieu, N., Saïdath, O.B., Oumarou, M.N., Boubacar, Y., Boukaré, K., Donzéo, S.G., Kadiatou, T.T., Moumouni, K., Sylvain, I., Moussa, O., Elie, K., Noufou, O., 2023. Phytochemical Analysis and Contractile Effects of Aqueous and Hydroethanolic Extracts of *Anastatica hierochuntica* L. (Brassicaceae) on the Isolated Uterus of Mice. *PP* 14, 252–270. <https://doi.org/10.4236/pp.2023.148019>
- Etame-Loe, G., Ebongue, C.O., Ngaba, G.P., Ekossono, N., Pouka, K., Ngene, J.P., Ngoule, C.C., Yinyang, J., Séverin, T., Dibong, S.D., 2018. Évaluation des activités hypoglycémiantes et antihyperglycémiantes des extraits combinés au vin de palme des écorces du tronc de *Musanga cecropioides* et des fruits de *Combretum micranthum* chez les rats de la souche albinos wistar.
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., Walker, R.B., 2010. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Favier, A., 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. 108–115. Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3, 162–169. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>

Références bibliographiques

- Faten, A.E., Eman, A.H., Yahaya, G., 2016. Determination of antioxidant and anti-inflammatory activities, as well as in vitro cytotoxic activities of extracts of *Anastatica hierochuntica* (Kaff Maryam) against HeLa cell lines. J. Med. Plants Res. 10, 77–87. <https://doi.org/10.5897/JMPR2015.6030>
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytotherapie 3, 162–169. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>
- Gutiérrez-Sarmiento, W., Robledo-Abarca, K.A., 2022. 1 PUBLICATION 0 CITATIONS SEE PROFILE.
- Haleng J., Pncema J., DefraGne J.O. & Charler C. 2007. Le stress oxydant. Rev Med Liege. 62: 628-638.
- Hegazy, A.K., Kabi, H.F., 2010. Size-class structure and growth traits of *Anastatica hierochuntica L.* populations as rainfall indicators in aridlands. Journal of Advanced Research 1, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.08.003>
- Kenawy, E., 2001. Biologically active polymers. IV. Synthesis and antimicrobial activity of polymers containing 8-hydroxyquinoline moiety. J of Applied Polymer Sci 82, 1364–1374.
- KHAMADJ, S., DAHMANI, W., 2019. Evaluation de l'activité antioxydante de *Thapsia garganica L.* En ligne. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.Bourdje Bou Arreridj. Algérie.://doi.org/10.1002/app.1973
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. Nature 454, 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Miraldi, E., Baini, G., 2019. Medicinal plants and health in human history: from empirical use to modern phytotherapy. J Siena Acad Sci 10. <https://doi.org/10.4081/jsas.2018.8529>
- Mohamed,A., Khalil,A., El-Beltagi,H.,2010.Antioxidant and antimicrobial properties of kaff maryam (*Anastatica hierochuntica*) and doum palm (*Hyphaene thebaica*).61(1), 67-75. DOI: 10.3989/gya.064509
- Mp Bhandari, A.H.S., 2014a. Kaff-E-Maryam (*Anastatica hierochuntica L.*): Evaluation of Gastro-Protective Activity and Toxicity in Different Experimental Models. Biol Med (Aligarh) 06. <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000197>
- Ngadjui, E., Watcho, P., Nguelefack, T.B., Kamanyi, A., 2013. Effects of *Ficus asperifolia* on normal rat estrus cyclicity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3, 53–57. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60023-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60023-4)

