

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI DE CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALE

N° d'ordre :

N° de série :

Thèse

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

Option

Biotechnologies Végétales

Etude botanique et phytochimique :
Approche biologique et pharmacologique
d'*Opuntia ficus indica*

Soutenue publiquement

Par

Melle HALMI SIHEM

Devant le jury :

Président :	KHELIFI D.	Professeur	Université des Frères Mentouri de Constantine
Directeur de thèse :	HAMDI PACHA Y.	Professeur	E.N.S.V, El Harrach, Alger
Examineurs :	BENALLAOUA S.	Professeur	Université A/Mira de Bejaïa
	DJEBAR M. R.	Professeur	Université B/Mokhtar d'Annaba
	AKKAL S.	Professeur	Université des Frères Mentouri de Constantine
	TOUATI A.	Professeur	Université A/Mira de Bejaïa

Année universitaire 2014 /2015

Remerciements

J'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à **Mr. HAMDY PACHA YUCEF**, Professeur et directeur de L'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire (E.N.S.V), El Harrach-Alger, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. La qualité de ses conseils, le soutien et la confiance qu'il m'a accordée, m'ont permis de réaliser le présent travail dans les meilleures conditions.

Mes sincères remerciements à **Mr. KHELIFI D.**, Professeur à l'Université de Constantine 1, d'avoir bien voulu juger ce travail et accepter de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma grande reconnaissance à Monsieur le professeur **BENALLAOUA S.** et Monsieur le Professeur **TOUATI A.**, de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaïa, d'avoir aimablement accepté de se déplacer et ont bien voulu juger ce travail.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à **Mr. DJEBAR M. R.**, Professeur à Université Badji Mokhtar d'Annaba pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie du jury de notre thèse.

Mes remerciements sincères vont aussi à **Mr. AKKAL S.**, Professeur à l'Université de Constantine 1, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail.

Je n'oublie pas de remercier les membres d'équipes du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie.

Merci à toute ma famille particulièrement mes parents, qui m'ont soutenu et encouragé durant mes études. Ils ont partagé avec moi des moments de joie, et aussi les moments difficiles. Je leur suis profondément reconnaissante.

Je remercie également toutes mes amies pour leur soutien et encouragement.

Je voudrais en fin exprimer ma sincère reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont aidé tout au long de ce travail pour leur sympathie, aide et encouragement. A tout le monde merci du fond du cœur.

Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux et des figures	IX
Lexiques des abréviations	XVI
Publications et communications scientifiques	XIX
Introduction	1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Données générales sur le Figuier de barbarie	3
1. Biologie d' <i>Opuntia ficus indica</i>	3
1.1 Position systématique.....	4
2. Origine et distribution géographique d' <i>Opuntia ficus indica</i>	6
3. Plantation	6
4. Exigences écologiques	7
5. Ethnopharmacologie du figuier de barbarie	9
6. Importance économique et écologique	10
6.1 Importance écologique.....	10
6.2 Importance économique	10
7. Les phytomédicaments les plus demandés sur le marché	12
Chapitre 2 : Oxydation et antioxydants	14
1. Définition d'un radical libre	14
2. La production de radicaux libres	14
2.1 La production intracellulaire	14
2.2 La production extracellulaire	16
3. Différents type des ERO	16
4. Stress oxydant	17
5. Les antioxydants	17
6. Le pouvoir antioxydant	18
6.1 Protections cellulaires	18
6.1.1 Systèmes antioxydants enzymatiques	18

6.1.2	Systèmes antioxydants non-enzymatiques	19
7.	Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire	25
Chapitre 3 : Les métabolites secondaires	28
1.	Les composés phénoliques	28
2.	Terpénoïdes et stéroïdes	33
3.	Alcaloïdes	34
4.	Applications industrielles des polyphénols	35

Matériel et Méthodes

I. Matériel	36
1.	La récolte de la plante	36
2.	Préparation des échantillons.....	36
II. Méthodes	38

Chapitre 1 : Etude cytogénétique	38
1.	Dénombrement chromosomique	38
2.	Analyse du caryotype	39
2.1	Caryogramme	40
2.1	Idiogramme	40
3.	Coloration aux nitrates d'argent AgNO ₃	42

Chapitre 2 : Screening phytochimique	43
1.	Calcul des rendements	43
1.1	Détermination de la teneur en eau	43
1.2	Détermination de la teneur en cendres totales	43
1.3	Teneur en substances extractibles par l'eau	44
1.4	Teneur en substances extractibles par l'éthanol	44
1.5	Détermination de la teneur en matière grasse	45
2.	Extractions	46
2.1	Extraction par macération à l'eau	46
2.2	Extraction avec les solvants organiques	46
2.3	Fractionnement de l'extrait méthanolique	47

3. Réactions de caractérisation	49
4. Dosage spectrophotométrique	51
4.1 Dosage des sucres totaux	51
4.2 Estimation quantitative des polyphénols totaux	51
4.3 Estimation quantitative des flavonoïdes	52
4.4 Dosage des tannins condensés: Proanthocyanidines	52
4.5 Analyse chromatographique par HPLC	53
Chapitre 3 : Activités antioxydantes	56
1. Réduction du fer: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	56
2. Evaluation de l'activité antioxydant par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH).....	57
3. Evaluation de l'activité antioxydant par le phosphomolybdate	58
4. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène	58
5. Test de piégeage des radicaux d'hydroxyl	59
6. Activité antibactérienne	59
6.1 Méthode de diffusion (Antibiogramme)	59
6.2 Détermination des CMI	62
Chapitre 4 : Etude Pharmacologique et toxicologique	63
1. Etude toxicologique.....	64
1.1 Etude de la toxicité aigüe d' <i>Opuntia ficus indica</i>	64
1.1.1 L'Administration par voie orale (per Os).....	64
1.1.2 L'Administration par voie intra péritonéal (IP)	65
1.2 Evaluation de la toxicité chronique de l'extrait d' <i>O. f. indica</i> chez le lapin Néozélandais.	66
1.3 Test de toxicité sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	68
2. L'Activité hypo et antihyper-glycémiant de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i>	72
2.1 Essais chez des lapins normoglycémiques	72
2.2 Essais chez des lapins en hyperglycémie temporaire	72
3. Etude de l'effet hémolytique des extraits d' <i>Opuntia ficus indica in vitro</i>	73
4. Détermination de l'activité antalgique	74
4.1 Test de torsion	74

4.2	Test de la Plaque chauffante	75
4.3	Test de Tail-flick	75
5.	Effet des extraits d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur la cicatrisation chez le lapin	76
5.1	Essais sur les plaies de brûlures thermiques.....	76
5.2	Essais sur les plaies d'excision.....	77
6.	Evaluation de l'effet hépato-protecteur de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i>	78
Chapitre 5 : Potentiel allélopathique du figuier de barbarie «<i>Opuntia ficus indica</i>» Sur la germination et la croissance des végétaux		
80		
1.	La récolte des végétaux.....	80
2.	Préparation des extraits	80
3.	Test d'inhibition de la germination et la croissance d' <i>Allium cepa</i> et <i>phaseolus vulgaris</i>	81
Analyse statistique		82
Résultats et Discussion		
Chapitre 1 : Etude cytogénétique.....		83
1.	Etude du caryotype	83
2.	Coloration aux nitrates d'argent	91
Chapitre 2 : screening phytochimique		93
1.	Détermination de la teneur en eau, en cendres totales et en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol	93
2.	Extractions	94
3.	Réactions de caractérisations.....	96
4.	Dosage spectrophotométrique	97
4.1	Dosage de sucre	97
4.2	Estimation quantitative des polyphénols totaux	98
4.3	Estimation quantitative des flavonoïdes	101
4.4	Dosage des tannins condensés proanthocyanidines	103
4.5	Analyse chromatographique par HPLC	105

Chapitre 3 : Activités biologiques in vitro	116
1. Réduction du fer: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	116
2. Evaluation de l'activité antioxydant par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH)	118
3. Evaluation de l'activité antioxydant par le phosphomolybdate	120
4. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène	121
5. Test de piégeage des radicaux d'hydroxyl	123
6. Activité antibactérienne	125
6.1 Méthode de diffusion (Antibiogramme)	125
6.2 Détermination des CMI	133
Chapitre 4 : Etude Pharmacologique et Toxicologique	135
1. Etude toxicologique.....	135
1.1 Etude de la toxicité aigüe d' <i>Opuntia ficus indica</i>	135
1.1.1 L'Administration par voie orale (per Os).....	135
1.1.2 L'Administration par voie intra péritonéal (IP)	136
1.2 Evaluation de la toxicité chronique de l'extrait d' <i>O. f. indica</i> chez le lapin Néozélandais.	139
1.2.1 Etat général des animaux	139
1.2.2 Evolution du poids	139
1.2.3 Modification du poids des organes	139
1.2.4 Analyse biochimique.....	141
1.3 Test de toxicité sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	146
2. L'Activité Hypo et Antihyper-glycémiant de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i>	149
2.1 Essais chez des lapins normoglycémiques	149
2.2 Essais chez des lapins en hyperglycémie temporaire	150
3. Etude de l'effet hémolytique des extraits d' <i>Opuntia ficus indica</i> in vitro	153
4. Détermination de l'activité antalgique	156
4.1 Test de torsion	156
4.2 Test de la plaque chauffante	157
4.3 Test de Tail-flick	158

5. Effet des extraits d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur la cicatrisation chez le lapin	161
5.1 Essais sur les plaies de brûlures thermiques	161
5.2 Essais sur les plaies d'excision	168
6. Evaluation de l'effet hépato-protecteur de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i>	171
6.1 Modifications cliniques et poids corporel	171
6.2 Analyse biochimique	174
Chapitre 5 : Potentiel allélopathique du figuier de barbarie «<i>Opuntia ficus-indica</i> » Sur la germination et la croissance des végétaux.....	176
1. Effets de l'extrait aqueux du figuier de barbarie sur la germination d' <i>Allium cepa</i> et <i>Phaseolus vulgaris</i>	176
2. Effets des extraits du figuier de barbarie sur la croissance des plantules d' <i>Allium cepa</i> et <i>Phaseolus vulgaris</i>	179
Conclusion générale	183
Références Bibliographiques	186
Résumés	
Annexe	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les utilisations du figuier de Barbarie.....	12
Tableau 2 : Les phytomédicaments les plus demandés sur le marché	13
Tableau 3 : Quelques tests <i>in vitro</i> chimiques.....	26
Tableau 4 : Tests <i>in vitro</i> biologiques.....	27
Tableau 5 : Principales classes des composés phénoliques.....	29
Tableau 6 : Nomenclature chromosomique proposée par Levan et <i>al.</i> (1964).....	41
Tableau 7 : Tableau du gradient d'éluion des extraits en HPLC	54
Tableau 8 : Souches bactériennes.....	60
Tableau 9 : Estimation de la toxicité.....	71
Tableau 10 : Données morphométriques d' <i>Opuntia ficus indica</i>	85
Tableau 11 : Détermination du nombre de nucléoles par cellule chez l'espèce <i>Opuntia ficus indica</i>	91
Tableau 12 : Teneur en eau, en cendres totales et en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol.....	93
Tableau 13 : Masse, rendement et couleur des extraits obtenus.....	95
Tableau 14 : Résultat des tests phytochimique de différents extraits de raquettes d' <i>Opuntia ficus indica</i>	96
Tableau 15 : Temps de rétention et nombre de pics de différents extraits.....	106
Tableau 16 : Chromatogrammes de différents extraits d' <i>O.f.indica</i> à 280 nm.....	109
Tableau 17 : Chromatogrammes de différents extraits d' <i>O.f.indica</i> à 325 nm	110
Tableau 18 : Temps de rétention pour les standards.....	112
Tableau 19 : Chromatogrammes de différents standards d'acide phénoliques	112
Tableau 20 : Chromatogrammes de différents standards de flavonoïdes.....	113
Tableau 21 : Temps de rétention des acides phénoliques décrits par Galati et <i>al.</i> , 2003.....	113
Tableau 22 : Temps de rétention des flavonoïdes décrits par Galati et <i>al.</i> , 2003.....	114
Tableau 23 : L'identification de différents constituants des extraits d' <i>O.f. indica</i>	114

Tableau 24 : Les valeurs d'IC50 chez les différents extraits de raquettes d' <i>Opuntia ficus indica</i>	119
Tableau 25 : Les valeurs d'IC50 de l'effet de piégeage du peroxyde H ₂ O ₂ par les différents extraits ainsi que l'acide ascorbique	122
Tableau 26 : Les valeurs d'IC50 de l'effet de piégeage des radicaux hydroxyles par les différents extraits ainsi que l'acide gallique	124
Tableau 27 : Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) par la méthode de disques	130
Tableau 28 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de raquettes d' <i>O.f.indica</i>	133
Tableau 29 : Variations des poids corporels des rats normaux et traités en essai de la toxicité aiguë par voie orale	135
Tableau 30 : Valeurs absolues et relatives du poids des organes des rats normaux et traités en essai de la toxicité aiguë par voie orale	136
Tableau 31 : Comportement et signes de toxicité enregistrés chez les rats soumis à une injection intrapéritonéale des doses croissantes de l'extrait Aqueux	137
Tableau 32 : Taux de mortalité des rats soumis à une injection intrapéritonéale unique des doses croissantes d'extrait aqueux d' <i>O.f.indica</i>	138
Tableau 33 : Variation du Poids corporel chez les deux groupes pendant 12 semaines de traitements	140
Tableau 34 : Le poids de certains organes dans le groupe témoin et le groupe traité pendant 12 semaines.....	140
Tableau 35 : Paramètres biochimiques chez le lot des lapins traités et le lot témoin après 12 semaines.....	142
Tableau 36 : Mortalité (%) des larves d' <i>Artemia</i> en fonction de la concentration des six extraits d' <i>O.f.indica</i> après 24 heures d'exposition.	146
Tableau 37 : Concentrations létales CL50 et CL95 (24 h) des six extraits d' <i>O.f.indica</i> à l'égard des larves d' <i>Artemia</i>	147
Tableau 38 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur la glycémie de base des lapins normo-glycémiques	149
Tableau 39 : Effet de l'extrait d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale	151
Tableau 40 : Concentrations des extraits provoquant 50% d'hémolyse	153

Tableau 41 : Etude de l'activité antalgique de l'extrait aqueux d' <i>O.f.indica</i> à l'acide acétique	156
Tableau 42 : Etude de l'activité antalgique des Aqueux d' <i>O.f.indica</i> à la plaque chauffante	157
Tableau 43 : Etude de l'activité antalgique de l'extrait aqueux d' <i>O.f.indica</i> par la méthode de tail-flick.....	158
Tableau 44 : Pourcentages de contraction des plaies de brûlures avec le métal chauffé dans l'eau bouillante	162
Tableau 45 : Evaluation du pourcentage de contraction des plaies effectuées par la plaque chauffante durant la période expérimentale	165
Tableau 46 : Evaluation du pourcentage de contraction des plaies d'excision durant la période expérimentale.....	168
Tableau 47 : Variation du poids corporel chez les rats après 15 jours de traitement	172
Tableau 48 : Valeurs absolues et relatives du poids des organes après 15 jours de traitement	173
Tableau 49 : Paramètres biochimiques des rats mâles <i>Wistar</i> traités avec l'extrait aqueux et CCL4	174
Tableau 50 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur le taux de germination d' <i>Allium cepa</i> et <i>Phaseolus vulgaris</i>	178
Tableau 51 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur la croissance des plantules d' <i>Allium cepa</i> et <i>Phaseolus vulgaris</i>	180

Liste des figures

Figure 1 : La plante d' <i>Opuntia ficus indica</i>	5
Figure 2 : Répartition mondiale d' <i>Opuntia ficus indica</i>	8
Figure 3 : Sites de production intracellulaire des ERO	15
Figure 4 : Réaction de détoxification du radical-anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène.....	19
Figure 5 : Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires	20
Figure 6 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et la réaction avec les radicaux	21
Figure 7 : Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols	22
Figure 8 : Mécanismes d'action antioxydante de la vitamine E sur les radicaux LOO•	22
Figure 9 : Structures chimiques de carotène et xanthophylle	23
Figure 10 : Mécanismes traduisant l'activité antioxydante des caroténoïdes, cas des ROO•	23
Figure 11 : Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane	23
Figure 12 : Mécanismes d'action des antioxydants des composés phénoliques	24
Figure 13 : Structure de l'acide caféique.....	30
Figure 14 : Les différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane.....	31
Figure 15 : Structure d'une molécule de quinone.....	32
Figure 16 : Structure d'une molécule de coumarine	33
Figure 17 : a. Raquettes d' <i>O.f.indica</i> à l'état frais, b. Et c. Raquettes d' <i>O.f.indica</i> après séchage et broyage, d. Les Graines	37
Figure 18 : Schéma d'extraction par macération à l'eau	46
Figure 19 : Schéma d'extraction par épuisement successif par les solvants organiques	48
Figure 20 : Réaction de réduction du fer (FRAP).....	56
Figure 21 : Activité antioxydante par diphenyle-picryl-hydrazyl (DPPH).....	58
Figure 22 : Administration orale de l'extrait	65
Figure 23 : Administration de l'extrait par voie intra péritonéal (IP)	66

Figure 24 : Culture des larves d' <i>Artemia salina</i>	69
Figure 25 : Plaque de 24 puits contenant les larves et les différents extraits étudiés ...	70
Figure 26 : Les larves sous loupe microscopique	70
Figure 27 : Caryotype de l'espèce <i>Opuntia ficus indica</i>	87
Figure 28 : Nucléoles colorés aux nitrates d'argent	92
Figure 29 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux.....	97
Figure 30 : Droite d'étalonnage de l'Acide gallique.....	98
Figure 31 : Teneur en polyphénols totaux de différents extraits d' <i>O.f.indica</i>	99
Figure 32 : Droite d'étalonnage de la Rutine.....	101
Figure 33 : Teneur en flavonoïdes de différents extraits d' <i>O. f. indica</i>	102
Figure 34 : Dosage des proanthocyanidines chez les différents extraits d' <i>Opuntia ficus indica</i>	103
Figure 35 : Réduction du fer chez les différents extraits de raquettes d' <i>Opuntia ficus indica</i>	117
Figure 36 : Le % d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations de différents extraits d' <i>Opuntia ficus indica</i>	118
Figure 37 : Test de phosphomolybdate chez les différents extraits d' <i>O.f.indica</i>	120
Figure 38 : Histogramme d'IC50 de différents extraits d' <i>O.f.indica</i>	122
Figure 39 : Le % d'inhibition de peroxyde H2O2 avec les différents extraits d' <i>O. f. indica</i>	122
Figure 40 : Le % d'inhibition de radical hydroxyl (OH) avec les différents extraits d' <i>O. f. indica</i>	124
Figure 41 : Histogramme de différentes valeurs d'IC50 pour le test d'inhibition des radicaux hydroxyles	125
Figure 42 : Activité antimicrobienne des extraits d' <i>Opuntia ficus indica</i>	126
Figure 43 : Détermination de la DL50 de l'extrait aqueux d' <i>O.f.indica</i> par la méthode de Miller et Tainter.....	138
Figure 44 : Poids relatifs des organes de lapins traités par l'extrait aqueux comparés au lot témoin pendant 12 semaines	141
Figure 45 : Paramètres biochimiques des lapins traités par EAq d' <i>O.f.indica</i> comparés au lot témoin après 12 semaines.....	143

Figure 46 : Pourcentages de mortalité des larves suivant les extraits d' <i>O.f.indica</i> testés.....	147
Figure 47: Détermination de la DL50 chez les différents extraits d' <i>O.f.indica</i> estimée par la méthode de Reed et Muench (1938).....	148
Figure 48 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur la glycémie de base	150
Figure 49 : Effet de l'extrait aqueux sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale	151
Figure 50 : Histogramme des concentrations des extraits provoquant 50% d'hémolyse	153
Figure 51: Pourcentages des cellules restantes de sang des lapins après traitement par des extraits d' <i>O.f.indica</i>	155
Figure 52: Effet de l'extrait aqueux d' <i>O.f.indica</i> sur la douleur induite par l'Acide acétique chez le rat	157
Figure 53 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>O.f.indica</i> sur la douleur induite par la plaque chauffante chez le rat	158
Figure 54: Le test Tail-flick chez le rat	159
Figure 55: Schéma de Pourcentages de contraction des plaies de brûlures avec le métal chauffé dans l'eau bouillante	163
Figure 56: Chronologie de la cicatrisation des plaies de brûlures avec le métal chauffé avec l'eau bouillante chez le model lapin	164
Figure 57: Schéma des pourcentages de contraction des plaies effectuées par la plaque chauffante durant la période expérimentale	166
Figure 58: Chronologie de la cicatrisation des plaies effectuées par la plaque chauffante chez le model lapin	167
Figure 59: Schéma des pourcentages de contraction des plaies d'excision traitées et non traitées	168
Figure 60: Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision chez le model lapin	169
Figure 61 : Gains de poids (g) après 15 jours de traitement	172
Figure 62 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur la cinétique de la germination d' <i>Allium cepa</i>	177

Figure 63 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur la cinétique de germination du <i>Phaseolus vulgaris</i>	177
Figure 64 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>O.f.indica</i> sur la longueur des racines des plantules d' <i>Allium cepa</i>	179
Figure 65 : Effet de l'extrait aqueux d' <i>O.f.indica</i> sur la longueur des racines des plantules de <i>phaseolus vulgaris</i>	180

Lexique des Abréviations

Abs	Absorbance
ALB	Albumine
ALAT	Alanine Amino Transférase
AO	Activité Antioxydante
ASAT	Aspartate Amino Transférase
ANOVA	Analysis of variance
APR	Pouvoir antiradicalaire
BHT	Butylated hydroxytoluen
°C	Degré Celsius
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur couches minces
CCL4	Tétrachlorure de carbone
Chl	Chloroforme
Cm	Centimètre
Crea	Créatinine
CRL	Groupe control
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
DL50	Dose Létale 50
EAc	Extrait d'acétate d'éthyle

EAG	Equivalent d'acide gallique
EAq	Extrait aqueux
EC50	Concentration effective à 50%
ECh	Extrait du chloroforme
EQ	Equivalents de quercétine
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
g	gramme
h	heure
Gly	Glycémie
HPLC	High performance liquid chromatography
IC50	Concentration inhibitrice à 50%
J	Jour
Kg	Kilogramme
L	Litre
m	mètre
Met	Méthanol
Mg	Milligramme
M.H	Muller-Hinton
ml	Millilitre
mm	millimètre
mn	Minute
MPO	myéloperoxydase

Ms	Matière sèche
NC	nombre de contorsions
N-S	Nord - Sud
NO	L'oxyde d'azote
nm	nanomètre
NO₂	dioxyde d'azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P.C	Poids Corporel
PI	pourcentage d'inhibition
PBS solution	Phosphate Buffer Saline solution
Tr	Temps de rétentions
Rf	Rapport frontal
S	Seconde
STZ	Streptozotocine
T	Tonne
TGO	Transaminase Glutamique Oxaloacétique
TGP	Transaminase Glutamique Pyruvate
RL	Radicaux libres
UI	Unité Internationale
UV	Ultra-violet
Var	Variance
V/V	Volume/volume

Vs	Versus
%	Pourcentage

Introduction

Introduction

Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a eu un intérêt croissant ces dernières décennies pour l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans les différentes régions du monde. Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de la médecine traditionnelle ont été constatés (Muthu et *al.*, 2006).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (Ferrari, 2002).

Les plantes peuvent être considérées comme des bibliothèques de petites molécules de métabolites secondaires des composés organiques avec une diversité structurale qui, autrement, ne pourrait pas être disponibles dans un laboratoire de synthèse chimique (Bindseil et *al.*, 2001; Koehn et Carter, 2005).

Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie, parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun, 1997).

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Bérubé-Gagnon, 2006).

Le continent africain est un des continents dotés de la plus riche biodiversité dans le monde. L'Algérie possède une richesse floristique considérable, ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentent divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles (Aberkane, 2006).

Certaines espèces de cactus ont fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques depuis plusieurs décennies. C'est le cas notamment du figuier de Barbarie, cactus appartenant au genre *Opuntia*, qui recèle de multiples propriétés médicinales.