Références bibliographiques

- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- Rameshbabu, S., Alehaideb, Z., Alghamdi, S.S., Suliman, R.S., Almourfi, F., Yacoob, S.A.M., Venkataraman, A., Messaoudi, S., Matou-Nasri, S., 2024. Identification of *Anastatica hierochuntica* L. Methanolic-Leaf-Extract-Derived Metabolites Exhibiting Xanthine Oxidase Inhibitory Activities: In Vitro and In Silico Approaches. *Metabolites* 14, 368. <https://doi.org/10.3390/metabo14070368>
- Rameshbabu, S., Messaoudi, S.A., Alehaideb, Z.I., Ali, M.S., Venktraman, A., Alajmi, H., Al-Eidi, H., Matou-Nasri, S., 2020. *Anastatica hierochuntica* (L.) methanolic and aqueous extracts exert antiproliferative effects through the induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal* 28, 985–993. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.06.020>
- Robinson, C., SaenkhamHuntsinger, P., Hanson, B., Adams, L.G., Subashchandrabosea, S., 2022. Vaginal Inoculation of Uropathogenic *Escherichia coli* during Estrus Leads to Genital and Renal Colonization. 90 1-14 DOI:10.1128/iai.00532-21
- Rostan, N.A.-S., Manshoor*, N., 2024. Traditional Uses and Pharmacological Properties of *Anastatica hierochuntica*. *Res J Pharmacogn* 11. <https://doi.org/10.22127/rjp.2024.445358.2371>
- Saranya, R., Ali, M.S., Anuradha, V., Safia, M., 2019. Pharmacognosy and radical scavenging potential of different plant parts of *Anastatica hierochuntica*.
- Shaban, F., Al-Azzawie, H.F., Mohammed, A.S., 2011. EFFECT OF ALCOHOLIC *ANASTATICA HIEROCHUNTICA* EXTRACT ON SOME BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL PARAMETERS IN ALLOXAN INDUCED DIABETIC RATS.
- Sobeai, S.M.A., Al-Ghanayem, A.A., Alhussaini, M.S., Joseph, B., 2015. Antibacterial Activity of *Anastatica hierochuntica* of Bacterial Pathogens: An in. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*.
- Sulaiman, M.R., Zakaria ,Z.A., Bujarimin ,A.S., Somchit ,M.N., Israf ,D.A., and Moin, S., 2008. Evaluation of *Moringa oleifera* Aqueous Extract for Antinociceptive and AntiInflammatory Activities in Animal Models. *Pharm. Biol.* 46, 838–845. <https://doi.org/10.1080/138802008023667>

Références bibliographiques

- Soong, Y.-Y., Barlow, P.J., 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry* 88, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>
- Stahl, W., Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med., Fat Soluble Vitamins: Old Molecules with Novel Properties* 24, 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Tawfeeq, A.A., 2014. Effect of Kaff Maryam aqueous extract in mice Kidneys.
- Thotathil, V., Sidiq, N., Fakhroo, A., Sreerama, L., 2023. Phytochemical Analysis of *Anastatica hierochuntica* and *Aerva javanica* Grown in Qatar: Their Biological Activities and Identification of Some Active Ingredients. *Molecules* 28, 3364. <https://doi.org/10.3390/molecules28083364>
- Yoshikawa, M., Xu, F., Morikawa, T., Ninomiya, K., Matsuda, H., 2003. Anastatins A and B, new skeletal flavonoids with hepatoprotective activities from the desert plant *Anastatica hierochuntica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 1045–1049. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(03\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(03)00088-X)
- Wikipédia. Protecteur gastrique. [Internet]. [Cité le 15 avril 2022]. Disponible sur : https://fr.wikipedia.org/wiki/Protecteur_gastrique
- Zbadi, R., Mohti, H., Moussaoui, F., 2018. Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. 24 (2) 134-141. doi:10.1684/met.2018.0682
- Zin, S.R.M., Kassim, N.M., Alshawsh, M.A., Hashim, N.E., Mohamed, Z., 2017. Biological activities of *Anastatica hierochuntica* L.: A systematic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 91, 611–620. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.011>

Webographie

Anonyme 1: <https://www.teline.fr/>. Consulté le 10/04/2025.

Anonyme 2 : <https://www.tinyurl.com/protecteur-gastrique>. Consulté le (25/05/2025).

Anonyme 3 : <https://www.tinyurl.com/la-rose-de-jericho> . Consulté le (19/06/2025).

Résumé

Anastatica hierochuntica (*Kaff Mariam*), une plante médicinale utilisée traditionnellement pour ses effets thérapeutiques multiples. L'étude comprend une approche expérimentale combinant des tests *in vitro* (activité antioxydante et antibactérienne) et *in vivo* (effets anti-ulcériens, analgésiques et hormonaux chez la rate). L'analyse phytochimique a révélé une richesse en composés phénoliques et flavonoïdiques, responsables des activités antioxydantes observées, confirmées par la méthode DPPH. L'extrait a également montré une activité antibactérienne significative contre différentes souches pathogènes. Les expérimentations *in vivo* ont mis en évidence un effet gastroprotecteur, une activité analgésique marquée, ainsi qu'un impact sur la cyclicité oestrale, suggérant un potentiel effet sur le système hormonal. Par ailleurs, l'étude toxicologique indique une faible toxicité aiguë. Ces résultats confirment l'intérêt pharmacologique de *A. hierochuntica* et justifient son usage traditionnel. Ils ouvrent également la voie à d'éventuelles applications dans les domaines de la phytothérapie et du développement de médicaments naturels.

Mots-clés : *Anastatica hierochuntica*, activité antioxydante, antibactérienne, anti-ulcéreuse, flavonoïdes, polyphénols, stress oxydatif.

الملخص

تُعتبر نبتة (*Anastatica hierochuntica*) كف مريم من النباتات الطبية التقليدية المعروفة بتنوع خصائصها العلاجية. شملت هذه الدراسة تجارب مخبرية (اختبارات مضادة للأكسدة ومضادة للبكتيريا) وتجارب حية على الجرذان (دراسة التأثيرات المضادة للقرحة، المسكنا، والهرمونية). أظهرت التحاليل الكيميائية للنبتة غناها بالمركبات الفينولية والفلافونويدية، التي تكسر فعاليتها كمضاد للأكسدة حسب اختبار DPPH كما بين المستخلص فعالية واضحة ضد عدة أنواع من البكتيريا الممرضة. أما في التجارب الحية، فقد لوحظ تأثير وقائي ضد القرحة، مفعول مسكن قوي، وتغييرات في الدورة الجنسية للجرذان، ما يدل على تأثير ممكّن على النظام الهرموني. كما بيّنت دراسة السمية أن النبتة ذات سمية منخفضة عند الجرعة الحادة. تؤكّد هذه النتائج القيمة العلاجية للنبتة وتدعم استخدامها الشعبي، كما تفتح المجال لاستعمالها في الطب النباتي وتطوير أدوية طبيعية.

الكلمات المفتاحية:

كف مريم، مضاد أكسدة، مضاد بكتيري، مضاد قرحة، فلافونويدات، بوليفينولات، إجهاد تأكسدي.

Abstract

Anastatica hierochuntica (Kaff Maryam), a medicinal plant traditionally used for its multiple therapeutic effects. The study combines an experimental approach involving both in vitro (antioxidant and antibacterial activity) and in vivo (anti-ulcer, analgesic, and hormonal effects in rats) assays. Phytochemical analysis revealed a richness in phenolic and flavonoid compounds, responsible for the observed antioxidant activity confirmed by the DPPH assay. The extract also showed significant antibacterial activity against various pathogenic strains. In vivo experiments demonstrated gastroprotective and analgesic effects, as well as an influence on estrous cycle regulation, suggesting potential hormonal modulation. Toxicological evaluation indicated low acute toxicity. These results confirm the pharmacological interest of *A. hierochuntica*, support its traditional use, and open perspectives for its application in phytotherapy and natural drug development.

Keywords: *Anastatica hierochuntica*, antioxidant activity, antibacterial, anti-ulcer, flavonoids, polyphenols, oxidative stress.

Année universitaire : 2024-2025

Présenté par : GUIDOUM Houria
DENECH Amira Malak

Investigations biologiques et pharmacologiques de l'extrait hydro-méthanolique d'*Anastatica hierochuntica* : approches *in vitro* et *in vivo*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Biothérapie

Résumé

Anastatica hierochuntica (*Kaff Mariam*), une plante médicinale utilisée traditionnellement pour ses effets thérapeutiques multiples. L'étude comprend une approche expérimentale combinant des tests *in vitro* (activité antioxydante et antibactérienne) et *in vivo* (effets anti-ulcéreux, analgésiques et hormonaux chez la rate). L'analyse phytochimique a révélé une richesse en composés phénoliques et flavonoïdiques, responsables des activités antioxydantes observées, confirmées par la méthode DPPH. L'extrait a également montré une activité antibactérienne significative contre différentes souches pathogènes. Les expérimentations *in vivo* ont mis en évidence un effet gastro-protecteur, une activité analgésique marquée, ainsi qu'un impact sur la cyclicité oestrale, suggérant un potentiel effet sur le système hormonal. Par ailleurs, l'étude toxicologique indique une faible toxicité aiguë. Ces résultats confirment l'intérêt pharmacologique de *A. hierochuntica* et justifient son usage traditionnel. Ils ouvrent également la voie à d'éventuelles applications dans les domaines de la phytothérapie et du développement de médicaments naturels.

Mots-clés : *Anastatica hierochuntica*, activité antioxydante, antibactérienne, anti-ulcéreuse, flavonoïdes, polyphénols, stress oxydatif.

Président du jury : Pr. MOSBAH Asma (Professeur – Univ. Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Dr. HALMI Sihem (MCA- Univ. Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinateur(s) : Dr. GHORRI Sana (MCA- Univ. Constantine 1 Frères Mentouri).