Le figuier de Barbarie est un remède naturel qui s'avère efficace pour lutter contre le cholestérol, le diabète du type II, l'adénome prostatique, Brulure, les ulcères gastro-duodénaux et même certains types de cancer dont il ralentirait leur progression. Le figuier de Barbarie est aussi une plante médicinale employée dans le traitement de l'obésité.

Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes, antimicrobiennes et de valoriser leurs effets thérapeutiques comme les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols.

Il nous semble donc intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche.

Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques sur la plante, les métabolites secondaires ainsi que sur le stress oxydant.

Nous développerons dans la deuxième partie le matériel et l'ensemble des techniques et méthodes utilisées pour l'étude cytogénétique, l'extraction, le dosage colorimétrique (des polyphénols, des flavonoïdes et les tannins condensés), l'analyse par HPLC, les activités anti-oxydantes, les activités antimicrobiennes et finalement l'étude toxicologique et pharmacologique de différents extraits. La troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus dans notre étude.

Une conclusion générale est donnée à la fin du présent travail en tirant les principaux résultats obtenus. Ces derniers pourraient stimuler d'autres travaux de recherche dans le sens de servir et de valoriser le patrimoine national dans le domaine des plantes médicinales.

Revue
Bibliographique

Chapitre 1 : Données générales sur le Figuier de barbarie

1. Biologie d'*Opuntia ficus indica*

Le figuier de Barbarie est une plante arborescente robuste de 3 à 5 m de haut, possède un tronc épais et ligneux et une organisation en articles aplatis, de forme elliptique ou ovoïdale de couleur vert-mat, ayant une longueur de 30 à 50 cm, une largeur de 15 à 30 cm et une épaisseur de 1.5 à 3 cm appelés cladodes ou raquettes (Figure 1)

Les cladodes assurent la fonction chlorophyllienne et sont recouvertes d'une cuticule cireuse (la cutine) qui limite la transpiration et les protège contre les prédateurs. Les feuilles sont de forme conique et ont quelques millimètres de long, éphémères, apparaissant sur les cladodes jeunes. A leur base, se trouvent les aréoles (environ 150 par cladodes) qui sont des bourgeons axillaires modifiés, typiques des Cactacées. Leurs méristèmes produisent des épines, des glochides, des racines adventives, de nouvelles cladodes ou des fleurs. Les épines sont blanchâtres, sclérifiées, solidement implantées et longues de 1 à 2 cm.

Il y a deux variétés, la variété inerme et l'épineuse. Les glochides sont de fines épines de quelques millimètres de couleur brunâtre, se décrochent facilement, munies de minuscules écailles en forme d'hameçons s'implantant solidement dans la peau. Ils sont présents même chez la variété inerme.

Les fleurs marginales sur le sommet des cladodes âgées d'un an, et le plus souvent sur les aréoles situés au sommet des cladodes ou sur la face la plus exposée au soleil, sont hermaphrodites, de couleur jaunâtre et deviennent rougeâtres à l'approche de la sénescence de la plante. En principe, une cladode peut porter jusqu'à trentaine de fleurs.

Ses fruits sont des baies charnues ovoïdes ou piriformes, uniloculaires et polyspermiques (Reyes-Aguiró et *al.*, 2006 ; Neffar S., 2012).

1.1 Position systématique

La position systématique du figuier de barbarie est la suivante :

Règne: *Plantae*

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : *Caryophyllidae*

Ordre : Caryophyllales

Famille : *Cactaceae*

Sous-famille : *Opuntioideae*

Tribu : *Opuntieae*

Genre : *Opuntia*

Sous-genre : *Platyopuntia*

Espèce : *Opuntia ficus indica*

Nom commun :

Figuier de Barbarie

Nom latin :

Opuntia ficus-indica

Autres noms :

Figuier des Indes, figue du désert, nopal, semelle du pape, figuier d'Espagne

La famille des Cactacées renferme environ 1600 espèces avec le centre de la diversité maximale au Mexique qui abrite 669 espèces (Guzman et *al.*, 2003). La tribu des *Opuntieae* comprend le genre *Opuntia*, subdivisé à son tour en quatre sous-genres : *Platyopuntia*, *Cylindropuntia*, *Tephrocactus* et *Brasiliopuntia*. Le sous genre *Platyopuntia* comprend 150 à 300 espèces, parmi lesquelles figure *Opuntia ficus indica*. Cette espèce est la cactée qui a la plus grande importance agronomique, tant pour les fruits comestibles que pour les raquettes qui peuvent être utilisées comme fourrage ou comme légumes (Dubeux et *al.*, 2006).

De nombreuses sources indiquent que le nombre chromosomique est $2n= 88$ chez les deux formes (inermes et aspermes). Elles sont toutes les deux octoploïdes (Mulas et Mulas, 2004).



Figure 1 : la plante d'*Opuntia ficus indica*

2. Origine et Distribution géographique d'*Opuntia ficus indica*

Le genre *Opuntia* est originaire du Mexique (Orwa et al., 2009). Sa distribution géographique est très large (Figure 2) : Mexique, Sicile, Chili, Brésil, Turquie, Corée, Argentine et Afrique du Nord (Barbera et al., 1992 ; Nerd et Mizrahi, 1994). Il a été introduit d'abord en Espagne et plus tard au 16^{ème} siècle au Nord et au Sud de l'Afrique. Il s'est diffusé rapidement dans le bassin méditerranéen et s'y est naturalisé au point de devenir un élément caractéristique du paysage (Le Houerou, 1996). Il est par essence développé sur la partie Ouest de la Méditerranée : Sud de l'Espagne, le Portugal, et l'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie et Maroc) (Bensalem et al., 2002 ; Arba, 2009). Dans certains pays tels que l'Italie, l'Espagne, le Mexique, la culture du cactus est pratiquée de façon intensive et moderne avec des programmes de recherche et développement pour la production du fruit ou de fourrage et même pour des usages industriels (Mulas et Mulas, 2004). En revanche, en Australie et en Afrique du Sud, ce végétal, en particulier la variété asperme est considérée comme une mauvaise herbe (Orwa et al., 2009).

3. Plantation

Elle est effectuée à partir de Février-Mars dans les régions du sud ou en fin de printemps dans d'autres régions. Les nouvelles plantations sont établies à partir de grandes boutures de tiges constituées de 4 à 5 cladodes. Elles sont récoltées, séchées pendant quelques jours (une semaine à un mois) avant d'être directement plantées dans le sol. Le séchage des cladodes avant la plantation est nécessaire afin d'éviter la pourriture. La partie basale est placée horizontalement avec une légère inclination afin d'augmenter la surface de contact avec le sol. La formation des racines a lieu après 15 jours. Les modes de plantation sont en quiconque dans la plaine et en lignes dans la montagne. Les espacements varient de 0,5x2 m à 4x4 m. La forte densité (1600 à 2000 plants/ha) n'est recommandée que pour les zones qui sont relativement bien arrosées. L'orientation N-S est importante pour bien assurer l'ensoleillement des plants.

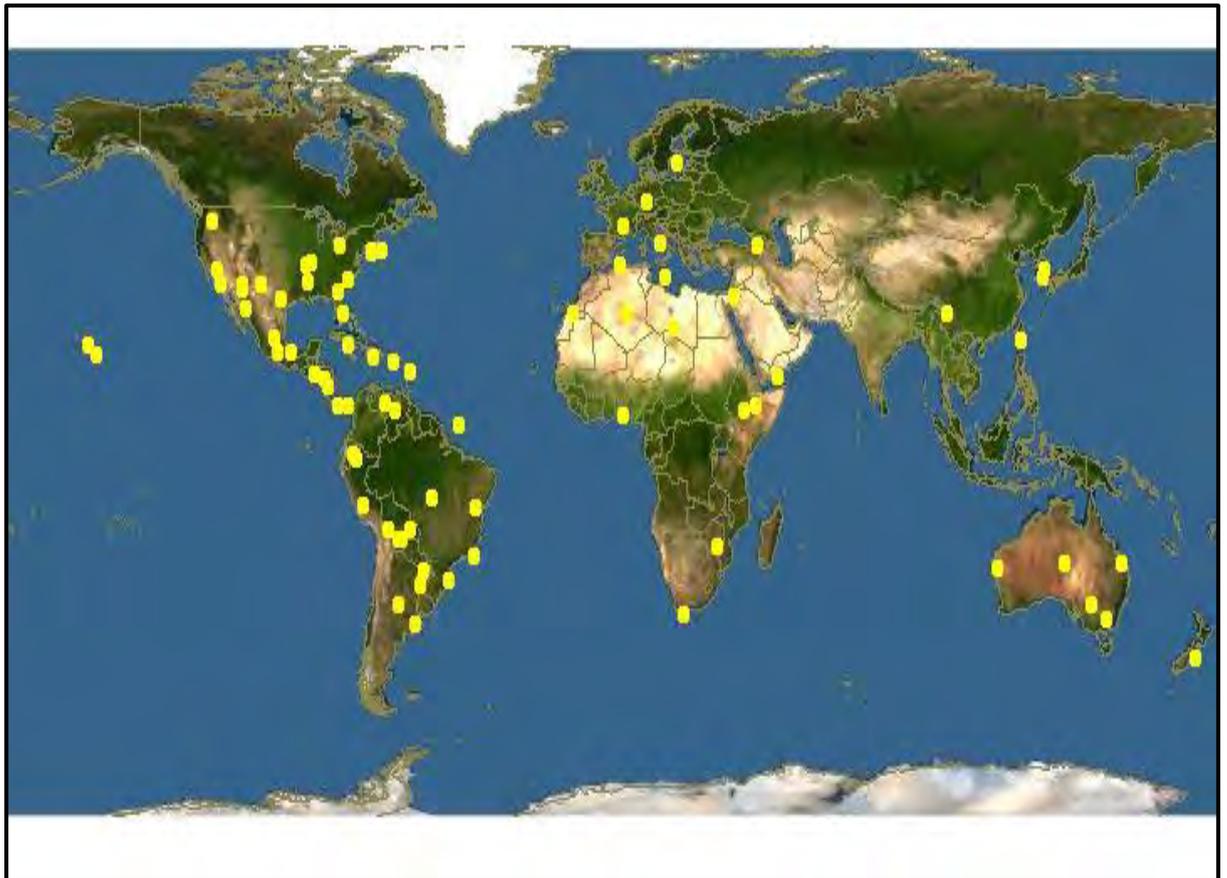
Un autre mode de propagation, consiste à utiliser des jeunes raquettes âgées d'un an. Elles sont prélevées en Juillet (certains auteurs conseillent l'automne), traitées à l'acide naphthalène acétique (1000 ppm) et mises en pots sur un substrat composé de sable et de tourbe (1:1). Après 4 mois, une moyenne de 42,5 racines par cladode est

obtenue. Ce mode de propagation permet de profiter des jeunes cladodes éliminés lors de la taille en vert et qui sont généralement non-exploités (Boudechiche L., 2012).

4. Exigences écologiques

Le genre *Opuntia* est xérophyte (Gibson et Nobel, 1986). Il croit principalement dans les zones arides et semi-arides. Sa remarquable variabilité génétique lui procure une forte adaptabilité écologique, ce qui lui permet de vivre sous différentes conditions climatiques (Stintzing et Carle, 2004).

Il croit dans les plaines, les régions côtières et les plateaux (Lahsasni et *al.*, 2004). Il craint les fortes gelées et peut supporter des températures minimales jusqu'à -10°C pour quelques heures. Cette tolérance dépend de la turgidité du tissu chlorenchymateux des cladodes (Saenz et *al.*, 2004). Les températures maximales supportées excèdent les 50 à 58°C . Bien que cette espèce ait une large faculté d'adaptation pour différents sols (acides, calcaires ou pauvres en matière organique), elle a une préférence pour les sols très perméables, sableux ou caillouteux (Nerd et *al.*, 1991).



■ *Opuntia ficus indica*
(www.map_of_opuntia_ficus_indica)

Figure 2 : Répartition mondiale d'*Opuntia ficus indica*

5. Ethnopharmacologie du figuier de barbarie

Le figuier de barbarie appartient depuis toujours aux plantes médicinales les plus utilisées. La recherche médicale moderne redécouvre avec un intérêt grandissant la plante et ses propriétés. Elle étudie les molécules actives qui la composent et lui permettent de lutter efficacement contre quelques-unes des affections les plus graves de notre temps: réduire le taux de sucre et de cholestérol dans le sang (Fernandez et *al.*, 1990), utilisée comme régulant diurétique et comme remède au dysfonctionnement de la prostate (Pimienta Barrios et *al.*, 1993). Cette plante a aussi un effet comme remède aux douleurs gastro-intestinales, l'angoisse, l'artériosclérose, la spasmophilie, le stress, aux brûlures et coups de soleil.

Les scientifiques ont récemment observé les effets anticancéreux de la bétanine isolé de l'*Opuntia ficus-indica* sur la lignée de cellules K562 de la leucémie myéloïde chronique et sur des mélanomes (cancer de la peau) chez la souris.

Le figuier de Barbarie est aussi utilisé dans de nombreux pays grâce à ses propriétés amaigrissantes.

L'huile essentielle des graines des fruits du cactus sont riches en acides gras poly-insaturés, en stérols et en vitamines, elle est utilisée comme antiride naturel et pour la fabrication des crèmes dermiques antirides (Ennouri et *al.*, 2005; Coskuner et Tekin, 2003).

6. Importance économique et écologique

L'adaptation du figuier de Barbarie aux conditions désertiques et semi désertiques lui permet de constituer une culture à intérêt écologique et socio-économique indéniable. Il a suscité un regain d'intérêt particulier dans plusieurs pays en raison de cette importance (Tableau 1). En effet, ce végétal répond efficacement lorsqu'il est utilisé dans la conservation, la restauration et la valorisation des sols. Il met en valeur les terres marginales et infertiles où d'autres espèces cultivées végétaient difficilement. Il ne demande pas de pratiques culturales spécialisées, ni d'apport de fertilisants, ni de traitement antiparasitaire (Habibi, 2004). Son impact considérable sur le revenu des agriculteurs a fait de cette plante l'une des espèces les plus rentables économiquement.

6.1 Importance écologique

Le figuier de Barbarie est capable de produire de grandes quantités de biomasse végétale même dans les conditions extrêmes. Avec une pluviosité comprise entre 150 et 400 mm/an et en l'absence de fertilisation, la variété inerme peut produire jusqu'à 100 tonnes de raquettes/an (Monjauze et Le Houerou, 1965). Cette production est en fonction des régions (Habibi, 2004).

L'utilisation du cactus pour la protection et la mise en valeur des sols dans les régions arides et semi-arides a été démontrée dans la région de Milpa- Alta en Mexique (Arba *et al.*, 2009 ; Orwa *et al.*, 2009). Cette région a été complètement défrichée pour y introduire des cultures fourragères telles que les maïs. L'échec était total en raison de la faiblesse et de l'irrégularité des précipitations. Ce n'est que par la réintroduction du cactus que toute la région a été remise en valeur sans risque de dégradation environnementale. Les *Opuntia*, en association avec d'autres espèces ligneuses ont été utilisés avec succès dans un programme de fixation des dunes en Somalie. Les racines étendues de cette espèce sont en mesure d'exercer une action antiérosive efficace en stabilisant les surfaces en pente (Saenz *et al.*, 2004). D'un point de vue pédologique, ce végétal permet l'évolution positive des sols par la biotransformation des racines et des raquettes en substances organiques et donc une plus grande disponibilité en éléments nutritifs (Le Houerou, 1996 ; Mandouri, 2000).

6.2 Importance économique

L'importance économique de ce végétal réside dans la production du fruit destiné à l'alimentation humaine et son usage fourrager pour l'alimentation animale, donc il génère de revenus et d'emplois au profit des habitants. Ces avantages économiques se résument en :

A. Production de fruits et raquettes comestibles

La première importance économique du cactus dans le monde réside dans la production de fruits comestibles (Pimienta-Barrios *et al.*, 1993). Ces fruits sucrés et juteux et leur valeur nutritionnelle est semblable à celle de la plupart des fruits comme les oranges, les pommes, les poires, l'abricot, les cerises... etc. (Barbera *et al.*, 1992). Il

contient en moyenne 85 % d'eau, 15 % de sucres, 0.3% de sels et moins de 1 % de protéines. C'est une bonne source de vitamine C avec un apport énergétique important. Il est consommé à l'état frais, bouilli dans l'eau ou séché (Pimienta-Barrios, 1993). Les jeunes raquettes (Nopals ou Nopalitos) de 10-15 cm de longueur sont consommées comme légumes et ingrédients dans la confection des autres préparations alimentaires (Saenz, 2004). Le mucilage possède des propriétés visqueuses est utilisé en industrie alimentaire (Sepulveda et *al.*,2007). Les graines du fruit donnent une huile comestible qui présente un haut degré d'insaturation, avec un taux important d'acide linoléique, d'acide palmitique et d'acide oléique (Ramadan et Morsel, 2003). Cette huile appartient à la même catégorie que celle des graines de soja, de maïs et de tournesol.

B. Production de fourrage pour le bétail

La production de fourrage pour le bétail représente la deuxième importance économique du cactus dans le monde. Il est utilisé depuis longtemps dans l'alimentation du bétail des zones arides et sa production dans ces zones est plus rentable que celle de certaines d'autres espèces fourragères comme le maïs et le sorgho (Russel, 1986). Il est cultivé comme espèce fourragère dans plusieurs pays dans le but d'assurer un stock alimentaire pour le bétail dans le cas d'une situation critique de sécheresse (Pimienta Barrios et *al.*, 1993). Un certain nombre de pays: Mexique, USA, Brésil, Pérou, Chili...etc. produisent des quantités importantes de raquettes en tant qu'aliment pour le bétail (Nobel et *al.*, 1987). Des rendements élevés de 400 à 500 T de matière fraîche par hectare sont obtenus avec une densité élevée de 24 plants/m² (Cortazar et Nobel, 1992).

Les raquettes du cactus sont appréciées par le bétail car elles sont riches en eau, en fibres, en protéines et en éléments minéraux (Nefzaoui et Ben Salem, 2000; Le Houérou, 2002). Leur consommation permet d'améliorer la saveur du lait et la couleur du beurre (Russel et Felker, 1987).

Tableau 1: Les utilisations du figuier de Barbarie (Inglese et *al.*, 1995).

Aires commerciales	Usages spécifiques
Production alimentaire	Fruit, Nopalitos, jus de fruit, extraction d'huiles des graines.
Production d'énergie	Alcool, biomasse fraîche.
Aliment de bétail	Fourrage, déchets de fruits.
Usage médical	Fleurs pour les diurétiques, cladodes pour diabète, mucilages.
Usage agronomique	Fixation du sol, source d'eau complémentaire, brise-vent.
Colorants	Betalaines dans les fruits, acide carminique.

7. Les phytomédicaments les plus demandés sur le marché

Actuellement, les médicaments élaborés à partir de plantes sont des extraits, des fractions séparées par chromatographie, des mélanges ou des ensembles de composants dont l'action pharmacologique dépend de la combinaison des principes actifs tirés des végétaux (Lahsissene H., 2009), ils constituent une nouvelle catégorie de produits pharmaceutiques appelés phytomédicaments (Tableau 2).

Tableau 2 : Les phytomédicaments les plus demandés sur le marché

Plante	Effet observé	Utilisation en cas de :
<i>Allium sativum</i>	Antiplaquettaire	Artériosclérose et dysfonctionnement des plaquettes
<i>Arnica montana</i>	Anti-inflammatoire	Blessures et lésions
<i>Artemisia annua</i>	Antiparasitaire	Malaria
<i>Angelica sinensis</i>	Protection hépatique	Hépatite et cirrhose hépatique
<i>Astragalus radix</i>	Immunostimulant	Grippe
<i>Centella asiatica</i>	Collagène actif I	Blessures et brûlures
<i>Crataegus oxyacantha</i>	Meilleure perméabilité vasculaire	Maladies cardio-vasculaires
<i>Echinaceae purpurea</i>	Immunostimulant	Infections respiratoires
<i>Ginkgo biloba</i>	Antioxydant	Insuffisance cérébrovasculaire
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Active les prostaglandines	Ulcère gastrique et duodéal
<i>Matricaria chamomilla</i>	Inhibe les prostaglandines et les leuctotriènes	Inflammation viscérale
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Hypoglycémiant	Diabète sucré
<i>Panax ginseng</i>	Adaptogène et tonique	Affaiblissement et stress
<i>Plantago psyllium</i>	Hypocholestérolémiant	Prévention des infarctus
<i>Psidium guajava</i>	Antagoniste du calcium	Antidiarrhéique
<i>Tanacetum parthenium</i>	Antisérotoninergique	Migraine
<i>Thymus vulgaris</i>	Antimicrobien	Pharyngite et amygdalite
<i>Zingiber officinal</i>	Antisérotoninergique	Migraine et nausée

Chapitre 2 : Oxydation et Antioxydants

1. Définition d'un radical libre

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

Les radicaux libres (RL) sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir leur stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un RL attaque la molécule stable la plus proche en lui volant son électron, et la molécule attaquée devient alors elle-même un RL. Bien que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou un oxydant, il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres (Anderson et *al.*, 1996 ; Fosting, 2004).

2. La production de radicaux libres

2.1 La production intracellulaire

Les ERO sont des radicaux libres résultant du métabolisme de l'oxygène. La production des EOR chez l'homme découle de plusieurs sources possibles (Figure 3) mais essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire.

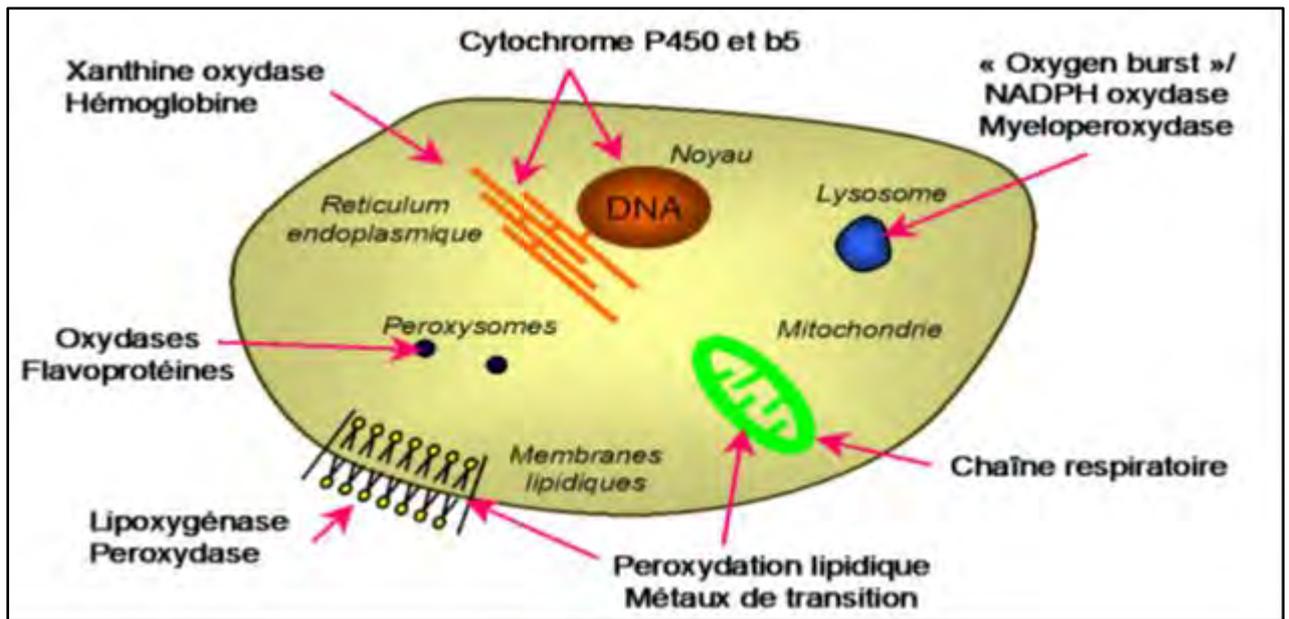


Figure 3: Sites de production intracellulaire des ERO (Mechlin I.J et *al.*, 1987)

La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon :



Les cytochromes P450, accepteurs terminaux d'électrons du complexe de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, catalysent la réaction :



Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde:



D'autres sources peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme la xanthine oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde, les peroxysomes qui possèdent plusieurs enzymes qui sont sources de peroxyde d'hydrogène et les lipo-oxygénases, enzymes de la voie de l'acide arachidonique qui permettent notamment la synthèse des prostaglandines, oxydent les acides gras pour donner des hydroperoxydes d'acide gras insaturés.

Par ailleurs, au cours de la défense antibactérienne, les cellules phagocytaires activées par une réaction inflammatoire vont produire un grand nombre d'ERO. De plus, il y a production massive d'anion superoxyde par le mécanisme leucocytaire.

Les NO synthétases, à l'origine du radical $\text{NO}\cdot$, peuvent, sous certaines conditions, produire également des anions superoxydes (Delattre et *al.*, 2005)

2.2 La production extracellulaire

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes.). Les rayonnements UV induisent la synthèse de O_2^- , $\text{OH}\cdot$, O_2 et d' H_2O_2 (Sumaya Martinez, 2004).

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels..), ainsi qu'une alimentation chimiquée (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Mena et *al.*, 2009).

3. Différents type des ERO

- **L'anion-radical superoxyde ($\text{O}\cdot_2$)** : est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de la chaîne de transport des électrons de la membrane mitochondriale ou au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus. Il semble être impliqué dans la protéolyse non enzymatique du collagène.

- **Le peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2)** : provient d'une réaction entre deux anions superoxyde qui met fin au processus radicalaire. IL s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant.

- **Le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$)** : est le produit de la réaction du peroxyde d'Hydrogène avec les ions métalliques comme par exemple le fer. Avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène.

- **L'oxyde nitrique ($\text{NO}\cdot$)** : produit par la NO synthétase, est un vasodilatateur physiologique et joue aussi un rôle de messenger interneuronal. Il peut avoir un rôle néfaste.
- **L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)** : est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence musculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau.
- **L'anion hypochlorite (ClO^-)** : est produit à partir du peroxyde d'hydrogène par la myéloperoxydase (MPO). Il n'est présent que lors des infections.
- **Le peroxynitrite (ONOO^-)** : est issu de la réaction entre ($\text{O}\cdot_2$) et ($\text{NO}\cdot$). Très néfaste pour les protéines et les gènes, il est impliqué dans l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde (Potterat, 1997 ; Dacosta, 2003).

4. Stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs, ce déséquilibre a pour conséquences l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules (Aravodis, 2005). Les cibles biologiques les plus vulnérables à cet endommagement oxydatif sont : l'acide désoxyribonucléique (ADN) (modification des bases, cassure des brins), les protéines (modification structurales et fonctionnelles) et les lipides (peroxydation lipidique) (Hu et *al.*, 2005).

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreux désordres et maladies : athérosclérose (Ko et *al.*, 1998 ; Harrison et *al.*, 2003), la cancérogenèse, l'arthrite, l'asthme, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le mongolisme (Cavin, 1999), les maladies cardiovasculaires, arthrose, le diabète, chute de cheveux et le vieillissement (Tohda et *al.*, 2004; Pastre et priymenko, 2007).

5. Les antioxydants

Toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce

substrat est appelée antioxydant. Le terme de substrat oxydable inclut toutes sortes de molécules *in vivo* (Halliwell, 1999).

Le radical arrache un électron à l'antioxydant et non pas aux constituants de nos cellules. Grace à cette réaction, le radical libre devient stable et ne présente aucun danger, il sera éliminé naturellement par l'organisme. L'antioxydant, auquel il manque un électron, à l'avantage de ne pas transformer en radical libre. Il devient inactif.

Il existe un très grands nombre de molécules antioxydantes. Elles peuvent être biologiques (naturellement fabriquées par notre organisme) ou bien apportées par l'alimentation. Chaque antioxydant a une localisation bien spécifique et cible des radicaux libres particuliers. (Hennebelle, 2006).

Un bon antioxydant devra respecter quelques critères (Valko et *al.*, 2006) :

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres.
- Chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{+}) d'importance biologique, capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton.
- Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer.
- Avoir un effet positif sur l'expression génique.
- Être rapidement absorbé.
- Avoir une concentration qualifiée dans les tissus et les fluides biologiques.
- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire.

6. Le pouvoir antioxydant

6.2 Protections cellulaires

6.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Figure 4) les plus efficaces chez l'homme ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase (Mates et *al.*, 1999; Sharma et *al.*, 2012).

Le rôle majeur du superoxyde dismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire.

La catalase, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

L'activité du glutathion peroxydase, ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (Delattre et *al.*, 2005).

D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante, l'ensemble formant un système complexe : glutathion réductase, thioredoxine reductase, glutathion transferase...etc.

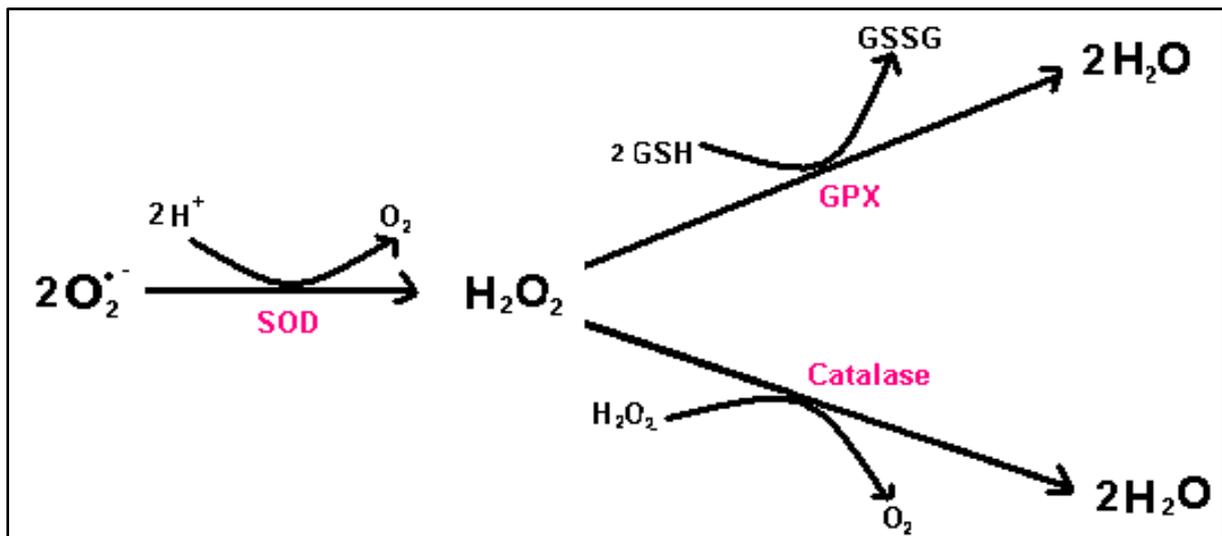


Figure 4 : Réaction de détoxification du radical-anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (Hennebelle, 2006).

6.2.2 Systèmes antioxydants non-enzymatiques

➤ Systèmes antioxydants endogènes

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux HO^{\bullet} , RO_2^{\bullet} , RO^{\bullet} , 1O_2 , $ONOO^{\bullet}$, des radicaux centrés sur le carbone, et aussi l'acide hypochloreux $HOCl$.

Le glutathion est aussi capable de participer à l'activité non-enzymatique, il détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (McCall et Frei, 1999 ; Masella et *al.*, 2005; Delattre et *al.*, 2005).

Les deux formes, oxydée et réduite, de l'acide lipoïque, autre composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés antioxydantes *in vitro* en piégeant les HO^{\bullet} , RO_2^{\bullet} ,

l' HOCl et l' $^1\text{O}_2$. En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, ils permettent de les désactiver d'un point de vue catalytique, et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (Packer et al., 2001; Smith et al., 2004).

L'acide urique, présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes *in vitro* contre les HO^\bullet et RO_2^\bullet , tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine (Delattre et al., 2005).

➤ **Systèmes antioxydants exogènes**

Les antioxydants chimiques exogènes (Figure 5), eux, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (McCall et Frei, 1999).

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky et al., 1999). Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AsC^-) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AsC^\bullet), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée (Asc^\bullet) (Figure 6) (Valko et al., 2006).

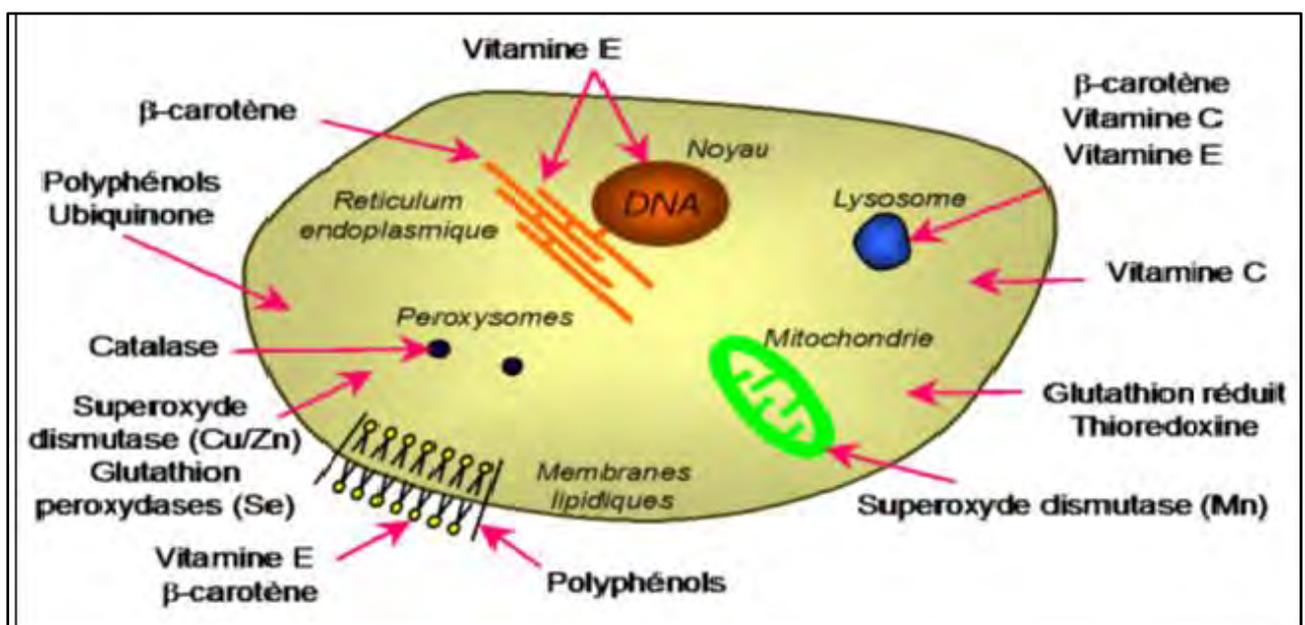


Figure 5: Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires (Mechlin I.J et al., 1987)

Paradoxalement, les études *in vivo* de la supplémentation en vitamine C montrent, pour la plupart, une réduction de l'oxydation de l'ADN, des protéines et de la lipoperoxydation, alors que certains auteurs relatent l'effet pro-oxydant *in vitro* de cette molécule dans des milieux tamponnés contenant du fer en accélérant la réaction de Fenton (Seon Hwa et al., 2001; Valko et al., 2006).

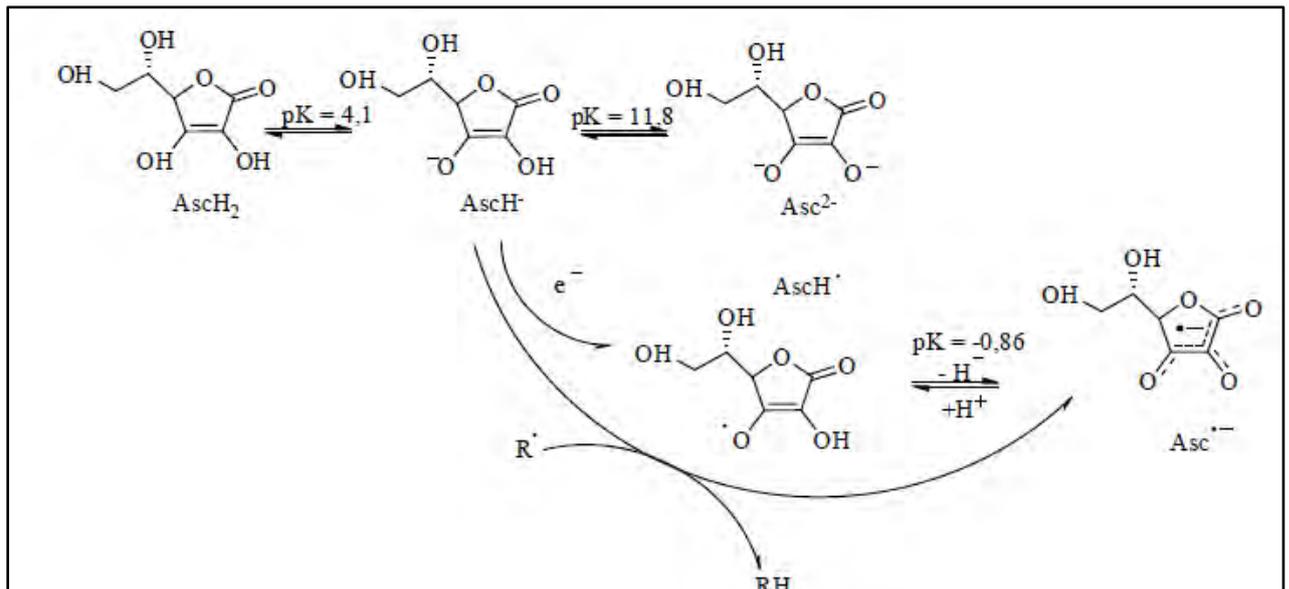


Figure 6: Différentes structures chimiques de la vitamine C et la réaction avec les radicaux (Valko et al., 2006)

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (Figure 7). Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO[•] (Figure 8) (Yoshida et al., 1993).

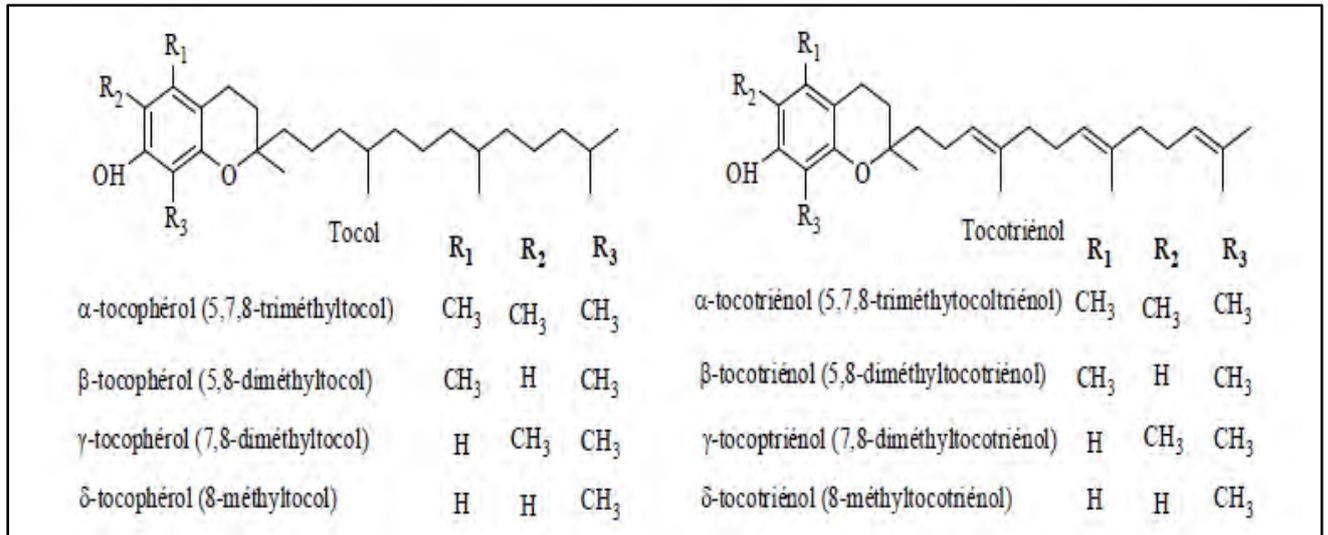


Figure 7: Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols (Valko et al., 2006)

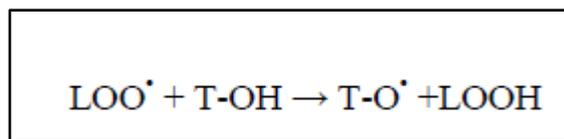


Figure 8 : Mécanismes d'action antioxydante de la vitamine E sur les radicaux LOO• (Valko et al., 2006)

De plus, il faut noter que la vitamine C associée à la vitamine E régénère la forme réduite de l'α-tocophérol par une réaction de transfert d'hydrogène (Dreher et Junod, 1996).

Les caroténoïdes : Sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles (Figure 9). On dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO•, HO•, O₂⁻, R• par simple addition électrophile et transfert d'électron (Figure 10). Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko et al., 2006).

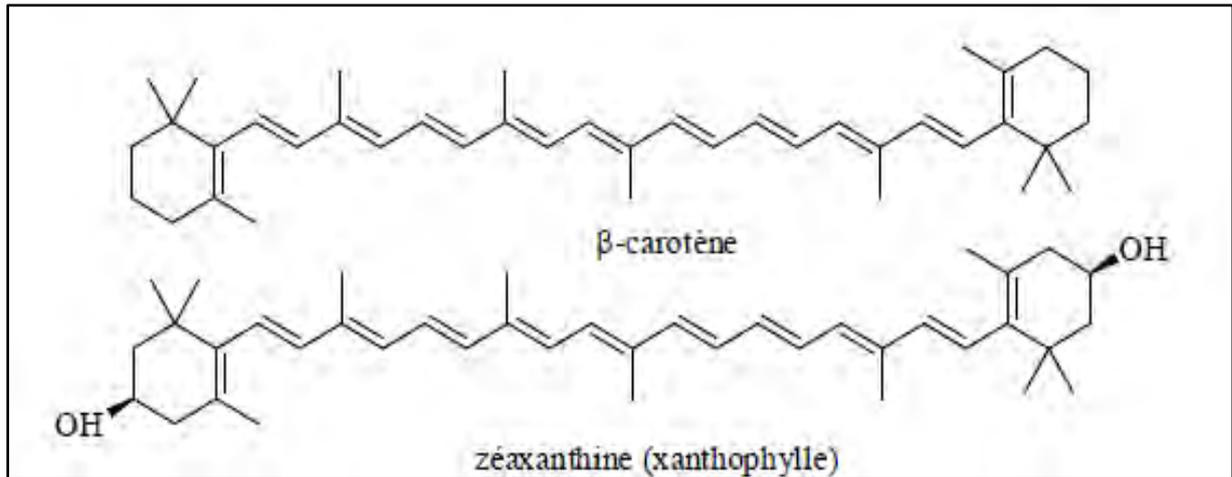


Figure 9 : Structures chimiques de carotène et xanthophylle (Valko et al., 2006)

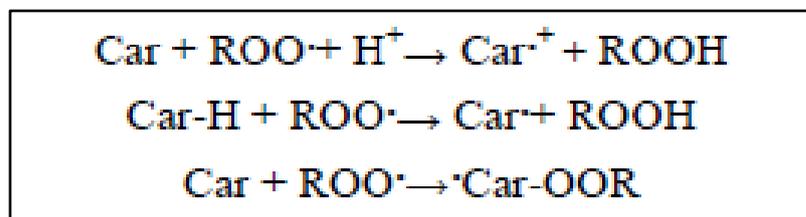


Figure 10 : Mécanismes traduisant l'activité antioxydante des caroténoïdes, cas des ROO^\bullet (Valko et al., 2006)

Les composés phénoliques, et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane (Figure 11). Leur capacité antioxydante réside dans leur capacité à neutraliser les radicaux libres par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Figure 12) (Schroeter et al., 2002; Leopoldini et al., 2011).

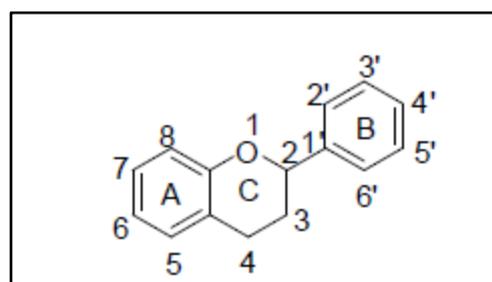


Figure 11 : Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane (Leopoldini et al., 2011)

De façon générale, l'activité biologique des composés phénoliques et spécialement les flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier le nombre des groupements hydroxyles (Schroeter et *al.*, 2002).

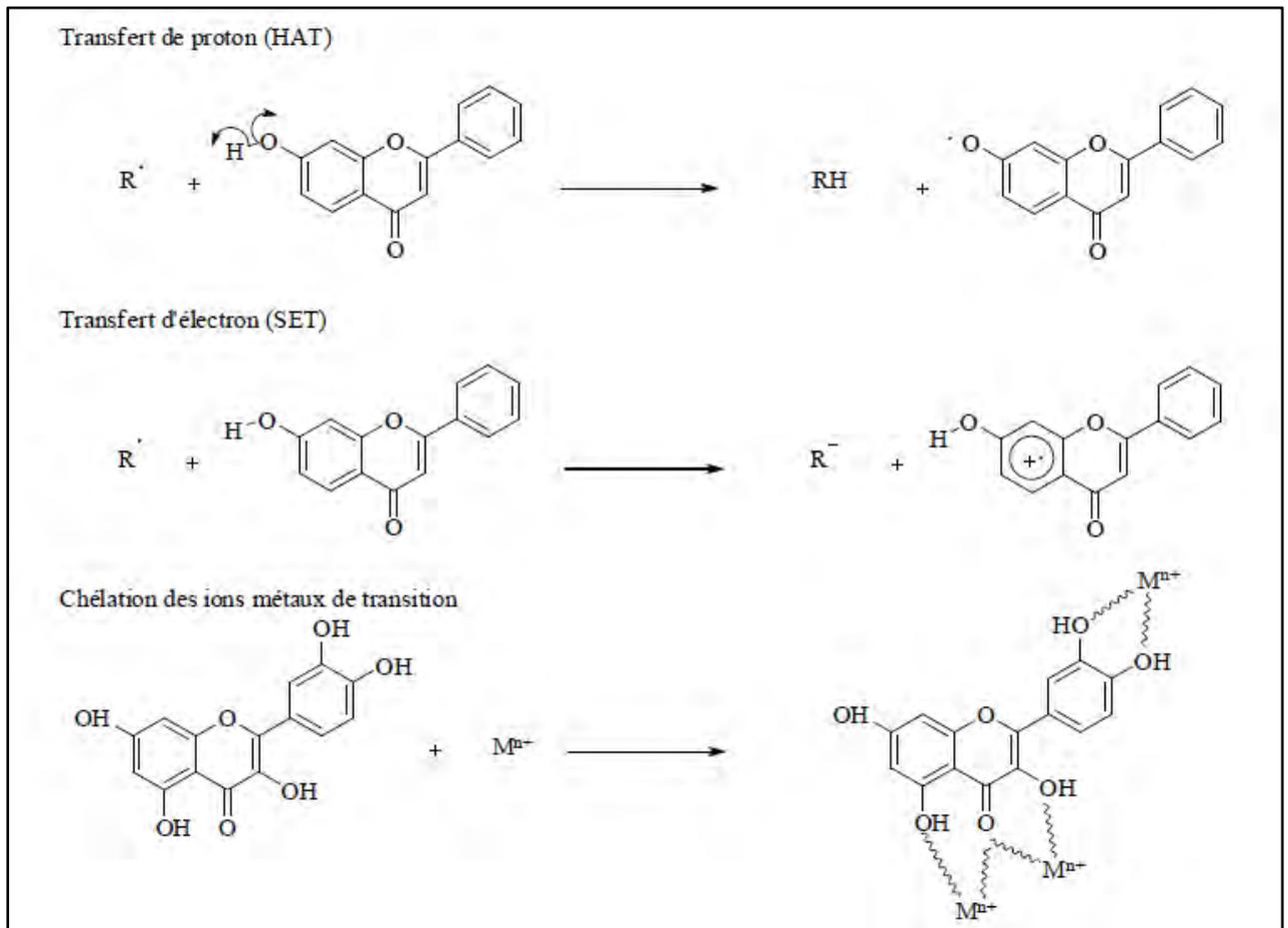


Figure 12 : Mécanismes d'action des antioxydants des composés phénoliques
(Leopoldini et *al.*, 2011)

7. Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire

Les méthodes les plus utilisées, en particulier pour les tests *in vitro* chimiques, sont représentées dans le tableau 3, en mettant en avant les mécanismes réactionnels, les avantages et inconvénients de la méthode.

Les tests antioxydants *in vitro* biologiques sont difficilement accessibles en raison de leur caractère commercial (brevets). Néanmoins, la littérature mentionne quelques tests qui sont présentés dans le Tableau 4.

Les résultats des activités Antioxydantes sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante.

Tableau 3 : Quelques tests *in vitro* chimiques

QUELQUES TESTS <i>IN VITRO</i> CHIMIQUES				
Tests	DPPH	ABTS ou TEAC	FRAP	ORAC
Mécanismes réactionnels	<ul style="list-style-type: none"> transfert d'électron majoritaire 	<ul style="list-style-type: none"> transfert d'électron et de proton 	<ul style="list-style-type: none"> transfert d'électron 	<ul style="list-style-type: none"> transfert de proton
Nature des molécules testées	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles et lipophiles 	<ul style="list-style-type: none"> hydrophile et lipophiles 	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles 	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	<ul style="list-style-type: none"> CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent d'une molécule de référence 	<ul style="list-style-type: none"> CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent d'une molécule de référence 	<ul style="list-style-type: none"> en mg ou μmol équivalent Fe^{2+} 	<ul style="list-style-type: none"> CI50 et/ou en mg ou μmol équivalent d'une molécule de référence
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> très facile à mettre en œuvre peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> très facile à mettre en œuvre cinétique de réaction très rapide peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> très facile à mettre en œuvre peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> facile à mettre en œuvre couteux (nécessité d'un fluorimètre) Utilisation d'un générateur de radicaux ($\text{ROO}\cdot$)
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires interférences possibles à 515 nm forte dépendance au pH et au solvant radical inexistant <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> produits de dégradation antioxydants radical inexistant <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> pH utilisé non physiologique interférences possibles à 595 nm interférences avec composés possédant $E^\circ < 0,77\text{V}$ 	<ul style="list-style-type: none"> mécanismes de génération des $\text{ROO}\cdot$ non physiologique interférences possibles des protéines
Référence	(Prior et al., 2005)			

Tableau 4: tests *in vitro* biologiques

TESTS <i>IN VITRO</i> BIOLOGIQUES			
Tests	KRL	CAP-e	ROS-PMN
Substrat ou réactif utilisé	<ul style="list-style-type: none"> érythrocytes sang total 	<ul style="list-style-type: none"> érythrocytes 	<ul style="list-style-type: none"> leucocytes
Mécanismes réactionnels	<ul style="list-style-type: none"> mécanismes enzymatiques et chimiques 	<ul style="list-style-type: none"> aptitude des AO à pénétrer et piéger les radicaux 	<ul style="list-style-type: none"> aptitude des AO à pénétrer et piéger les radicaux Inhiber la formation des EOR par les leucocytes polynucléaires (mécanisme anti-inflammatoire) effet pro-inflammatoire
Nature des molécules testées	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles et lipophiles 	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles et lipophiles 	<ul style="list-style-type: none"> hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	<ul style="list-style-type: none"> % du temps de demi-hémolyse en mg ou μmol équivalent Trolox, acide gallique 	<ul style="list-style-type: none"> en mg ou μmol équivalent Trolox, acide gallique 	<ul style="list-style-type: none"> concentration en extrait
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> limitation des solvants Utilisation d'un générateur de radicaux attaque radicalaire continue et progressive 	<ul style="list-style-type: none"> limitation des solvants utilisation d'un générateur de radicaux 	<ul style="list-style-type: none"> très similaire au test CAP-e avec en plus des effets anti-inflammatoires
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> accès difficile au brevet couteux 	<ul style="list-style-type: none"> attaque radicalaire uniquement initiale accès difficile au brevet étude uniquement qualitative 	<ul style="list-style-type: none"> utilisation de H₂O₂ accès difficile au brevet 3 mécanismes d'action
Références	(Blache et Prost, 1992)		(Kang <i>et al.</i> , 2010)

Chapitre 3 : Les métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Ali et *al.*, 2001 ; Li et *al.*, 2007)

1. Les composés phénoliques

➤ Généralités, structures et classification

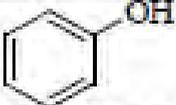
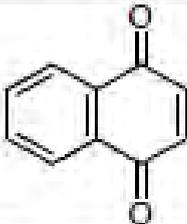
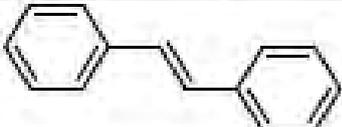
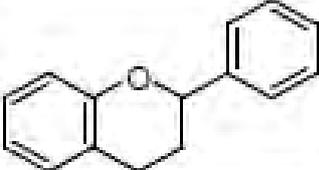
Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. On les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, et ils font donc partie intégrante de notre alimentation. Ces métabolites secondaires n'exercent pas une fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal.

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Ce nom provient du composé parent le plus simple : le phénol.

Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins. Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à ce jour dans le règne végétal. On compte, à l'heure actuelle, pas loin de 8000 composés. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Tableau 5) (Bravo, 1998).

Les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les lignanes sont majoritairement présents dans les feuilles, les fleurs et l'écorce de bois. Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une des caractéristiques d'une sous-classe des flavonoïdes (El Gharras, 2009).

Tableau 5 : Principales classes des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Structures de base
C_6	Phénols simples	
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques	
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques coumarines	
C_6-C_4	Naphtoquinones	
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes	
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes	
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	
$(C_6-C_3)_n$	Lignines	
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés	

Les effets bénéfiques des polyphénols sont attribués à leurs propriétés antioxydantes et à leur capacité de capter les radicaux libres. Ces substances présentent des propriétés anticancéreuses, antimutagènes et antibactériennes non négligeables (Redoyal et al., 2005 ; Hatano et al., 2005).

➤ **Acide phénolique**

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique.

Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Pandey et Rizvi, 2009).

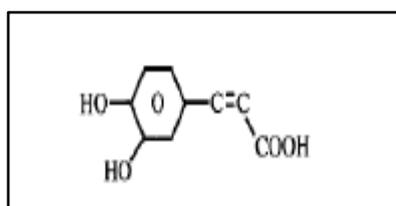


Figure 13: Structure de l'acide caféique (Cowan, 1999)

➤ **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund, 2004). Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (Havsteen, 2002). Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits et les légumes, le thé et le café. Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales, des remèdes utilisés en médecine traditionnelle dans le monde (Di-Carlo et *al.*, 1999).

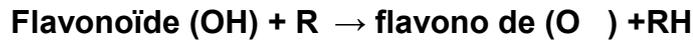
Les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone, et c'est la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permet de distinguer les différentes classes de flavonoïdes (Figure 14):

- Les flavonols
- Les anthocyanidines (ou anthocyanidols)
- Les flavanols

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entité dépourvue de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes présentent plusieurs activités biologiques, dont l'activité la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres: radicaux

hydroxyles OH⁻, anions superoxydes O₂⁻ et les radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes ont une action sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique «P» (Beretz et Cazenave, 1991). Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale. Ils exercent aussi une activité antidiabétique, comme la myricétine qui présente des effets hypoglycémiants et hypotryglycéridémiants chez les animaux diabétiques (Ong et Khoo, 1997 ; Ong et Khoo, 2000).

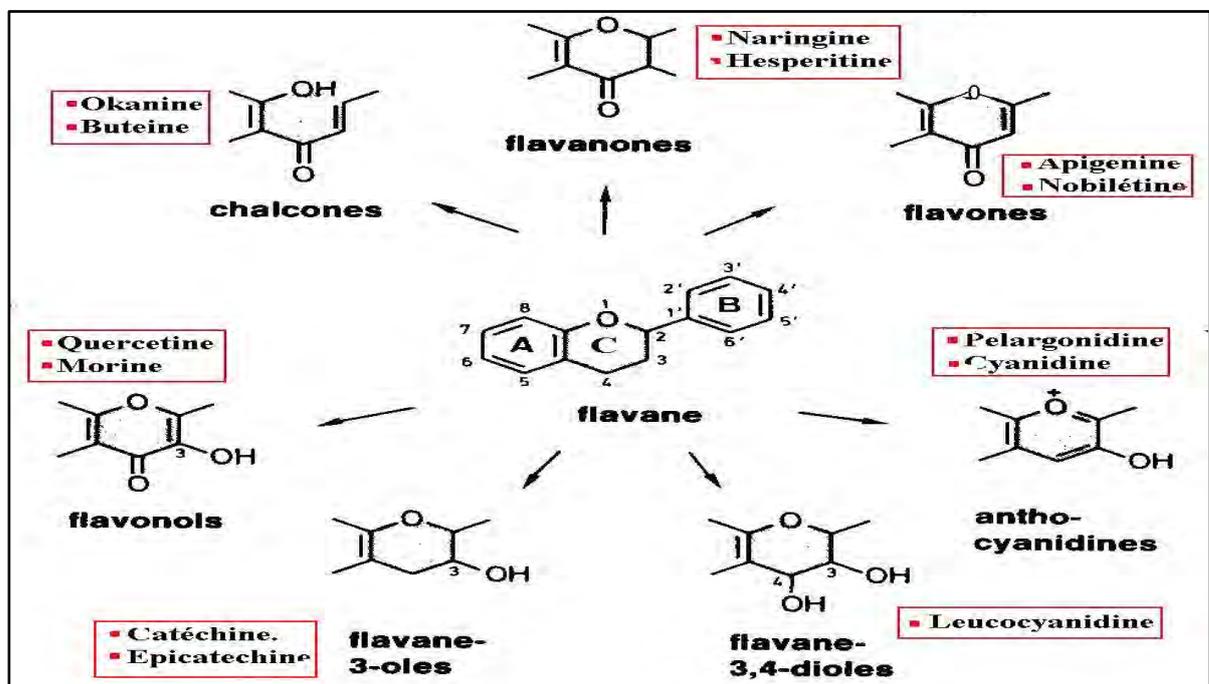


Figure 14: Les différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane. (Louis, 2004).

➤ **Quinones**

Les quinones sont des noyaux aromatiques avec deux substitutions cétones. Ces composés, étant colorés, sont responsable de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connus pour se complexer de manière irréversible avec les nucléophiles des acides aminés dans les protéines. Par conséquent, les quinones inactivent les protéines et altèrent leur fonction (Arif et al., 2009).

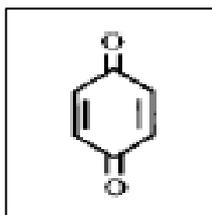


Figure 15: Structure d'une molécule de quinone

➤ Tanins

Les tanins ont une importance économique et écologique et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et des produits qui en sont dérivés (thé, vin ...etc).

On peut considérer que les tanins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter (Macheix et *al.*, 2005). Ils sont divisés en deux groupes :

- Tanins hydrolysables: Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (le plus souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être de l'acide gallique (Macheix et *al.*, 2005). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (Guignard, 1996).

- Tanins condensés: Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane –3–ols dérivés de la (+) – catéchine ou de ses nombreux isomères. À la différence des tanins hydrolysables, ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides dilués (Guignard, 1996; Macheix et *al.*, 2005).

➤ Coumarines

Les coumarines sont des substances phénoliques synthétisées à partir de la fusion des noyaux benzènes et α -pyrone. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés alors que les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau (Bruneton, 1999). Ils ont des activités antithrombotiques, anti-inflammatoires et vasodilatatrices (Cowan, 1999).

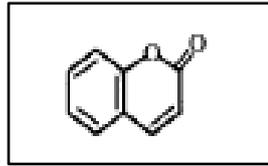


Figure 16: Structure d'une molécule de coumarine

2. Terpénoïdes et stéroïdes

L'interface entre le métabolisme primaire et secondaire est moins facile à définir dans le cas des métabolites terpéniques (dérivés isoprénoïdes), parce que les unités terpéniques sont également présents dans de nombreux composés associés au métabolisme primaire, comme les hormones et les vitamines. Les précurseurs de tous les isoprénoïdes, le pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère allylique pyrophosphate diméthylallyl (DMAPP), sont synthétisés dans les plantes supérieures (Modolo et *al.*, 2009).

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue: les terpènes ou monoterpènes en C₁₀, les sesquiterpènes en C₁₅, les diterpènes en C₂₀, les triterpènes C₃₀, et les tétraterpènes C₄₀ (Guignard, 1996 ; Cowan, 1999).

Les monoterpénoïdes sont des composants majeurs des arômes de plantes. Ces produits naturels volatiles, appelés huiles essentielles, constituent la base de l'industrie de la parfumerie et des arômes (Hanson, 2003).

Les stéroïdes sont dérivés de triterpènes tétracycliques et possèdent un squelette cyclopentaperhydrophénanthrène. La disponibilité, la cristallinité et la conformation bien définie des stéroïdes signifient qu'ils sont devenus des substrats appropriés pour étudier l'influence des facteurs stériques sur les taux de réaction et les mécanismes.

Beaucoup de stérols se produisent sous forme de glycosides caractérisés par les saponines stéroïdiens. Ceux-ci sont responsables de la formation de mousse produite par de nombreuses plantes.

Un certain nombre de stéroïdes végétaux possèdent une activité pharmacologique intéressante. Il s'agit notamment des glycosides digitaliques (cardénolides) de la digitale *Digitalis lanata*. Ceux-ci sont utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Les caroténoïdes sont des pigments rouges ou jaunes que l'on retrouve dans de nombreuses plantes. Ainsi, le β -carotène offre la coloration rouge de carottes et le lycopène est le pigment rouge foncé des tomates. Les caroténoïdes sont importants en tant que précurseurs de la vitamine A, qui joue un rôle central dans la vision. Ils sont de

bons antioxydants et contribuent à des effets bénéfiques de nombreux aliments (Hanson, 2003).

3. Alcaloïdes

Parmi les premiers produits naturels isolés de plantes médicinales sont les alcaloïdes. Ils ont constaté qu'ils contiennent des bases azotées qui forment des sels avec les acides. Ils sont chimiquement des matières organiques composés de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène (Schauenberg et Paris, 2005).

En raison de leur puissante activité biologique, la plupart des alcaloïdes sont connus, environ 12.000, ont été exploités en tant que médicaments, des stimulants, des narcotiques, et des poisons. Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques.

On distingue trois types d'alcaloïdes:

- Alcaloïdes vrais: d'après certains auteurs, ils sont issus d'un seul règne végétal. Ils existent à l'état de sels et sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé.
- Pseudo-alcaloïdes: ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés.
- Proto-alcaloïdes: ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique.

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans des domaines variés :

Au niveau du système nerveux central, qu'ils soient anti dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine);

Au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques, parasymphatomimétiques, anticholinergiques et ganglioplégiques.

On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux, d'antifibrillants, d'antitumoraux, et d'antipaludiques (Bruneton, 1999)

4. Applications industrielles des polyphénols

Selon les propriétés qu'ils possèdent, les polyphénols, ont été exploités, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique.

Les propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (Daglia, 2012).

La capacité antioxydante de composés comme les polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires.

Les polyphénols sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés, d'arômes alimentaires. Aussi ils rentrent dans la composition des produits pharmaceutiques et cosmétiques. (Moure et *al.*, 2001).

Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, le principal responsable du SIDA (Sartori-Thiel, 2003).

Matériels et Méthodes



Partie II : Matériel et Méthodes

I. Matériel

1. La récolte de la plante

Les raquettes de la plante *Opuntia ficus indica* utilisées dans cette étude ont été récoltées de la région el-Khroub, une localité située à une quinzaine de km de la wilaya de Constantine, en 2011. L'authentification a été effectuée par les membres du laboratoire de pharmacologie et toxicologie, Université de constantine¹.

2. Préparation des échantillons

➤ **A partir des raquettes d'*Opuntia ficus indica***

Une fois la récolte du matériel végétal est réalisée, chaque échantillon a été coupé en tranches fines et séché dans une étuve à une température de 50°C pendant 72 heures, puis broyé à l'aide d'un broyeur (type Gulatti MFC) qui tourne à vitesse de 1000 tr/min et équipé d'un tamis de maille de 0,85 mm (80 mesh). La poudre de raquettes ainsi obtenue est conservée dans un bocal hermétique à une température ambiante. Cette poudre fine sera ultérieurement utilisée pour la préparation des différents extraits.

➤ **Méthode d'obtention des graines d'*Opuntia ficus indica***

Séparer et bien nettoyer les graines de la pulpe par l'utilisation de l'eau et les tamis, puis les sécher soigneusement dans un endroit à l'ombre et bien aéré. Les graines ainsi obtenues sont conservées dans des récipients hermétiques placés au frais et à l'abri de la lumière.



a.



b.



c.



d.

Figure 17 : a. Raquettes d'*O.f.indica* à l'état frais, b. et c. Raquettes d'*O.f.indica* après séchage et broyage, d. Les Graines.

II. Méthodes

Chapitre 1 : Etude cytogénétique

1. Dénombrement chromosomique

Le dénombrement chromosomique s'effectue à partir des mitoses racinaires selon le protocole suivant :

Après avoir désinfecté les graines de l'espèce étudiée dans l'eau de javel diluée à l'eau distillée V/V pendant 1 minute, les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri tapissées de papier absorbant et imbibées d'eau distillée à une température ambiante.

➤ **Obtention de racines**

Les racines sont prélevées après qu'elles aient atteint la taille de 10 à 15 mm c'est le moment où la division cellulaire est à son taux maximal. Ce qui correspond au 15ème jour.

Les prélèvements s'effectuent préférentiellement le matin à 8h, où la période est favorable à l'observation d'un grand nombre de divisions cellulaires pour *Opuntia ficus indica*.

➤ **Prétraitement**

Les racines prélevées sont trempées dans un agent mitocalsique, qui est la 8-Hydroxy quinoléine, solution de 0.02 Mol / Litre pendant une durée allant de 3 heures et demi jusqu'à 4 heures à température de 16°C.

➤ **Fixation**

La solution de fixation utilisée est le carnoy (3 :1) qui est composée de 3 volumes d'éthanol et un volume d'acide acétique absolu. La fixation dure de 24 jusqu'à 48 heures à 4°C. La fixation détruit toute vie cellulaire, bloque l'évolution des divisions cellulaires et donc conserve la structure des chromosomes.

➤ **Stockage**

Le matériel végétal peut être conservé pendant plusieurs mois dans une solution d'éthanol 70 % à 4 °C.

➤ **Hydrolyse**

Les racines sont récupérées et mises dans une solution d'hydrolyse qu'est l'HCl (1N) à 60°C pendant 10 minutes.

Cette étape a pour but de détruire la paroi cellulosique et de faciliter l'obtention de cellules séparées et l'observation des chromosomes.

➤ **Coloration**

Les racines hydrolysées sont ensuite mises dans une solution de coloration qui est le carmin acétique (Jahier, 1992) pendant 30 à 45 minutes jusqu'à coloration intense.

➤ **Montage entre lame et lamelle**

Après coloration, les racines sont récupérées, et déposées sur une lame dans une goutte de carmin acétique, et écrasée entre lame et lamelle, pour assurer la dispersion des cellules.

2. Analyse du caryotype

➤ **Observation et photographie**

Après le montage final, on procède à l'observation des préparations, la sélection des meilleures plaques métaphasiques et la photographie de celles-ci.

La photographie des plaques choisies se fait à l'aide du photomicroscope (Axiovision, Zeiss)

➤ **Établissement du caryotype**

Différents paramètres caractérisent un caryotype, tel que le nombre chromosomique de base, la longueur totale des chromosomes, la longueur relative de chaque paire chromosomique, la présence de satellite, le degré de symétrie qui tient compte des longueurs totales des chromosomes et des positions centromériques.

2.1 Caryogramme

A partir des photographies de cinq plaques appartenant à des individus différents, on a dénombré et mesuré les chromosomes, ensuite appariés et alignés de la plus grande paire à la plus petite.

La détection des chromosomes homologues et la détermination de l'emplacement de chacun d'eux dans le caryogramme et la position des centromères sont faites d'après la méthode de Levan et *al.*, (1964).

2.2 Idiogramme

Différentes mesures sont effectuées sur les chromosomes de l'espèce *Opuntia ficus indica* pour l'établissement de son idiogramme :

- Longueurs des bras courts (BC) et des bras longs (BL)
- Longueur totale de chaque chromosome

$$LT = BC + BL$$

- Longueur totale relative de tous les chromosomes

$$LTR = (LT / \sum LT) \times 100$$

- Valeurs moyennes des rapports bras longs / les bras courts

$$r = BL / BC$$

- Différence entre la longueur du bras long et celle du bras court

$$d = BL - BC$$

- Indices centromériques pour chaque paire chromosomique

$$Ic \% = (BC / BL) \times 100$$

- Indice d'asymétrie du caryotype

$$Ias = (\sum BL \times 100) / \sum LT$$

- Rapport R entre la paire chromosomique la plus longue et la plus courte de la garniture chromosomique

Les résultats sont présentés sous forme d'un tableau selon la nomenclature chromosomique proposée par Levan et *al.*, (1964).

Tableau 6: Nomenclature chromosomique proposée par Levan et *al.*, 1964.

Position de Centromère	D	R	lc	Type Chromosomique
Position médiane	00.0	01.0	50.0	M
Région médiane	00.0 – 02.5	1.0 – 1.7	50.0 – 37.5	m
Région Submédiane	02.5 – 05.0	1.7 – 3.0	37.5 – 25.0	Sm
Région subterminale	05.0 – 07.0	3.0 – 7.0	25.0 – 12.5	St
Région terminale	07.5 – 10.0	7.0 – ∞	12.5 – 00.0	t
Position terminale	10.0	∞	00.0	T

M : métacentrique

m : métacentrique senso largo

Sm : Submétacentrique

St : subtélocentrique

t : acrocentrique

T : télocentrique

r : bras long / bras court

d : bras long – bras court

lc : indice centromérique

3. Coloration aux nitrates d'argent AgNO_3

La méthode utilisée est celle de Howell et Black (1980).

Pour révéler les régions NOR's, il faut faire subir aux plaques métaphasiques un traitement en conditions alcalines. Ensuite, il faut procéder à une coloration avec le nitrate d'argent qui réagit avec les protéines associées spécifiquement aux NOR. Ces protéines seront colorées, si elles ont participé à la formation des nucléoles durant l'interphase.

Cette méthode comporte les étapes suivantes:

- Rinçage renforcé des racines avec l'eau distillée afin d'éviter toute trace du fixateur.
- Les racines sont plongées dans une solution de Nitrate d'argent à 15% et un pH=5,5 à 60°C pendant 16 heures.
- Un deuxième rinçage des racines à l'eau distillée.
- Les racines sont transférées dans une solution de révélation constituée de 1% d'hydroquinone et de formaldéhyde (1 % hydroquinone+ Formaldéhyde 10 %). pendant 5 mn.
- Nous passons au rinçage dès que les pointes racinaires se colorent en marron.
- L'écrasement des pointes racinaires se fait dans une goutte d'acide acétique à 45 % entre lame et lamelle.

Chapitre 2 : Screening phytochimique

1. Calcul des rendements

1.1 Détermination de la teneur en eau

La méthode utilisée est la dessiccation par évaporation. On procède à la dessiccation du matériel végétal à la température de $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans une étuve ventilée jusqu'à poids constant.

La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation (Audigié et *al.*, 1978).

La détermination de la teneur en eau se fait par le calcul de la différence de poids avant et après la dessiccation selon la formule suivante.

$$\text{H\%} = \frac{\text{M1} - \text{M2}}{\text{PE}} \times 100$$

H% : Teneur en eau.

M1 : Poids de la capsule + échantillon avant dessiccation.

M2 : Poids de la capsule + échantillon après dessiccation.

PE : La prise d'essai.

Nous avons déterminé la moyenne des pourcentages d'eau de 10 essais dans les mêmes conditions. La matière sèche (MS) est obtenue comme suit :

$$\text{MS \%} = 100 - \text{H\%}$$

1.2 Détermination de la teneur en cendres totales

Elle consiste à un passage au four du matériel végétal à une température de 550°C , jusqu'à destruction totale de toute particule carbonneuse (Laurent, 1991).

La détermination de la teneur en matière organique se fait par le calcul de la différence de poids avant et après la carbonisation. La teneur en matière organique est calculée par la formule suivante :

$$\text{MO \%} = \frac{\text{M1} - \text{M2}}{\text{PE}} \times 100$$

MO% : Matière organique.

M1 : Poids de la capsule et de l'échantillon avant calcination.

M2 : Poids de la capsule et de l'échantillon après calcination.

PE : Prise d'essai.

Nous avons réalisé 10 essais de la même manière afin de déterminer un pourcentage moyen.

La teneur en cendre est calculée comme suit :

$$\text{Cendres \%} = 100 - \text{MO \%}.$$

1.3 Teneur en substances extractibles par l'eau

Nous avons fait une décoction d'un gramme de poudre (PE) avec 20 ml d'eau distillée pendant 15 mn. Après refroidissement et filtration sur papier filtre, le filtrat a été mis dans une capsule pesée et tarée au préalable (n) et évaporé à sec (n'). La teneur en substances extractibles par l'eau est évaluée par la formule (Diallo, 2005):

$$\text{SEE \%} = (n - n') \times 100 \div \text{PE}.$$

1.4 Teneur en substances extractibles par l'éthanol

Nous avons fait une macération de 24 heures à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été mis dans une capsule préalablement pesée et tarée (n) et évaporé à sec. Après refroidissement la capsule a ensuite été pesée (n') et la masse de résidu déduite. La teneur en substances extractibles par l'éthanol est évaluée par la formule (Diallo, 2005) :

$$\text{SEEt \%} = (n - n') \times 100 \div \text{PE}$$

1.5 Détermination de la teneur en matière grasse

Pour extraire l'huile par la méthode Soxhlet, on utilise un solvant non polaire qui est en général de l'hexane et son rôle est de solubiliser la matière grasse, ensuite on fait la séparation de l'hexane et de la matière grasse

Le taux de la matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$\text{MG (\%)} = \frac{\text{P1} - \text{P2}}{\text{ME}} \times 100$$

Dont :

P2 : poids du ballon vide.

P1 : poids du ballon après évaporation.

ME : masse de la prise d'essai.

MG : taux de la matière grasse.

100: pour exprimer le pourcentage.

30 grammes de la poudre des graines sont mélangés avec 150 ml de l'hexane pendant 9 heures à 120°C. Le solvant est évaporé à 40°C par le Rotavapore (BÜCHI).

L'huile récupérée doit être conservée dans un endroit ambré et à température basse.
(Hyun-II Jun et *al.*, 2013)

2. Extractions

La première étape dans la préparation des extraits végétaux est le broyage du matériel végétal, sous cette forme broyée, la plante présentera une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement des extractions.

2.1 Extraction par macération à l'eau

50g de la poudre ont été introduits dans un erlenmeyer et macérés dans 500 ml d'eau distillée, sous agitation mécanique pendant 24 heures à température ambiante (Figure 18). Après filtration sur papier filtre, le filtrat a été lyophilisé (Sanogo et *al.*, 2006).

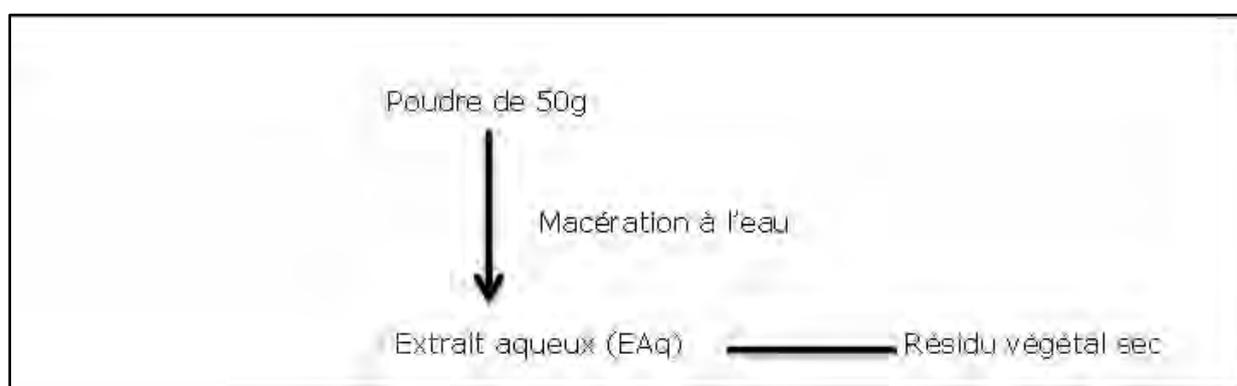


Figure18 : Schéma d'extraction par macération à l'eau.

2.2 Extraction avec les solvants organiques

La méthode d'extraction que nous avons employée est la macération successive par trois solvants de polarité croissante (l'éther de pétrole, le chloroforme et le méthanol) (Diallo et *al.*, 2004). L'extraction par l'éther de pétrole a pour but d'entraîner les graisses ainsi que les substances lipophiles. La deuxième extraction par le chloroforme a été faite pour obtenir un extrait riche en composés moyennement polaires. La dernière extraction a été faite avec le méthanol qui extrait les composés polaires.

250g de poudre ont été extraits avec 750ml d'éther de pétrole et placés sous agitation mécanique pendant 24 heures à température ambiante. Après filtration sur papier, le résidu de l'extraction précédente a été repris par 750ml de chloroforme et laissé sous agitation pendant 24 heures, le résidu est à nouveau extrait par 750ml de méthanol pendant 24 heures dans les mêmes conditions.

Chaque étape d'extraction est refaite trois fois avec renouvellement du solvant.

A la fin de l'extraction, les extraits organiques (EEp, EChI, EMet) ont été concentrés sous vide au rotavapor (BÜCHI) aux températures 37 C° ,40C° et 50C° respectivement. Après la concentration, ces extraits ont été séchés à l'air libre (Figure 19)

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

2.3 Fractionnement de l'extrait méthanolique

Le fractionnement de l'extrait méthanolique s'effectue selon la méthode de Markham (1982) en utilisant une série de solvants à polarité croissante. L'extrait méthanolique est, initialement, mélangé avec l'Acétate d'éthyle (3V/1V), et après décantation, la phase organique est récupérée. Cette étape est refaite plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devienne transparent. L'acétate d'éthyle est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'Acétate d'éthyle (EAc). La phase aqueuse est soumise à un autre fractionnement par le Butanol pour donner, à la fin de l'opération, la fraction du butanol (EBut), en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par l'Acétate d'éthyle. Les extraits sont conservés à - 4°C.

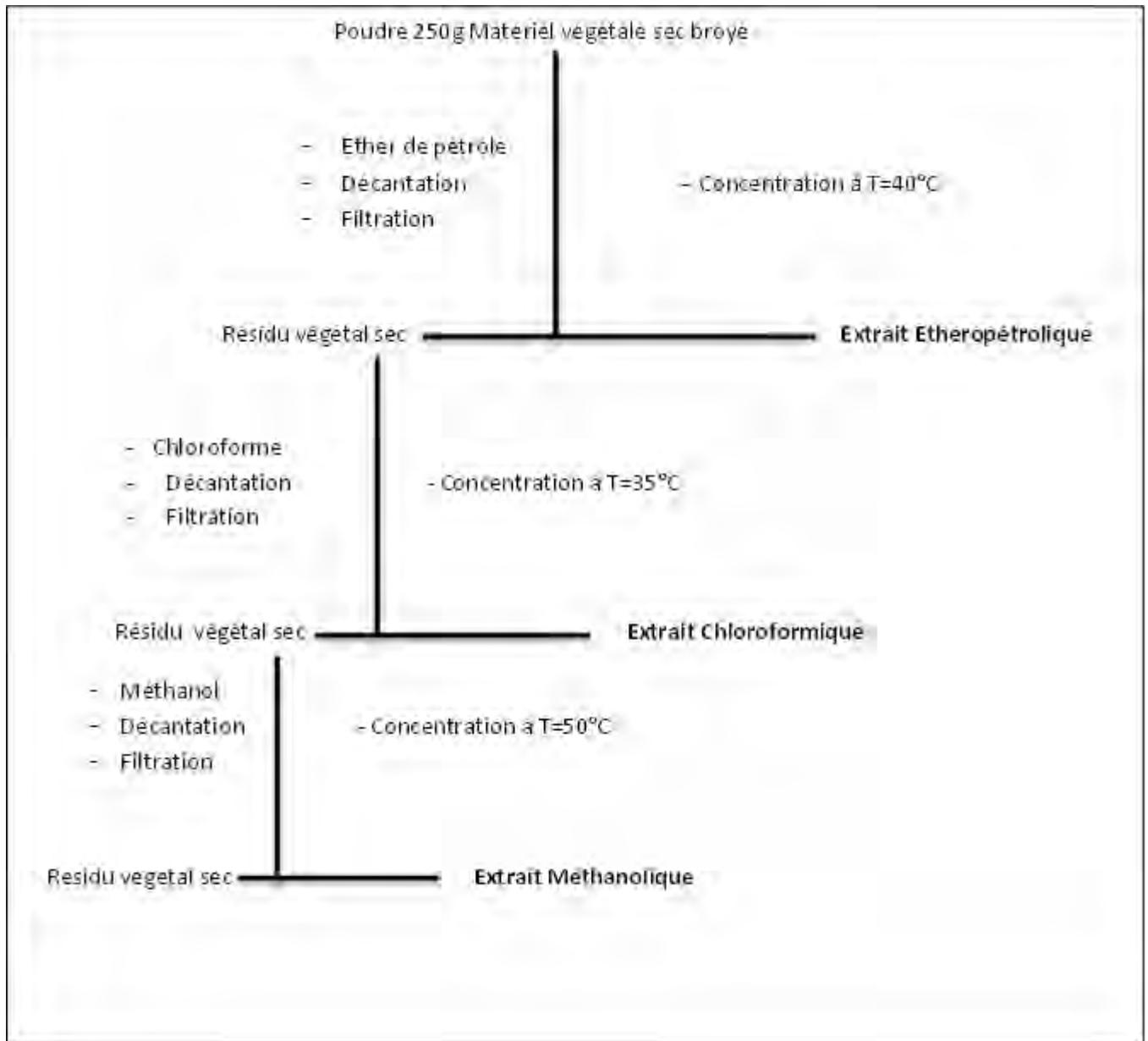


Figure19 : Schéma d'extraction par les solvants organiques.

3. Réactions de caractérisation

Les essais chimiques de caractérisation ont porté sur la recherche dans les différents extraits des principaux groupes chimiques. Ces essais permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique, ces caractérisations ont été faites en utilisant principalement les réactions en tube, les résultats sont classés en :

- Réaction très positive +++
- Réaction positive +
- Réaction négative –

➤ Test des Alcaloïdes

Il est effectué sur des réactions de précipitation avec le révélateur des alcaloïdes : le réactif de Dragendorff (Dohou, 2003).

Dans des tubes à essai nous avons introduit 5 ml de l'extrait ensuite, nous avons ajouté 2 ml d'HCL et 1 ml de réactif de Dragendorff.

En présence d'alcaloïdes, il y a formation d'un précipité rouge ou orange

➤ Test des Flavonoïdes

Le test consiste à ajouter à 1ml d'extrait d'une solution de NaOH, On laisse agir 3 minutes. Une coloration jaune intense implique la présence des flavonoïdes (Karumi et al., 2004).

L'ajout de quelques gouttes d'une solution d'acide diluée permet la persistance de la coloration

➤ Test des Tanins

L'ajout de trichlorure de fer (FeCl_3) à 2% aux tubes à essais avec 2ml d'extrait permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables) et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques (tanins condensés) (Dohou, 2003).

➤ **Test des Coumarines**

La présence de coumarines est révélée après ajout dans les tubes avec 5 ml d'extrait de 0,5ml de NH₄OH à 25% et observation de la fluorescence sous une lampe UV à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté l'ammoniaque indique la présence de coumarines (Rizk, 1982).

➤ **Test des Saponines**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 1 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Le mélange est laissé pendant 15 minutes.

La persistance de mousse d'au moins 1 cm pendant 15 min indique la présence de saponosides. (Dohou, 2003 ; Koffi n'guessan et *al.*, 2009).

➤ **Test des Terpenoïdes**

Ils sont mis en évidence par l'ajout de 2ml de CHCl₃, 1ml d'anhydride acétique et 1 ml d'acide sulfurique concentré aux différents extraits. L'apparition d'une coloration violette indique leur présence. (Koffi n'guessan et *al.*, 2009)

➤ **Test des Stéroïdes**

Dissoudre les extraits dans 1 ml de chloroforme et ajouter 1 ml d'acide sulfurique concentré

Un test positif est révélé par l'apparition d'une couche supérieure en rouge (Trease et Evans, 1978).

➤ **Composés réducteurs**

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (Trease et Evans, 1978 ; Yamini K et *al.*, 2011).

4. Dosage spectrophotométrique

4.1 Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux est effectué par la méthode de phénol / acide sulfurique (Dubois et *al.*, 1956). Cette dernière nécessite une hydrolyse acide qui permet la rupture de toutes les liaisons glucidiques dans le polysaccharide.

Le principe du dosage se base sur la condensation des produits de déshydratation des oses avec un chromogène qui est le phénol. A ce moment- là, il se forme des chromophores de couleur jaune-orange, leur apparition est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 490nm.

La teneur des sucres est exprimée en $\mu\text{g} / \text{ml}$ (convertie en grammes / litre) de α D (+) Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage.

On additionne à 0,5 g d'échantillon, 20 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4); puis on place l'ensemble dans une étuve réglée à 105°C pendant 3 heures ; on transverse la solution dans une fiole de 500ml tout en ajustant le volume par de l'eau distillée jusqu'à 500ml ; on filtre la solution puis on réalise trois dilutions au 1/3.

Dans des tubes, on met 1ml de chaque dilution, ensuite on ajoute dans chaque tube 1ml de phénol à 5 % et 5ml d'acide sulfurique H_2SO_4 à 98 % ; les tubes sont maintenus dans l'étuve pendant 5 minutes à 105°C , puis laissés dans l'obscurité pendant 30 minutes.

Enfin, à l'aide d'un spectrophotomètre, on lit la densité optique à une longueur d'onde de 490 nm.

En parallèle, on trace la courbe d'étalonnage avec de D (+) Glucose.

4.2 Estimation quantitative des polyphénols totaux

La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li et *al.*, 2007). Elle consiste à prendre un volume de 200 μl de l'extrait, un volume de 1,5 ml du réactif Folin Ciocalteu (dilué dix fois) était ajouté. Après 4 mn, un volume de 1,5 ml de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 5% a été versé sur la solution. Les tubes ont été placés à l'obscurité. Après les deux heures, les résultats étaient lus sur spectrophotomètre à 750 nm, la concentration des polyphénols totaux est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-100 $\mu\text{g} / \text{ml}$).

La teneur en polyphénols totaux est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g extrait).

La formule suivante permet le calcul de la teneur en phénols totaux

$$T = C \times \frac{V \times D}{P_s}$$

T : teneur en phénols totaux

C : concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduit de la courbe

V : Volume de l'extrait

D : facteur de dilution

P_s : poids de la matière sèche.

4.3 Estimation quantitative des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (Bahorun et *al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits ; 1ml de chaque extrait (avec dilution convenable) est ajouté à 1ml d'une solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10mn de réaction, l'absorbance est mesurée à 430nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la Rutine (0- 100µg/ml).

La teneur en flavonoïdes est déterminée à partir d'une équation de régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligramme équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg ER/g extrait).

4.4 Dosage des tannins condensés: Proanthocyanidines

Cette méthode de détermination du taux des proanthocyanidines a été proposée par Vermerris et Nicholson en 2006.

La méthode est basée sur le mélange butanol / HCl. 250µl de chaque extrait ont été mélangés avec 2,5 ml d'une solution d'acide de sulfate ferreux (77mg de sulfate d'ammonium ferrique: Fe₂(SO₄)₃ dissous dans 500 ml de (3:2 n-butanol: HCl). Après incubation à 95 ° C pendant 50 minutes, l'absorbance a été mesurée à 530nm.

La teneur en Proanthocyanidine a été calculée selon la formule suivante:

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

Où :

DF : est le facteur de dilution

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

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

Les proanthocyanidines ont été exprimés en mg de cyanidine équivalent / 100g matière sèche.

4.5 Analyse chromatographique par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance est une technique d'analyse et de caractérisation des extraits en composés phénoliques la plus utilisée (Gomez- Caravaca et *al.*, 2006) car elle présente une haute résolution, une reproductibilité élevée, et une durée d'analyse relativement courte (Wollgast et Anklam, 2000). Elle peut être employée pour la séparation, la détermination quantitative, et l'identification des polyphénols. Utilisée généralement en phase inverse, elle comporterait trois points essentiels : la colonne, solvant d'élution et le détecteur (Wollgast et Anklam, 2000 ; Stalikas, 2007).

Cette chromatographie fait intervenir deux variables dans la séparation d'un mélange, soit la phase stationnaire (la colonne), et la phase mobile (le ou les solvants). Les particules de la colonne et les solvants employés vont permettre une séparation qui pourra être optimisée en faisant varier surtout la composition de notre phase mobile. Cette dernière est poussée avec pression (pompe) sur la colonne, entraînant le mélange à séparer, et c'est cette pression qui permet le passage du solvant à travers de très petites particules à une vitesse raisonnable, ce qui permet d'obtenir une haute résolution. (Yost, R.W et *al.*, 1980).

L'immense avantage de la CLHP par rapport à la chromatographie sur couches minces réside dans l'amélioration sensible des paramètres de seuil de détection et de résolution de séparation, ainsi que dans les possibilités d'automatisation du procédé (Ferrari, 2002).

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un HPLC JASCO équipé d'éléments suivants :

- une colonne avec un diamètre interne de 4,6 mm contenant la phase stationnaire apolaire (phase inverse), cette dernière est constituée de silice modifiée chimiquement par greffage de résidus (C-18), ces colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques ;
- un système de pompage, Pompe: Model PU-2089, pour déplacer la phase mobile à haute pression (plusieurs dizaines de bars) ;
- un injecteur : pour introduire l'échantillon, dans le système à haute pression ;
- un détecteur UV-2075;
- un logiciel informatique permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur.

Les mesures ont été réalisées selon la méthode décrite par Hyun-II Jun et *al.*, (2013) à la longueur d'onde 280 nm pour les acides phénoliques et à 325 pour les flavonoïdes. Les éluants ont été dégazés ; les extraits et les standards ont été filtrés sur membrane millipore (0,45 µm) pour éviter d'endommager la colonne et limiter les interférences dues aux impuretés.

Le système d'éluant est celui utilisé par Hyun-II Jun et *al.*, en 2013 et se compose de:
A : 10µl de l'acide formique dans 100ml de l'acétonitrile
B : 10µl de l'acide formique dans 900ml de l'acétonitrile

Tableau 7: Table du gradient d'éluion des extraits en HPLC

Gradient	Instants (min)	A %	B %
	0-2	100%	-
	2-6	90%	10%
	6-31	37%	63%
	31-41	50%	50%
	41-45	100%	-
	45-50	100%	-

Les solutions des standards de flavonoïdes (Rutine et Quercetine) sont préparées en dissolvant 10mg de chaque dans 1ml de méthanol. Alors que les solutions contenant les acides phénoliques (Ac gallique et Ac Ascorbique) sont diluées dans l'ordre de 20 mg/ ml

Les extraits analysés (EEP, EChl, EMet, EAce, EBut et EAq) sont à des concentrations de 20mg/ml.

Après chaque injection le système analytique était rincé 30 minutes avec la phase mobile pour s'assurer de déloger les produits qui auraient pu demeurer sur la colonne. Une ligne de base exempte de pics était la condition préalable à toute injection. Pour toutes les analyses, les solvants utilisés sont de qualité CLHP, le débit est réglé à 1 ml/min, et le volume injecté est égale à 20 μ l. L'identification des produits (Acides phénoliques et les flavonoides) sur les chromatogrammes a été faite par comparaison des temps de rétention avec ceux des standards.

Chapitre 3 : Activités antioxydantes

1. Réduction du fer: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

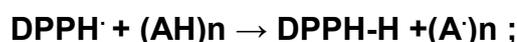
Le protocole expérimental utilisé est celui de Yildirim et *al.*, en 2001 où: 0.5 ml de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 1,25 ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 1.25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000g pendant 10 min. 1,25 ml du surnageant sont ajoutés à 1.25 ml d'eau distillée et 250 μl d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0.1% (Figure 20). La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.



Figure 20: Réaction de réduction du fer (FRAP)

2. Evaluation de l'activité antioxydant par diphényl-picryl-hydrazyl (DPPH)

Le Diphényle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Sanchez-Moreno, 2002). On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényle picryl hydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

Un volume de 1ml de chaque extrait (avec dilution convenable) est incubé (30mn) avec 1ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,1mM). Les absorbances à 517 nm ont été enregistrées (Figure 21).

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour l'Acide Ascorbique pris comme un antioxydant standard. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

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

Dans ce test on définit deux paramètres (Prakash et *al.*, 2007):

- La concentration effective à 50%, **EC50 = IC50/mg de DPPH/ml.**
- Le pouvoir antiradicalaire, **APR = 1/EC50.**

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 à 1mg/ml pour l'EP, l'ECh, l'EMe, l'EAc, l'EBut et l'EAq, et même pour le standard l'Ac Ascorbique.



Figure 21: Activité antioxydante par diphényl-picryl-hydrazyl (DPPH)

3. Evaluation de l'activité antioxydant par le phosphomolybdate

Le test du pouvoir réducteur du Molybdate Phosphate est un essai direct qu'on emploie principalement pour mesurer la puissance des antioxydants non enzymatiques. Il repose sur la réduction des molybdates en Molybdène en présence des extraits en donnant une coloration verte détectable par l'UV à une longueur d'onde de 695nm.

Le test phosphomolybdate (PPM) a été réalisé selon la méthode décrite par Prieto et *al.*, en 1999 qui consiste à introduire dans un tube 0,1ml de l'extrait de la plante mélangé à 1ml d'un réactif composé de H_2SO_4 (0,6 M), de NaH_2PO_4 (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube a été ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 695 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme standard.

La capacité antioxydante est exprimée en mg équivalent Acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/100g MS).

4. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène

Une solution de 20 μ M de peroxyde d'hydrogène est préparée dans le tampon phosphate. Un millilitre (1ml) d'extrait (fraction ou standard) à différentes concentrations dans le méthanol est additionné à 2ml solution PBS (Mohammedi Z, 2012). L'absorbance

est lue après 10min contre un blanc sans peroxyde d'hydrogène. Le pourcentage de piégeage (I%) est calculé par la formule suivante :

$$I (\%) = [(Abs\ contrôle - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100$$

5. Test de piégeage des radicaux d'hydroxyles

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par Türkan Kutlu en 2014 avec quelques modifications. 1ml de chaque extrait de différentes concentrations dans le méthanol est additionné à 1 ml de FeSO₄ (1,5 mM) ; 0,7 ml de H₂O₂ (6 mM) et 0,3 ml de salicylate de sodium (20 mM). Après l'incubation pendant 1 h à 37°C, l'absorbance du mélange réactionnel est lue à 562 nm. La capacité de piégeage de radicaux hydroxyles a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$I (\%) = [(A1 - A2) / A1] \times 100$$

Où :

A1 : L'absorbance de la réaction témoin (contenant tous les réactifs à l'exception de l'extrait)

A2 : L'absorbance de la réaction avec l'extrait.

La **vitamine C** a été utilisée comme contrôle positif.

6. Activité antibactérienne

6.1 Méthode de diffusion (Antibiogramme)

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de raquettes d'*O.f.indica*, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant les disques stériles en cellulose appelée antibiogramme (Somaie et *al.*, 2013).

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, et en

fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Ce travail est effectué au laboratoire de bactériologie de l'institut des vétérinaires, université de constantine1.

Les souches bactériennes choisies sont: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. (Tableau 8)

Tableau 8 : Souches bactériennes

Etat frais	Souches	Gram
Bacille	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	Négatif
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	
Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	Positif

ATCC : American type culture collection ;

➤ Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit :

Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

➤ Stérilisation du matériel

L'eau distillée, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

➤ Préparation des dilutions d'extraits d'*O.f.indica*

Les extraits d'*O.f.indica* ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 5mg/ml.

➤ Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes misent en culture dans le bouillant nutritif et incubées à 37°C pendant 48h, leurs opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

➤ Ensemencement et dépôt des disques

1ml de chaque suspension de culture bactérienne est étalé à la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'un râteau.

Les disques imprégnés des extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant les témoins positifs (Ac Ascorbique et la Rutine) ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques imprégnés de DMSO (témoin négatif).

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

L'expérience est répétée trois fois pour chaque extrait et pour chaque espèce bactérienne.

➤ Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un pied à coulisse.

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits. (Ponce et al. 2003)

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm

6.2 Détermination des CMI

➤ Méthode de dilutions en milieu liquide

La détermination de la CMI est réalisée par la méthode de dilution en milieu liquide. Des dilutions de demi ont été effectuées pour les différents extraits dans le DMSO, allant de 200mg/ml jusqu'à 10mg/ml. (Oussou et *al.* 2004).

➤ Ensemencement et incubation

Nous avons introduit aseptiquement 100µl des différentes concentrations des extraits dans des tubes à essais contenant 2850µl de bouillon nutritif, puis d'une manière stérile nous avons ajouté 50µl de microorganismes dans chaque tube, nous avons obtenus à la fin une série de tubes contenant différentes concentrations des extraits. Après une bonne agitation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.

En parallèle nous avons préparé pour chaque microorganisme un tube control ou témoin, contenant que le milieu de culture et le microorganisme concerné, pour s'assurer de la bonne croissance de nos souches.

➤ Lecture

Elle se fait par deux méthodes :

- En comparant la présence ou l'absence de turbidité dans les différents tubes
- Utilisation d'un indicateur coloré : le rouge de phénol à 1%.
 - Le tube témoin donne une coloration jaune indiquant la présence d'une culture bactérienne.
 - Une coloration rouge indique l'absence de la culture bactérienne.

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus faible concentration d'extrait ne donnant pas de croissance visible, autrement dit : la plus faible concentration d'extrait donnant une coloration rouge avec l'indicateur coloré.

Chapitre 4 : Etude Pharmacologique et Toxicologique

La plupart des activités de ce chapitre sont réalisées sur un des deux types d'animaux :

➤ Les rats

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

L'élevage a été effectué dans le laboratoire de la Pharmacologie et Toxicologie à l'Université de Constantine¹, avec un cycle photopériodique naturel. La température dans le laboratoire est de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Les animaux sont logés, dans des cages d'aluminium chacun porte 4 animaux, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. La litière utilisée est la sciure, renouvelée trois fois par semaine pour assurer le bon état hygiénique des animaux.

➤ Les lapins

Des lapins mâles, âgés de 2 à 3 mois et pesant 1,5 à 1,9 Kg, ont été utilisés dans cette étude. Ces animaux ont été fournis par une ferme d'élevage de la ville de Constantine. Ils sont gardés à l'animalerie de l'Université pendant au moins une semaine avant l'expérience, dans des cages individuelles. La nourriture et l'eau ont été fournis ad libitum et le cycle lumière-obscurité était de 12 heures, avec une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de 60 %. Toutes les procédures expérimentales adoptées étaient en conformité avec les directives internationales pour la protection des animaux.

1. Etude toxicologique

1.1 Etude de la toxicité aigüe d'*Opuntia ficus indica*

1.1.1 L'administration par voie orale (per Os)

Les rats mâles *Wistar albinos* adultes, pesant entre 140 et 250 g, ont été répartis en cinq groupes expérimentaux renfermant chacun 06 rats :

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

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

Après avoir soumis les animaux à jeun pendant 24 heures, les différentes solutions sont administrées par voie orale, au volume de 1 ml. La dose administrée est exprimée en mg/kg de poids corporel. L'administration du produit est réalisée par gavage à l'aide d'une sonde rigide à bout olivaire (Figure 22).

Pour ce test, des lots de rats reçoivent per os des doses croissantes du produit à tester. Cette procédure permet de déterminer la plus forte des faibles doses qui donne 0% de mortalité et la plus faible des fortes doses qui donne 100 % de mortalité. Des dilutions sont effectuées entre ces deux valeurs extrêmes afin de déterminer la dose létale 50 %.

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

Pendant cette période d'observation, on note le nombre de morts ainsi que les troubles symptomatiques.

Après dissection, les organes (rein, rate, foie, poumons et cœur) sont observés macroscopiquement in situ, prélevés, débarrassés de l'excès de graisse, séchés avec du papier filtre et pesés.

Des pièces de rein, rate, foie, poumon et cœur sont conservés dans une solution de formol à 10% pour des études anatomopathologiques.

Des échantillons de sang sont prélevés pour réaliser les différentes analyses hématologiques et biochimiques.



Figure 22: L'administration orale de l'extrait

1.1.2 L'Administration par voie intra péritonéale (IP)

Pour permettre une meilleure biodisponibilité du principe actif, le test de toxicité aigüe a été réalisé par injection intra péritonéale de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* à un groupe de 18 rats albinos de poids allant de 180 à 230g, élevés à l'animalerie du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'institut des vétérinaires, Constantine1. Les animaux ont été répartis en 3 lots, de six rats chacun et mis à jeun pendant 24 heures. Ces groupes ont reçu respectivement par voie intra péritonéale des solutions de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* aux doses respectives de 1000, 2000 et 3000mg/kg de poids corporel (l'eau distillée pour le lot témoin).

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

L'observation des animaux s'est poursuivie pendant 14 jours à la recherche d'éventuels signes de toxicité retardée. Le dénombrement de morts ainsi que les troubles symptomatiques sont notés jusqu'au 14^{ème} jour après l'administration des extraits (Nene BI et *al.*, 2008)

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

La DL50 est déterminée par la méthode graphique de Miller et Tainter (1944)

La valeur de la DL50 permet de classer les extraits étudiés sur l'échelle de toxicité proposée en 1980 par Hodge et Sterner chez le rat ou la souris (Hodge et Sterner, 1943):

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



Figure 23: L'administration de l'extrait par voie intra péritonéale (IP)

1.2 Evaluation de la toxicité chronique de l'extrait d'*O. f. indica* chez le lapin Néozélandais.

Cette étude a été réalisée sur douze lapins albinos mâles. Après une acclimatation de 7 jours dans les conditions de laboratoire, les lapins ont été divisés en deux groupes de six chacun.

Les animaux du premier groupe n'ont pas été traités et sont considérés comme témoins.

Pour les animaux du deuxième groupe, ils ont reçu l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica*, une fois par jour, 7 jours par semaine, à la dose de 100mg/kg de poids corporel, par voie orale pendant 12 semaines consécutives (Choi H.G et *al.*, 1998; Khafagy E et *al.*, 2007).

Les lapins ont été évalué cliniquement chaque jour, l'observation a porté sur : appétit, changement de comportement, des signes de douleur...

Chaque semaine, des échantillons de sang de la veine marginale de l'oreille ont été recueillis dans des tubes contenant de l'héparine comme anticoagulant. Aussi les mesures de poids corporel ont été prises.

A l'issue de cette période expérimentale, les lapins ont été sacrifiés, les différents organes ont été recueillis et pesés: foie, rate, poumons, cœur et reins.

Des pièces de reins et des foies sont conservées dans le formol à 10% pour des études anatomopathologiques.

➤ **Dosages biochimiques**

Des échantillons de sang ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min, puis le plasma a été séparé. Les paramètres sanguins sélectionnés ont été réalisés, par un analyseur automatique (Architecte CI 8200) dans le laboratoire du centre hospitalier de Constantine, et inclus Aspartate amino transférase (ASAT), Alanine amino transférase (ALAT), la Créatinine sanguine, l'Urée, la Glycémie (GLU), Protéines sérique totales (TP), l'Albumine (ALB) et le Cholestérol total.

1.3 Test de toxicité sur les larves d'*Artemia salina*

Les *Artemia* sont très répandus dans les eaux dont le taux de salinité est supérieur à la normale et sont rejetés sur les côtes par le vent et les vagues. Ils se présentent sous forme de petits grains apparemment inactifs qui ont la capacité d'entrer en période de latence.

Notons qu'il est possible d'élever des *Artemia* dans un milieu artificiel.

Au niveau commercial, la présentation d'*Artemia* se fait sous la forme de cystes déshydratés sous vide en boîte de conserve pour faciliter le stockage. (Geneviève B et *al.*, 1994)

➤ **Systematique**

Embranchement : Crustacés

Classe : Arthropodes

Sous classe : Branchiopodes

Famille : *Artemidae*

Ordre : *Anostracés*

Genre : *Artémia*

Espèce : *Artémia salina*

➤ **Préparation des *Artemia***

Ces *Artemia* vont servir à la réalisation du test. Pour cela, il faut préparer 2g de cystes, ils sont mis à éclore dans une cuve contient 1 litre d'eau de mer à 70‰ sous fort bullage (Figure 24)

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

➤ **Paramètres de culture:**

- La température: il est préférable de la maintenir entre 25 et 30°C; si ce paramètre n'est pas respecté le métabolisme du cyste est stoppé de façon irréversible.

- La salinité: favorable entre 20 et 25 g/l.

- L'aération: permet d'homogénéiser le milieu et de favoriser l'éclosion.

- L'éclairage: une lumière artificielle continue favorise un meilleur rendement. (Geneviève B. et *al.*, 1994)

➤ **Eclosion des *nauplii***

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



Figure 24 : Culture des larves d'*Artemia salina*

➤ **Préparation des extraits**

Les six extraits (EEp, EChI, EMet, EAc et EBut) de raquettes d'*Opuntia ficus indica* sont pesés avec précision et dissout dans l'eau de mer afin de construire les différentes concentrations.

Chaque extrait est testé à quatre concentrations différentes: 100, 250, 500 et 1000 μ g/ml. Pour la réalisation de ce test des plaques de 24 puits ont été utilisées. La solution d'extrait à tester est ajoutée dans les puits contenant les larves. A l'aide d'une pipette Pasteur dix larves sont transférées dans chaque puits. Le volume est ensuite ajusté à 3ml avec de l'eau de mer à 70% (Figure 25).

Une série de puits de témoins positifs est réalisée aux concentrations suivantes: 100, 250, 500 et 1000 μ g/ml avec le sulfate de cuivre.

Des puits de témoins négatifs réalisés avec l'eau de mer.

Les tests sont ensuite laissés 24 heures sous éclairage.

Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution ainsi que pour le témoin.

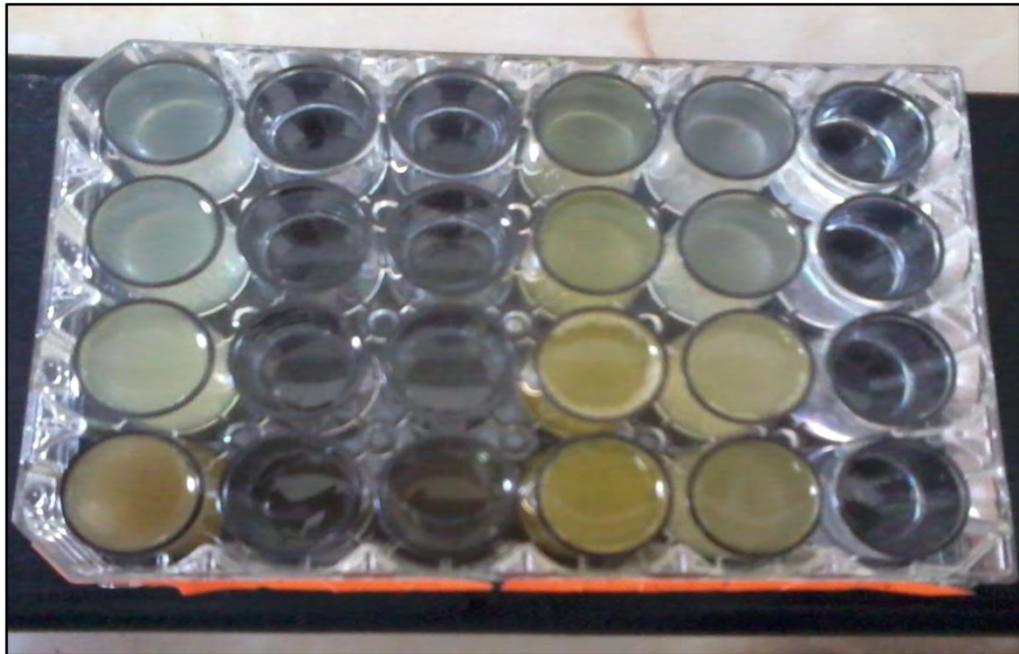


Figure 25 : Plaque de 24 puits contenant les larves et les différents extraits étudiés.

➤ **Lecture des résultats**

Après 24 heures, le nombre de larves survivantes est compté dans chaque puits et la mortalité calculée à chaque concentration (Figure 26 ; Tableau 9).



Figure 26 : Les larves sous la loupe microscopique

On calcule le pourcentage de mortalité chez les témoins en utilisant la formule :

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

%m : Pourcentage de mortalité

NLm : Nombre de larves mortes

NLtotal : Nombre de larves total

NNy : Nombre de nymphes

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

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

% Mortalité corrigée =

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

Si la mortalité chez les témoins excède 20 %, le test est invalide et doit être recommencé.

A partir des résultats, la Concentration Létale 50% (CL50) reflétant la toxicité des produits, est estimée :

Tableau 9 : Estimation de la toxicité.

CL50	Toxicité
CL50 ≥ 1000µg/ml	-
1000µg/ml > CL50 ≥ 500µg/ml	+
500µg/ml > CL50 ≥ 250µg/ml	++
250µg/ml > CL50 ≥ 100µg/ml	+++

2. L'Activité hypo et antihyper-glycémiant de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica*

2.1 Essais chez des lapins normoglycémiques

Les lapins étaient à jeun depuis 16 heures, puis répartis en deux groupes.

- **Groupe 1 (Traité, 6 lapins)** : Administration par voie orale de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* à la quantité de 200mg/Kg de poids corporel.
- **Groupe 2 (Témoin, 4 lapins)** : administration par voie orale de 2 ml/kg de P.C de l'eau distillée

Des prélèvements de sang ont été effectués par ponction dans la veine marginale de l'oreille, avant gavage puis à la première, deuxième et troisième heure après l'administration de l'extrait. (Abdel-barry. JA et *al.*, 1997 ; Ndiaye. M, et *al.*, 2008)

2.2 Essais chez des lapins en hyperglycémie temporaire

Des lapins ont été répartis en deux groupes de six après un jeun de 16 heures.

- **Groupe 1 (Témoin)** : ce groupe a reçu de l'eau distillée (2ml/Kg de P.C per Os)
- **Groupe 2 (Traité)** : Administration de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* (200mg/Kg de P.C per Os)

Au temps T-60mn, un prélèvement de sang est effectué. Les lapins ensuite gavés avec l'eau distillée et de l'extrait aqueux d'*O. ficus indica* suivant les groupes précités.

Au T0, un prélèvement de sang est effectué, les lapins sont ensuite gavés avec une solution de glucose, la dose est de 4g de glucose/kg de P.C, par voie orale.

Des prélèvements sont ensuite effectués chaque heure pendant 3 heures.

La détermination de la glycémie se fait avec un Glucomètre (Réf. Accu Chek Performa). La goutte de sang ponctionnée est déposée sur la zone active d'une bandelette. La lecture de la glycémie se fait automatiquement.

Le résultat est exprimé en mg/100 ml de sang. (Abdel-barry J.A et *al.*, 1997 ; Lawson et *al.*, 1997 ; Ndiaye M et *al.*, 2008).

3. Etude de l'effet hémolytique des extraits d'*Opuntia ficus indica* *in vitro*

Ce test d'effet hémolytique de la plante étudiée est réalisé selon la méthode de Guo- Xiang et Zai-Qun en 2008 avec quelques modifications.

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

Les différents extraits (EEt, EChl, EMet, EAce, EBut et EAq) de raquettes d'*Opuntia ficus indica* sont dilués dans du tampon phosphate salin pour obtenir les différentes concentrations 20, 10, 5 et 1mg/ml.

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

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

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes démarches expérimentales. Il est composé de la suspension érythrocytaire et de la solution tampon de PBS, en absence d'extrait.

Un tube d'hémolyse totale contient la suspension érythrocytaire et Saponine.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale selon la formule suivante :

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

4. Détermination de l'activité antalgique

4.1 Test de torsion

Les expériences ont été réalisées sur un modèle de douleur induit par l'acide acétique chez des rats mis à jeun 15 heures avant l'expérimentation. L'injection intra-péritonéale d'acide acétique à 1% chez le rat provoque un syndrome douloureux qui se manifeste par des contorsions caractéristiques avec étirement des pattes postérieures et de la musculature dorso-ventrale.

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

Le gavage per os a été fait à l'aide d'une sonde gastrique et chaque lot reçoit :

- **Lot témoin** : l'eau distillée à raison de 1 ml/Kg de poids corporel.
- **Lot 1** : la solution aqueuse de l'extrait d'*Opuntia ficus indica*, à la dose de 1000mg/kg.
- **Lot 2** : la solution aqueuse de l'extrait d'*Opuntia ficus indica*, à la dose de 2000mg/kg.
- **Lot 3** : la solution aqueuse de l'extrait d'*Opuntia ficus indica*, à la dose de 3000mg/kg.
- **Lot 4 (référence)** : un analgésique utilisé en thérapeutique l'Aspirine à la dose de 100 mg/ kg.

Une heure après le gavage, une solution d'acide acétique à 1%, est injectée par voie intra-péritonéale aux rats et le nombre de contorsions (NC) pour chaque rat a été compté, sur une durée de 15 minutes. Le pourcentage d'inhibition (PI) de la douleur a été obtenu à partir de la formule suivante :

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

Avec :

NCTe : nombre moyen des contorsions dans le lot témoin.

NCTr : nombre moyen des contorsions dans le lot traité.

Les moyennes de contorsions dans les groupes traités ont été comparées au groupe témoin avec le test de Dunette/Tukey (Sy *et al.*, 2009). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative et $n = 6$ représentent le nombre de rats dans chaque groupe.

4.2 Test de la plaque chauffante

Nous avons administré l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* aux doses de 1000, 2000 et 3000 mg/kg de P.C pour les lots traités, de l'Asprine à la dose de 100 mg/kg de P.C pour le lot référence et l'eau distillée pour les animaux témoins, une heure avant de déposer le rat sur la plaque chauffante réglée à 55°C.

Le chronomètre est déclenché dès que les pattes de rat touchent la plaque. Les seules réponses à considérer chez le rat sont le léchage des pattes, les sauts réalisés par le rat sur la plaque et ses réactions à vouloir quitter la plaque chauffante.

D'autres types de comportements ne sont pas pris en compte.

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

Nous avons ensuite comparé les temps de réaction des animaux traités à ceux des rats ayant reçu uniquement de l'eau distillée. (Vaz *et al.*, 1996 ; Le Bars *et al.*, 2001).

4.3 Test de Tail-flick

Une heure après l'administration orale de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* aux doses de 1000, 2000 et 3000 mg/kg de P.C pour les lots traités, de l'Aspirine à la dose de 100 mg/kg de P.C pour le lot de référence et de l'eau distillée pour les animaux témoins, la queue de chaque animal est placée dans de l'eau chaude maintenue à 55°C. Le temps que met l'animal pour retirer sa queue est mesuré et considéré comme temps de réaction. (Al-Sobarry M.*et al.*, 2013).

5. Effet des extraits d'*Opuntia ficus indica* sur la cicatrisation chez le lapin

5.1 Essais sur les plaies de brûlures thermiques

➤ brûlures effectuées par un métal chauffé dans l'eau bouillante

La procédure utilisée dans cette étude a été décrite par Hamdi Pacha et *al.*, en 2002.

Au jour zéro, les lapins ont été anesthésiés par 50mg/kg de chlorhydrate de kétamine après une tranquillisation par voie intramusculaire, avec 5 mg/kg de diazépam. Les poils du dos de l'animal ont été rasés avec un rasoir électrique. Ensuite, quatre brûlures ont été faites de part et d'autre de la colonne dorsolombaire de chaque lapin. Une masselotte de 200 g ayant 3 cm de diamètre a été maintenue pendant 3 minutes à l'eau bouillante (100°C) et immédiatement séchée et déposée sur la peau du lapin pendant 15 secondes sans exercer aucune force. Après refroidissement de la pièce métallique ont été réalisées les autres brûlures de la même façon.

Immédiatement après la réalisation des brûlures, les substances testées ont été appliquées sur les plaies comme suit:

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

Plaie 2: a reçu l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* à la dose de 250mg

Plaie 3: a reçu l'extrait méthanolique d'*Opuntia ficus indica* à la dose de 250mg

Le traitement des plaies a été rotatif, de façon que chaque produit a été appliqué dans la région dorsale chez trois lapins et au niveau des plaies lombaires pour le même nombre de lapin. (Je Kwan Jang et *al.*, 2013).

Tous les produits ont été appliqués par voie topique une fois par jour jusqu'à ce que l'épithélialisation complète ait eu lieu. La taille des plaies a été tracée sur un papier transparent chaque trois jour, puis la surface de la plaie a été évaluée. Cette dernière a ensuite été employée pour calculer le pourcentage de contraction de la plaie, en prenant la taille initiale de la plaie, comme 100%, en utilisant l'équation suivante (Srivastava et Durgaprasad, 2008) :

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

➤ **brûlures effectuées par la plaque chauffante**

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

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

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

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

Degré de cicatrisation de la plaie (%) =

$$1 - \frac{\text{Zone de la plaie sur la correspondante jour (cm}^2\text{) Surface}}{\text{Plaie au jour zéro (cm}^2\text{)}} \times 100$$

5.2 Essais sur les plaies d'excision

Les propriétés cicatrisantes sont testées sur des plaies d'excision sur le dos des lapins comme réalisées par de nombreux auteurs. Les lapins sont anesthésiés par 50mg/kg de chlorhydrate de kétamine après une tranquillisation par voie intramusculaire, avec 5 mg/kg de diazépam sur le lieu de l'excision. Un lambeau de peau d'environ 17mm est excisé (Bensegueni. A et *al.*, 2007). Les lapins sont répartis en 4 lots.

Lot 1: les plaies de ce lot ne recevront aucun traitement et serviront de témoin négatif.

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

Lot 3: traité par l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* à la dose de 250mg.

Lot 4: traité par l'extrait méthanolique d'*Opuntia ficus indica* à la dose de 250mg.

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

Une étude planimétrique est mise en œuvre pour évaluer l'activité cicatrisante des extraits d'*Opuntia ficus indica*. Les diamètres des plaies d'excision des différents lots sont mesurés tous les trois jours pendant neuf jours. Les mesures relevées sont mentionnées jusqu'au neuvième jour, ensuite les moyennes des surfaces et les écart-types sont calculés.

6. Evaluation de l'effet hépato-protecteur de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica*.

Cette étude consiste à évaluer l'effet hépato-protecteur de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* chez le rat Wistar intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (CCL4)

L'ensemble des rats ont été divisés en quatre groupes de six rats chacun et gardés dans les mêmes conditions (cités précédemment). Les groupes traités ont été gavés à l'aide d'une sonde gastrique pendant 15 jours.

- **Lot 1 : témoin**, qui reçoit quotidiennement par voie orale d'eau distillée pendant 15 jours.
- **Lot 2 : CCL4 + EAq1**, les rats reçoivent chaque jour par voie orale 100mg/kg d'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* et le toxique, tétra chlorure de carbone (CCL4), chaque 3 jour à dose de 1,5 ml/kg pendant 15 jours.
- **Lot 3 : CCL4 + EAq2**, les rats reçoivent chaque jour par voie orale 250mg/kg d'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* et le toxique, tétra chlorure de carbone(CCL4), chaque 3 jour à dose de 1,5 ml/kg pendant 15 jours.
- **Lot 4 : CCL4**, les rats reçoivent chaque 3 jours par voie orale le toxique, tétra chlorure de carbone(CCL4) à dose de 1,5 ml/kg pendant 15 jours.

L'administration du toxique, tétra chlorure de carbone (CCL4) s'effectue par voie orale 60 min après le gavage de l'extrait (Narayan et *al.*, 2012) .

➤ **Modifications cliniques et prise de poids**

Les rats ont été évalués cliniquement, le premier jour toutes les 60 minutes pendant les 8 premières heures, et tous les jours, une seule fois à la même heure pour une durée de 15 jours

Pendant cette période d'observation on note le nombre de mortalité ainsi que les troubles symptomatologiques observés, afin de déceler les effets de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica*

Ce suivi des signes cliniques inclut l'observation de l'évolution de poids chez les rats des différents groupes expérimentaux tout au long de la période d'expérience.

Le poids corporel des rats est mesuré tous les 7 jours pendant les 2 semaines.

➤ **Le sérum et le test de la fonction hépatique**

Après les différents traitements, les rats ont été anesthésiés le 16^{ème} jour avec l'éther. Les échantillons du sang ont été prélevés par ponction cardiaque dans des tubes stériles héparines puis centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min pour récupérer le sérum.

Le dosage des paramètres sanguins est effectué au niveau du laboratoire de biochimie de Constantine, et inclus l'ASAT, L'ALAT, la créatinine (CREA), le glucose (GLU), et de l'Urée.

Chapitre 5 : Potentiel allélopathique du figuier de barbarie « *Opuntia ficus-indica*. » Sur la germination et la croissance des végétaux.

1. La récolte des végétaux

➤ **Raquettes de figuier de barbarie**

Les raquettes du figuier de barbarie variété épineuse ont été prélevées à partir d'un champ situé à Constantine (Algérie). Ces échantillons ont été mis dans des sachets en plastique et placés immédiatement dans une glacière. Ramenés au laboratoire, ces échantillons ont été ensuite rincés et séchés avec du papier buvard et mis dans un réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

➤ **Graines d'*Allium cepa***

Les graines ont été récoltées à partir de la région de Sétif. Sont conservés dans un endroit à l'ombre et bien aéré.

➤ **Graines de *phaseolus vulgaris***

Sont proviennent d'un entrepôt de stockage dans la région de Beni-saf. Ces graines ont été conservées dans un endroit bien fermé avec des couvercles absorbant de l'humidité

2. Préparation des extraits

Une quantité de 500 g des échantillons de raquettes du figuier de barbarie a été lavé avec de l'eau potable, puis avec une solution de l'hypochlorite de sodium à 10% et nettoyée avec de l'eau distillée. La préparation de la poudre est décrite au niveau de chapitre 1.

Différentes concentrations de l'extrait aqueux ont été préparées par décoction (1%, 5%, 10%, 25% et 50%)

Les extraits ainsi obtenus ont été conservés à -4°C jusqu'à leur utilisation.

3. Test d'inhibition de la germination et la croissance d'*Allium cepa* et *phaseolus vulgaris*

Les graines d'*Allium* et *Phaseolus* ont été placées dans des boîtes de pétrie (6 graines/boîte) contenant de papier filtre humide par les extraits à différentes concentrations à raison de 2ml d'extrait /concentration et à température ambiante. Le témoin a été préparé avec l'eau distillée. Trois répétitions ont été utilisées pour chaque concentration de l'extrait / plante.

➤ Observations et mesures

Les observations et les mesures ont été portées sur la cinétique et le taux de germination des graines et la croissance des plantules d'*Allium* et *phaseolus*. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon les formules suivantes (Rsaissi N et al., 2013):

$$\text{➤ \% d'inhibition de la germination} = ((G-g) / G) \times 100$$

Avec :

G: Germination dans le témoin (eau distillée).

g: germination dans les différents extraits.

$$\text{➤ \% d'inhibition de la croissance} = ((H-h) / H) \times 100$$

Avec :

H: hauteur des tiges ou longueur des racines dans le témoin (eau distillée);

h: hauteur des tiges ou longueur des racines dans les différents extraits

L'évaluation de l'effet allélopathique de différents traitements (extraits du figuier de barbarie) sur l'*Allium* et *Phaseolus* est jugée selon l'échelle de la commission des Essais Biologiques de la Société Française de Phytiairie et de Phytopharmacie:

- 95 à 100% : très bon effet
- 80 à 95% : bon effet
- 60 à 80% : effet moyen
- 40 à 60% : effet faible
- < à 40% : effet sans intérêt pratique.

❖ Analyse statistique

Chaque expérience réalisée dans cette étude est répétée trois fois, les valeurs sont représentées par la moyenne \pm écart type. La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification, utilisant le logiciel EXCELSTAT2014.

Si la valeur de :

- $P > 0,05$: la différence n'est pas significative (Ns)
- $p \leq 0,05$: la différence est significative (*)
- $P < 0,01$: la différence est très significative (**)
- $P < 0,001$: la différence est hautement significative (***)
- $P < 0,0001$: la différence es très hautement significative (****)

Résultats
et
Discussion

Partie III : Résultats et Discussion

Chapitre 1 : Etude cytogénétique

1. Etude du caryotype

L'observation des plaques métaphasiques colorées au carmin acétique nous a permis de déterminer le nombre chromosomique de l'espèce qui est de 88 chromosomes ($2n = 88$). Ce nombre est conforme au nombre de chromosomes de base du genre *Opuntia* qui est $x = 11$ (Donald J et *al.*, 1971). *Opuntia ficus indica* est donc octoploïde ; la polyploïdie est un phénomène très observé dans le genre *Opuntia*, (Majure L.C et *al.*, 2012) avec des niveaux allant de diploïde, tétraploïde, hexaploïde, pentaploïde et octoploïde. (Bulbul Bandyopadhyay et Archana sharm, 2000 ; Segura S et *al.*, 2007).

Les mesures des chromosomes sur cinq plaques métaphasiques choisies, a permis la constitution du caryotype d'*Opuntia ficus indica*.

D'après la figure 27 et le tableau 10 des données morphométriques, on constate que le caryotype de l'espèce est constitué de 44 paires chromosomiques :

-28 paires métacentriques

-1 paires subtélocentriques

-15 paires submétacentriques

Les paires II, VI, XI et XVI portent des satellites.

Ce qui donne la formule suivante :

$$2n = 8x = 88 = 56m + 30sm + 2st. \text{ (dont 4 sat)}$$

Les satellites ont été observés sur les paires II, VI, XI et XVI portés sur les bras courts des chromosomes.

La présence des satellites est confirmée chez d'autres espèces du genre *Opuntia* qu'ils ne soient pas localisés au même endroit ou sur les mêmes paires chromosomiques. (Bulbul Bandyopadhyay et Archana sharm, 2000 ; Segura S. et *al.*, 2007)

La longueur totale moyenne des chromosomes est comprise entre 11,695µm et 33,12µm et les longueurs relatives entre 1,261µm et 3,571µm. La moyenne des longueurs totales de l'ensemble des chromosomes est de 21,077 µm, elle nous permet une appréciation de la taille du génome qui est importante.

Le caryogramme et l'idiogramme montrent une variation concernant la taille des chromosomes ainsi que leurs formes. La valeur du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la plus courte ($R = 2,831$) et la valeur d'indice d'asymétrie ($las \% = 61,804$). La présence de trois types chromosomiques différents (métacentrique, submétacentrique, et subtélocentrique.), la différence de leurs tailles, et la présence de satellites sur quatre paires, font que le caryotype de *Opuntia ficus indica* est asymétrique.

Selon Stebbins (1971) la polyploïdie ainsi que l'asymétrie du caryotype, sont les principales sources d'adaptation, d'évolution et de spéciation chez les végétaux. Ce sont des critères que nous retrouvons chez *Opuntia ficus indica*. Cette espèce a évolué comme les autres espèces de son genre (Segura S et al., 2007).

Tableau10 : Données morphométriques d'*Opuntia ficus indica*

Paires	BC (µm)	BL (µm)	LT (µm)	LTR	r	d	Ic %	Tc
01	14,955 ± 0,175	18,165 ± 0,275	33,12	3,571	1,214	3,21	82,328	m
02	7,95 ± 0,67	22,355 ± 0,475	30,305	3,267	2,811	14,405	35,562	sm-sat
03	8,17 ± 0,11	21,345 ± 0,245	29,515	3,182	2,612	13,175	38,275	sm
04	14,225 ± 0,905	14,95 ± 1,17	29,175	3,145	1,050	0,725	95,150	M
05	11,2 ± 0,2	17,725 ± 1,105	28,925	3,118	1,582	6,525	63,187	m
06	8,08 ± 0,37	19,615 ± 0,505	27,695	2,986	2,427	11,535	41,192	sm-sat
07	10,95 ± 0,1	16,19 ± 1,3	27,14	2,926	1,478	5,24	67,634	m
08	13,425 ± 0,105	13,65 ± 0,13	27,075	2,919	1,016	0,225	98,351	M
09	11,39 ± 1,34	15,21 ± 1,07	26,6	2,868	1,335	3,82	74,884	m
10	11,295 ± 0,745	15,095 ± 1,165	26,39	2,845	1,336	3,8	74,826	m
11	11,05 ± 0,02	14,815 ± 0,185	25,865	2,788	1,340	3,765	74,586	m-sat
12	7,47 ± 0,19	17,96 ± 2,15	25,43	2,741	2,404	10,49	41,592	sm
13	10,24 ± 0,19	15,12 ± 1,91	25,36	2,734	1,476	4,88	67,724	m
14	10,565 ± 1,135	14,3 ± 0,7	24,865	2,681	1,353	3,735	73,881	m
15	7,89 ± 0,11	16,57 ± 0,55	24,46	2,637	2,100	8,68	47,616	sm
16	8,45 ± 0,05	15,885 ± 0,455	24,335	2,623	1,879	7,435	53,194	sm-sat
17	9,6 ± 0,6	14,56 ± 2,56	24,16	2,605	1,516	4,96	65,934	m
18	7,605 ± 0,105	16,22 ± 0,4	23,825	2,568	2,132	8,615	46,886	sm
19	5,5 ± 1,38	18,15 ± 1,09	23,65	2,550	3,3	12,65	30,303	St
20	6,82 ± 1,43	16,445 ± 1,215	23,265	2,508	2,411	9,625	41,471	sm
21	6,84 ± 0,24	16,005 ± 1,275	22,845	2,463	2,339	9,165	42,736	sm
22	7,7 ± 0,3	14,72 ± 0,93	22,42	2,417	1,911	7,02	52,309	sm

23	8,83 ± 1,02	12,515 ± 2,515	21,345	2,301	1,417	3,685	70,555	m
24	7,34 ± 1,26	13,15 ± 0,78	20,49	2,209	1,791	5,81	55,817	m
25	8,09 ± 3,09	11,85 ± 0,15	19,94	2,150	1,464	3,76	68,270	m
26	7,565 ± 0,495	11,6 ± 1,4	19,165	2,066	1,533	4,035	65,215	m
27	6,655 ± 0,235	12,145 ± 1,155	18,8	2,027	1,824	5,49	54,796	sm
28	6,705 ± 0,875	11,515 ± 0,525	18,22	1,964	1,717	4,81	58,228	sm
29	7,45 ± 0,05	9,83 ± 0,11	17,28	1,863	1,319	2,38	75,788	sm
30	7,015 ± 0,305	10,015 ± 2,065	17,03	1,836	1,427	3	70,044	sm
31	6,32 ± 0,123	10,57 ± 0,2	16,89	1,821	1,672	4,25	59,791	sm
32	6,195 ± 0,125	10,26 ± 0,18	16,455	1,774	1,656	4,065	60,380	m
33	6,82 ± 1,43	8,725 ± 0,275	15,545	1,676	1,279	1,905	78,166	m
34	7,08 ± 0,22	8,16 ± 0,36	15,24	1,643	1,152	1,08	86,764	m
35	5,935 ± 0,465	9,235 ± 0,615	15,17	1,635	1,556	3,3	64,266	m
36	6,92 ± 0,14	8,025 ± 0,965	14,945	1,611	1,159	1,105	86,230	m
37	6,225 ± 0,835	7,92 ± 0,3	14,145	1,525	1,272	1,695	78,598	m
38	5,53 ± 1,53	8,36 ± 2,08	13,89	1,497	1,511	2,83	66,148	m
39	6 ± 0,22	7,46 ± 1,24	13,46	1,451	1,243	1,46	80,428	m
40	5,03 ± 0,03	8,39 ± 0,21	13,42	1,447	1,667	3,36	59,952	m
41	5,25 ± 0,25	8,065 ± 1,135	13,315	1,435	1,536	2,815	65,096	m
42	5,665 ± 0,165	6,765 ± 0,705	12,43	1,340	1,194	1,1	83,739	m
43	5,55 ± 0,95	6,59 ± 1,01	12,14	1,308	1,187	1,04	84,218	m
44	4,695 ± 0,695	7 ± 0,11	11,695	1,261	1,490	2,305	67,071	m
Σ	354,235	573,195	927,43					

R= 2,831 ; IAS % = 61,804%

BL : bras long, **BC**: bras court, **LT**: longueur totale, **LTR** : longueur totale relative, **r**: BL/BC, **d**: BL-BC, **Ic**: indice centromérique, **TC**: type chromosomique, **Ias**: indice d'asymétrie, **R** : rapport entre la longueur de la paire la plus longue et la plus courte.

Figure 27: Caryotype de l'espèce *Opuntia ficus indica*

A : plaque métaphasique

B : Caryogramme

C : Idiogramme

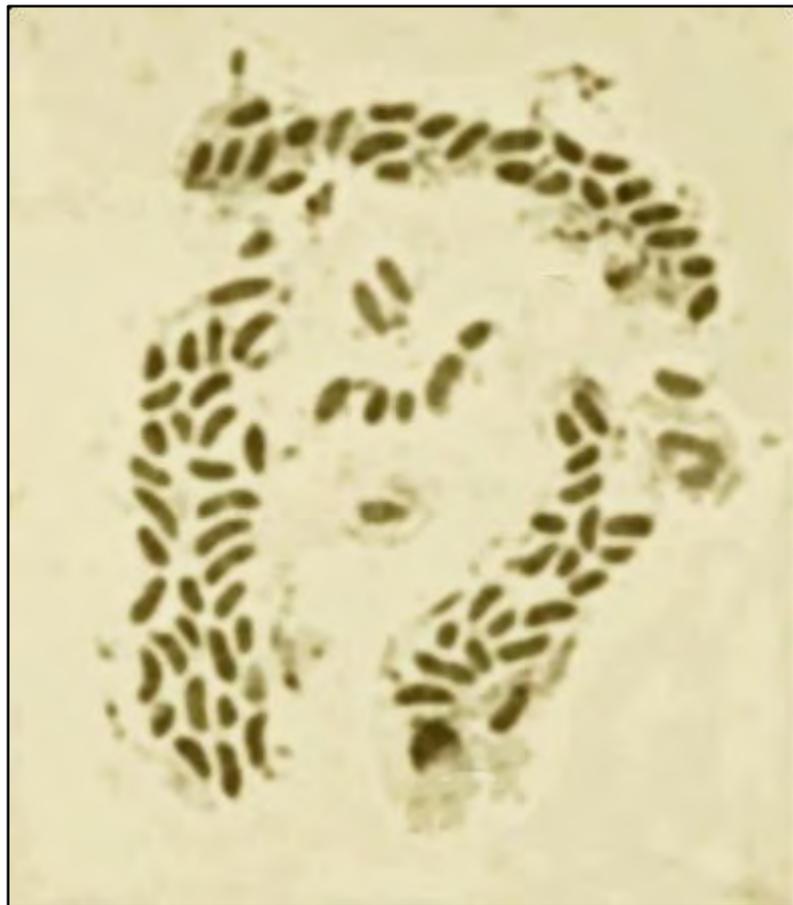


Figure 27-A : Plaque métaphasique

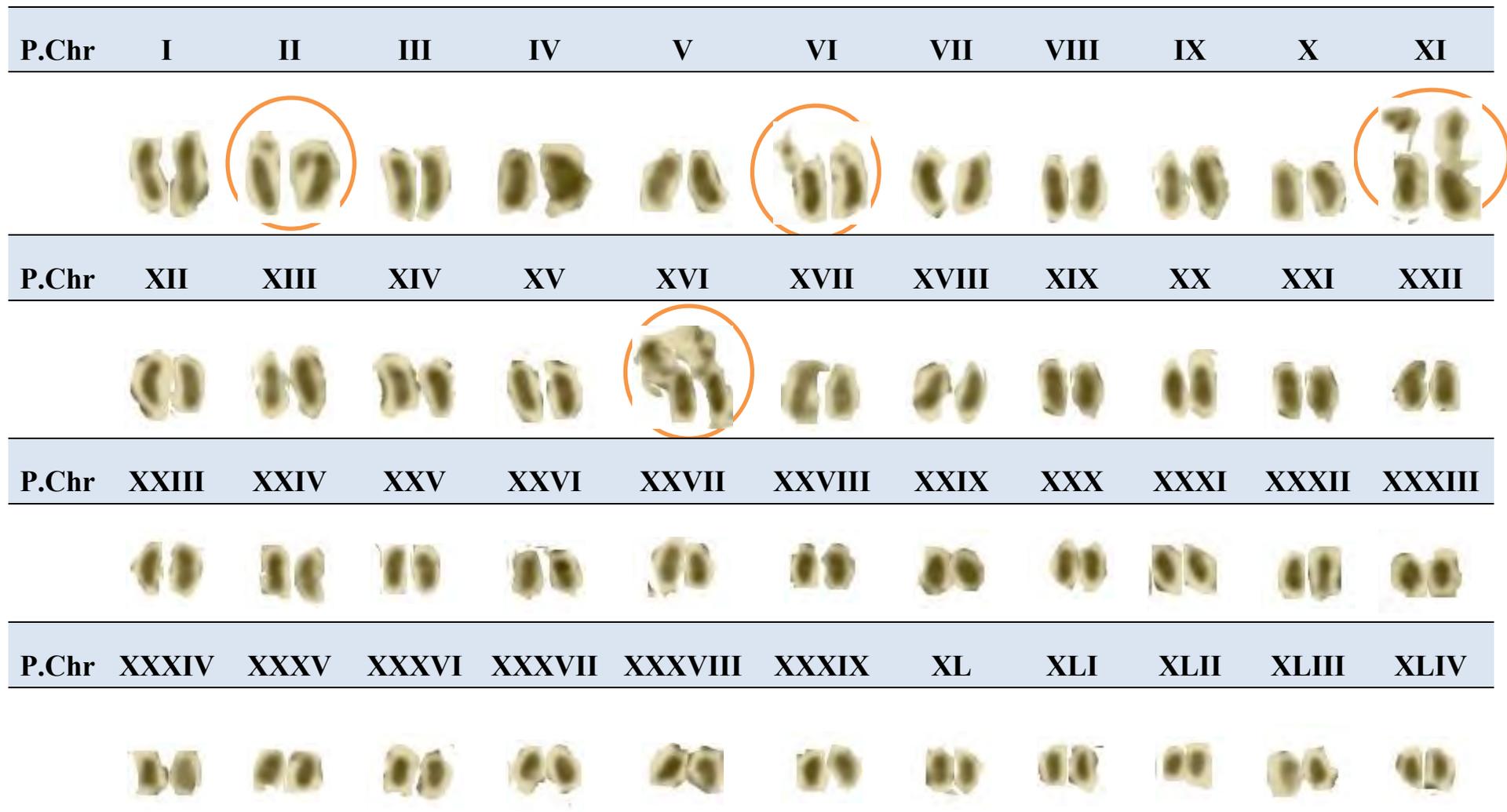


Figure 27-B: Caryogramme

 : Paires chromosomiques portants des satellites

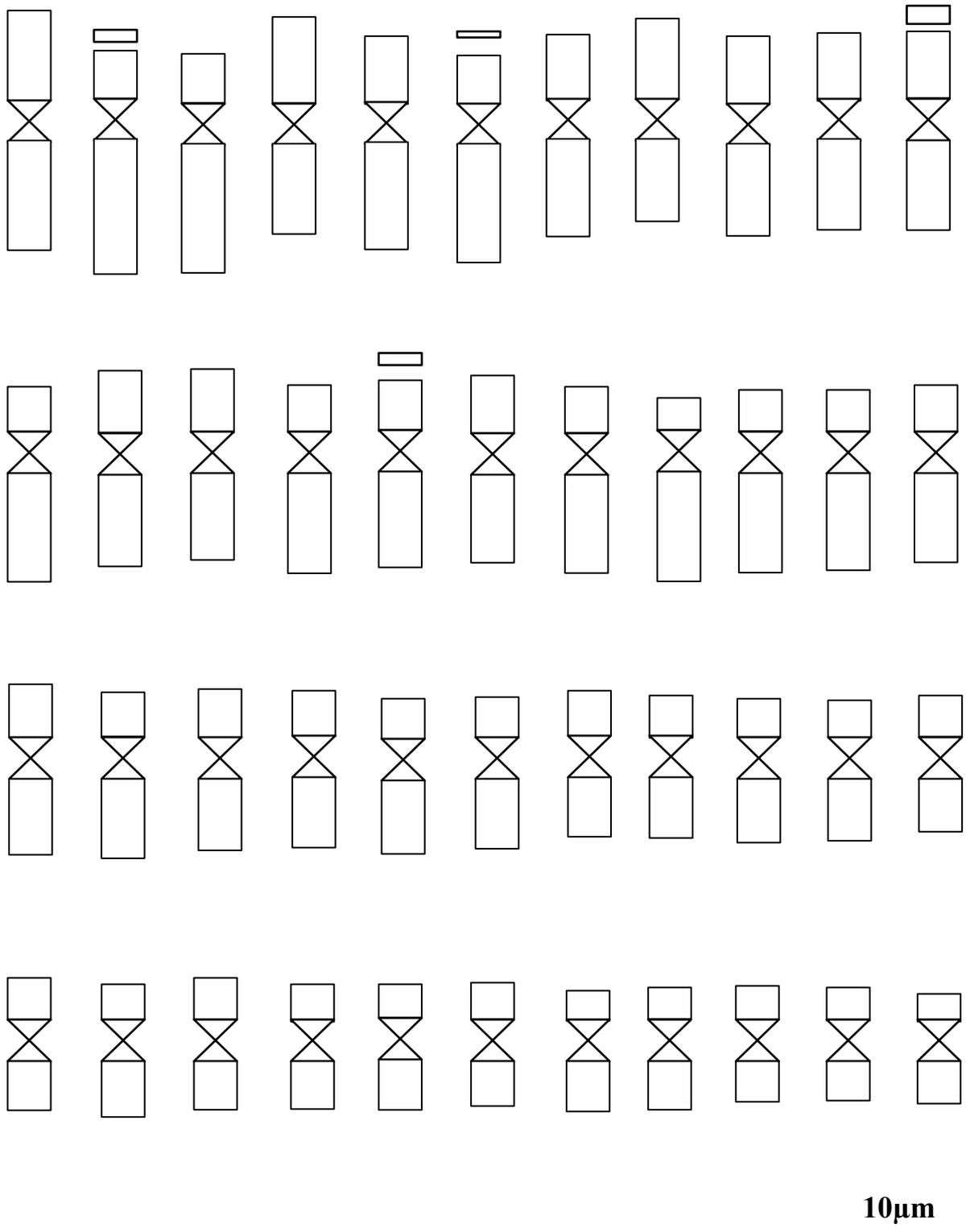


Figure 27-C: Idiogramme

2. Coloration aux nitrates d'argent

La technique de coloration aux nitrates d'argent (AgNO_3) a permis de mettre en évidence le nombre de nucléoles dans les cellules métaphasiques et révèle l'activité des gènes ribosomiques. Sur 50 différentes cellules observées on a obtenu les résultats résumés dans le tableau suivant :

Tableau 11: Détermination du nombre de nucléoles par cellule chez l'espèce *Opuntia ficus indica*

Espèce	Nombre de cellules	1 nucléole	2 nucléoles	3 nucléoles	4 nucléoles
<i>O. ficus indica</i>	50	43	4	2	1

La coloration aux nitrates d'argents est une méthode de coloration qui fait marquer les protéines ribosomiques à l'intérieure des noyaux interphasique et cela reflète l'activité des sites NORs dans la cellule.

Au même endroit où se trouvent les NORs sont groupés des protéines acides hautement argyrophiliques qui se fixent aux nitrates d'argents et se colorent rapidement ce qui rend la localisation des NORs sur le noyau interphasique rapide et facile. Ces protéines sont appelés les protéines « AgNORs ». (Derenzini, 2000)

Le tableau indique que le nombre de nucléoles varie de 1 à 4 pour toutes les cellules observées avec une majorité de un nucléole par noyau (Figure 28).

L'instabilité dans le nombre et la forme des nucléoles pourrait être due à la fusion de certains d'entre eux (Silyak-Yakovlev, 2002). Selon Sumner (1994) lorsqu'un site NORs est actif au maximum deux nucléoles sont présents dans un noyau. Derenzini (2000) affirme qu'il n'y a pas de relation numérique entre les NOR observés à la métaphase et ceux du noyau interphasique.

La constriction secondaire peut jouer le rôle d'organisateur nucléolaire c'est-à-dire qu'il contribue lors de la télophase à la reconstitution d'un nucléole qui restera visible pendant toute l'interphase (Gorenflot et al., 1980).

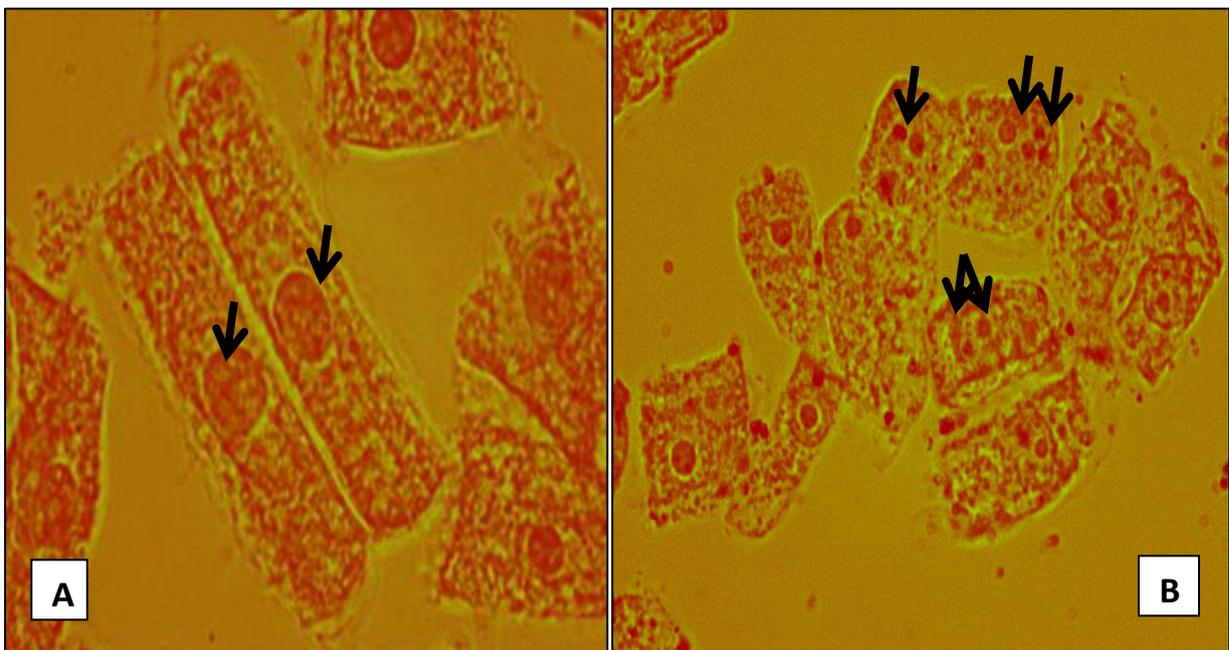


Figure 28 : Nucléoles colorés aux nitrates d'argent

A : cellules avec 1 nucléole

B : cellules avec 2, 3 et 4 nucléoles

Chapitre 2 : screening phytochimique

1. Détermination de la teneur en eau, en cendres totales et en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol

Tableau 12 : Teneur en eau, en cendres totales, en matière grasse et en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol.

Paramètres	Teneur (%) Moyenne ± Ecart type
Eau	95 ± 0,1
Matière sèche	5 ± 0,1
Cendres totales	28 ± 1,414
Substances extractibles par l'eau	54.18± 0,62
Substances extractibles par l'éthanol	10.30± 1,231
Matière grasse	6.12± 0,536

MS % = 100- H%

MS % = 5%

MO% = $\frac{M1- M2}{PE} \times 100$

MO% = 72%

Cendres % =100- MO %.

Cendres % = 28%

Les raquettes d'*Opuntia ficus indica* renferment un taux d'humidité de 95%, une valeur proche à celle rapportée par Nefzaoui et *al.*, (1995). L'*Opuntia* peut être utile dans la résolution du problème de l'abreuvement du bétail dans les zones arides.

Nefzaoui et Ben Salem en 1998, indiquent que le contenu élevé de l'eau présent dans les tissus de l'*Opuntia*, représente une source valable de liquide pour les animaux. Chez les moutons nourris suivant un régime qui contient environ 300 g de Ms d'*Opuntia*, la consommation en eau de la part des animaux est pratiquement nulle.

L'essai des cendres totales permet d'informer sur la teneur en minéraux, ces derniers n'étant pas transformés en substances volatiles à haute température, contrairement aux matières organiques. La teneur en cendres totales a été évaluée à 28%, elle représente la fraction minérale de raquettes d'*Opuntia ficus indica*, cependant elle est assez élevée par rapport à celle trouvée par Nefzaoui et *al.* en 1995, soit une valeur de 20 % de matière sèche. Cette variation est probablement due à plusieurs facteurs à savoir la composition du sol, facteurs climatiques et même l'origine géographique.

Le taux des substances extractibles par l'eau est supérieur à celui de l'éthanol (54.18% versus 10.30 %)

2. Extractions

La préparation des extraits à partir des raquettes d'*Opuntia ficus indica* a été effectuée selon la méthode de Diallo et *al.*, (2004) ; Gilani et *al.*, (2001) et Markham *al.*, (1982) avec quelques modifications.

Cette extraction a été effectuée en deux grandes étapes, la première est une extraction par une série de solvants à polarité croissante pour obtenir initialement l'EEp, EChI et l'extrait brut contenant les polyphénols totaux. La deuxième étape de fractionnement a été réalisée par l'acétate d'éthyle et le butanol permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction (Markham, 1982). De ce fait, six différents extraits ont été obtenus successivement: l'extrait brut (EMe), l'extrait d'Ether de pétrole (EEp), l'extrait du chloroforme (ECh), l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc) et l'extrait de Butanol (EBut). L'extrait aqueux (EAq) a été obtenu par une macération dans de l'eau distillée. La couleur, la Masse ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids de broyat sont représentés dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau13 : Masse, rendement et couleur des extraits obtenus.

Extraits	Masse (g)	Rendement% Par rapport au poids du broyat	Couleur
EEp	0,467± 0,156	0,187 ± 0,146	Verdâtre (Vert clair)
ECh	2,054 ± 0,096	0,821 ± 0,167	Vert foncé
EMe	5,901 ± 0,145	2,360 ± 0,103	Vert foncé
EAc	6,217 ± 0,043	2,487 ± 0,068	Orange
EBut	1,196 ± 0,159	0,478 ± 0,121	Vert foncé
Eaq	22,917 ± 0,067	9,166 ± 0,089	Marron

Le rendement de différents extraits organiques EEP, ECh, EMe, EAc et EBut sont $0,187 \pm 0,146$; $0,821 \pm 0,167$; $2,360 \pm 0,103$; $2,487 \pm 0,068$ et $0,478 \pm 0,121\%$ respectivement. Ce résultat est proche de celui trouvé par Bari et *al.*, (2012) qui ont utilisé le même protocole d'extraction sur les raquettes d'*Opuntia Monacantha*. L'extrait aqueux a donné un rendement de $9,166 \pm 0,089 \%$.

La différence de rendement entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre.

Les extraits polaires (EMet et EAq) ont donné les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits apolaires (EEP et ECh) ; cela peut s'expliquer par le fait que l'EEP et ECh sont des solvants organiques apolaires très volatils et juste utilisés pour dégraisser les extraits des plantes.

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

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

Afin d'utiliser les extraits pour des essais pharmacologiques et toxicologiques, la conservation de l'état bioactif des molécules extraites semble importante. L'épuisement

complet du solvant s'avère nécessaire. La présence des traces des solvants dans les extraits peut entraîner des effets secondaires indésirables. De ce fait, l'effet positif ou curatif de la substance pharmacologique peut être masqué par l'action du solvant.

3. Réactions de caractérisations

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur les différents extraits contenant des substances naturelles, ont donné les résultats que nous présentons dans le tableau ci-dessous.

Tableau 14 : Résultats des tests phytochimiques de différents extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica*

Famille chimique	Résultats					
	EEp	ECh	EMet	EAc	EBut	EAq
Flavonoïdes	+	+	+	+++	+	+++
Tannins	+/-	++	+	++	+++	++
Coumarines	-	+	-	-	+	+
Térpenoïdes	+	++	-	-	-	-
Stéroïdes	-	+	++	++	+	+++
Alcaloïdes	-	-	++	+	+	-
Saponine	+	+++	+	++	+	+
Composés réducteurs	-	-	+	++	-	+++

Nous constatons que :

Les flavonoïdes existent dans les quatre extraits (EMet, EAc, EBut et EAq) et sont en quantités plus importantes dans l'extrait aqueux et d'acétate d'éthyle par rapport aux autres extraits.

Les tanins sont présents avec des quantités plus importantes dans l'extrait butanolique et l'extrait aqueux par rapport aux autres extraits. Leur présence est confirmée par la réaction de trichlorure de fer.

Les coumarines sont importantes dans l'extrait chloroformique, butanolique et aqueux de la plante.

Nous avons remarqué que les alcaloïdes sont présents seulement au niveau de l'extrait méthanolique avec une quantité importante.

Les stérols sont plus importants que les triterpènes dans les extraits : EMet, EAc et EAq et inversement dans les extraits EEp et EChl.

Les indices de mousses indiquent que l'intensité des saponosides est plus importante dans l'extrait chloroformique comparativement parlant aux autres extraits.

Enfin, nous avons noté la présence des composés réducteurs avec une quantité importante dans l'extrait aqueux par rapport aux extraits méthanolique et acétate d'éthyle, chez les autres extraits ces composés sont absents ou rares.

De façon général, les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux de Yéwègnon et *al.*, en 2013 ; Bari et *al.*, en 2012 sur *Opuntia*.

4. Dosage spectrophotométrique

4.1 Dosage de sucre

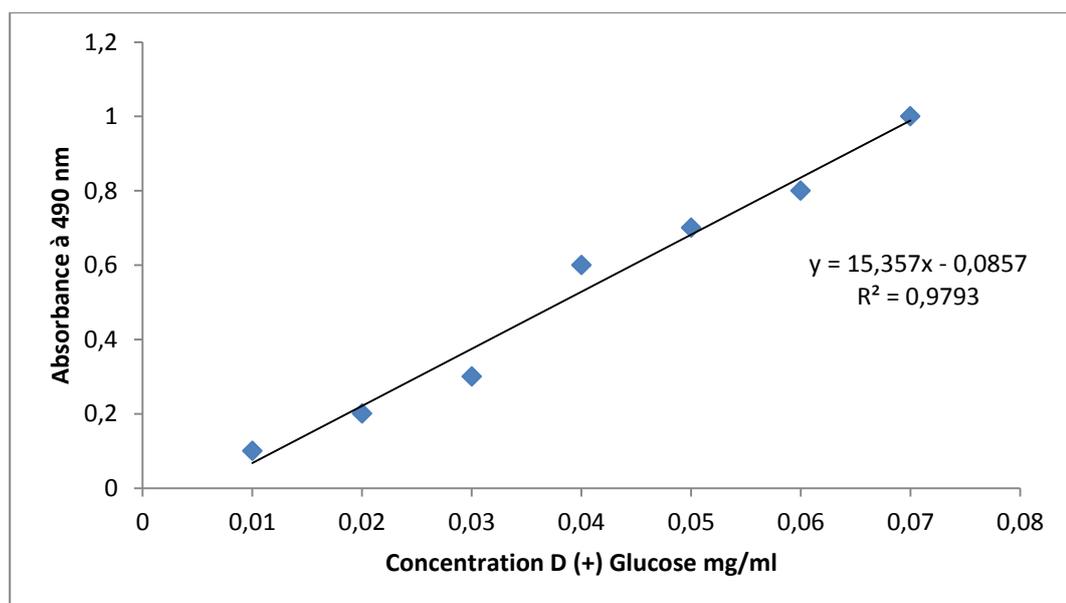


Figure 29: Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux

Les résultats montrent que la teneur en sucre totaux chez les raquettes d'*Opuntia ficus indica* est égale à 14,57%.

Les raquettes d'*Opuntia ficus indica* sont riches en sucres ce qui lui explique son utilisation comme aliment de bétail.

Nos résultats concernant la teneur de raquettes en sucre s'accordent parfaitement avec la littérature, ainsi les études effectuées par Hadj Sadok T. et al., en 2008 ont montré que les jeunes cladodes inermes d'*Opuntia ficus indica* sont également riches en sucres totaux avec une teneur de 1,66 à 8,79% MS.

Les travaux effectués en 2014 avec Hadj Sadok T. et al., indiquent la présence de sucres totaux dans le jus de raquettes d'*O.f.indica* de stade 2 et 3 avec une teneur égale à $11,71 \pm 0,5$ g/l.

4.2 Estimation quantitative des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, en équivalent d'Acide gallique, des extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica* a été estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Pour cela, une courbe d'étalonnage a été tracée avec un extrait d'Ac Gallique à des concentrations allant de 0 à 100 µg/ml ; des mesures de la densité optique pour chaque extrait ont été réalisées à 750 nm. Les quantités de polyphénols correspondantes ont été rapportées en équivalent d'un milligramme de l'étalon utilisé et déterminées par l'équation $y=ax + b$.

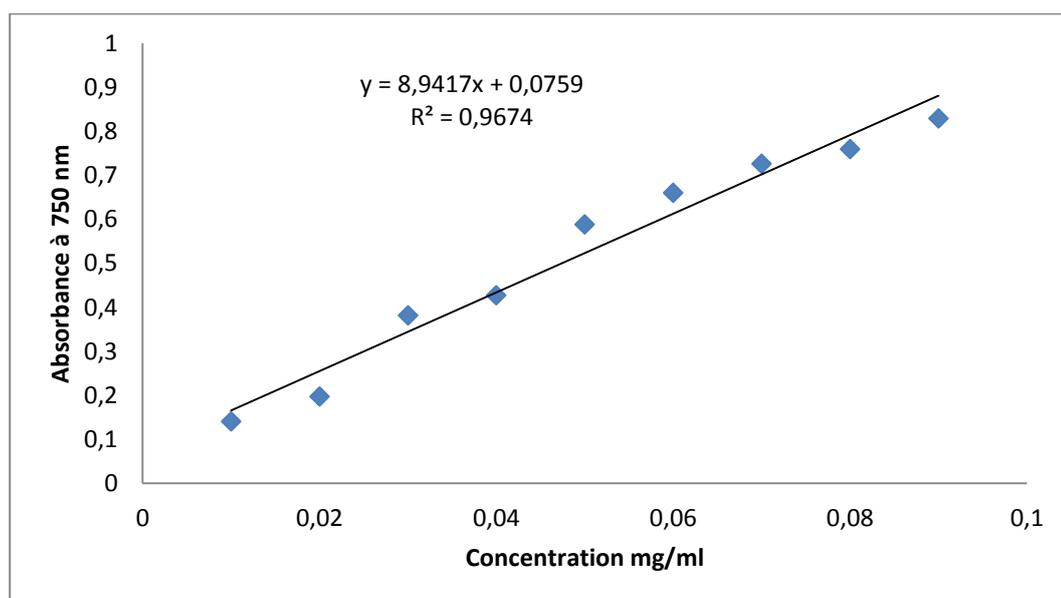


Figure 30 : Droite d'étalonnage de l'Acide gallique

Pour les six extraits de la plante étudiée *Opuntia ficus indica* nous avons remarqué une variabilité des teneurs en phénols totaux (Figure 31). La teneur la plus élevée est constatée dans l'extrait d'Acétate d'éthyle, elle est de l'ordre de $318 \pm 0,57$ mg GAE/g d'extrait suivi par l'extrait butanolique avec une teneur de $234,96 \pm 0,78$ mg GAE/g d'extrait, puis les extraits Méthanolique, Aqueux, Ether de pétrole et Chloroformique avec des teneurs égales à $46 \pm 0,61$; $35,2 \pm 0,64$; $20,1 \pm 0,32$; et $15,4 \pm 0,83$ mg GAE/g d'extrait respectivement.

Statistiquement la différence entre les teneurs en polyphénols en fonction des extraits est très hautement significative ($p < 0,0001$).

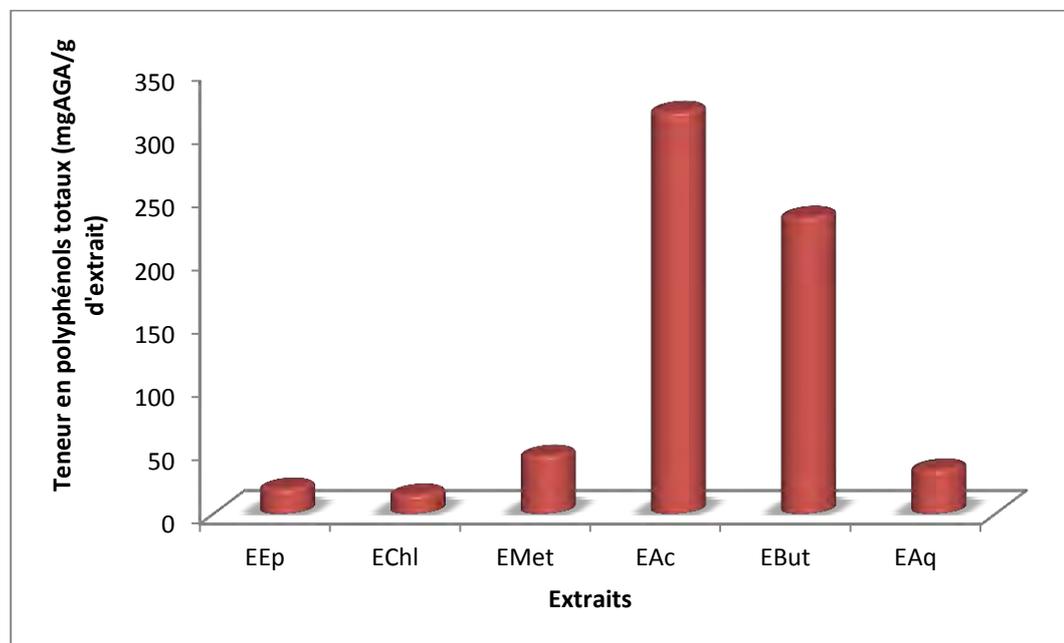


Figure 31 : Teneur en polyphénols totaux de différents extraits d'*O.f.indica*

Les travaux conduits par Mi-Na Cha et *al.*, (2013) et Hyun-II Jun et *al.*, (2013) sur les raquettes d'*Opuntia* confirment nos résultats en indiquant que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche en polyphénols totaux.

Il apparaît de notre travail que la grande majorité des polyphénols ne sont pas hydrosolubles. Par conséquent, pour obtenir des fractions riches en polyphénols, il est préférable d'employer des mélanges du solvant organique approprié avec de l'eau.

L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols. Cette augmentation est peut être due à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses. Elle pourrait également être due à l'augmentation de la basicité et de l'ionisation des polyphénols dans telles solutions. La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base.

Les résultats que nous avons obtenus sont supérieurs à ceux de Sudha G et *al.*, (2011) ; Bari et *al.*, (2012) ; Mi-Na Cha et *al.*, (2013) et Hyun-II Jun et *al.*, (2013). Cette différence observée dans les différentes études peut s'expliquer par la provenance géographique, le cultivar, la variété et surtout le degré de maturité et la durée de stockage ce qui a été prouvé par les travaux de Hadj Sadok T et *al.*, (2013), réalisés sur les raquettes d'*Opuntia* à différents stade de développement.

Le figuier de barbarie étant riche en polyphénols, elle a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs notamment celui de Jacques Couderc en 1997, qui ont trouvé que les polyphénols d'*Opuntia ficus indica* réduisaient le taux de glucose dans le sang, abaissent le taux du mauvais cholestérol, ce sont des calmants et défatigants naturels, exercent une action sédative dans des affections telles que l'angine de poitrine, les spasmes cardiaques, les maux de tête et d'estomac.

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines. (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca et *al.*, 2006).

Le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane et *al.*, 2007). Le dosage par ce réactif donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha et *al.*, 2007).

4.3 Estimation quantitative des Flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par Bahorun et al., (1996). La Rutine considérée comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes des différents extraits de la plante qui est exprimée en mg équivalent de la Rutine (ER) par gramme d'extrait. (Figure 32).

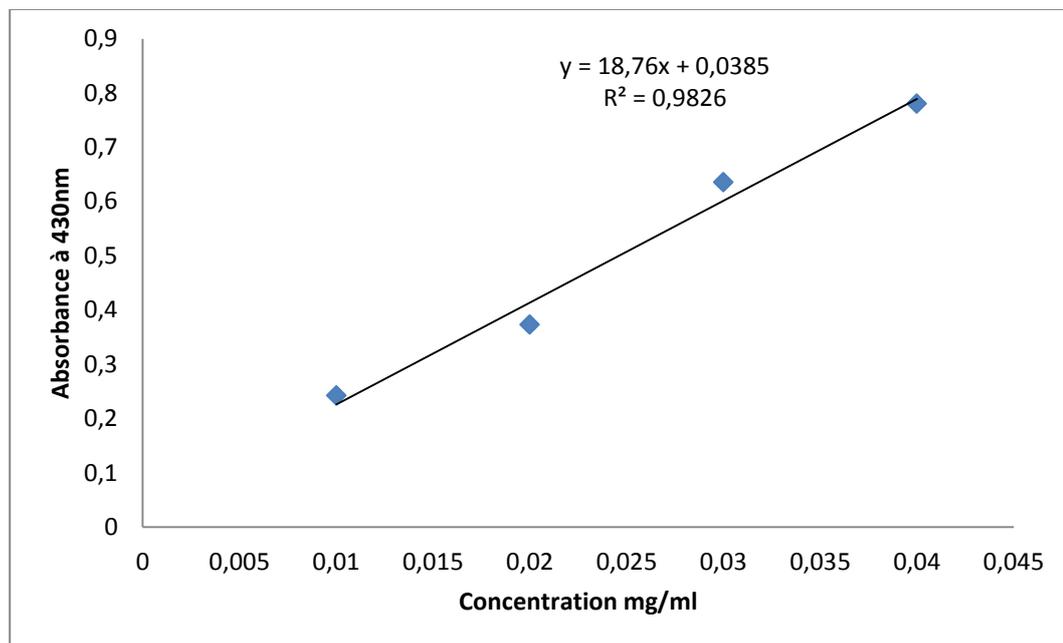


Figure 32 : Droite d'étalonnage de la Rutine

Les teneurs en flavonoïdes de différents extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica* étudiés sont illustrées dans la figure 33.

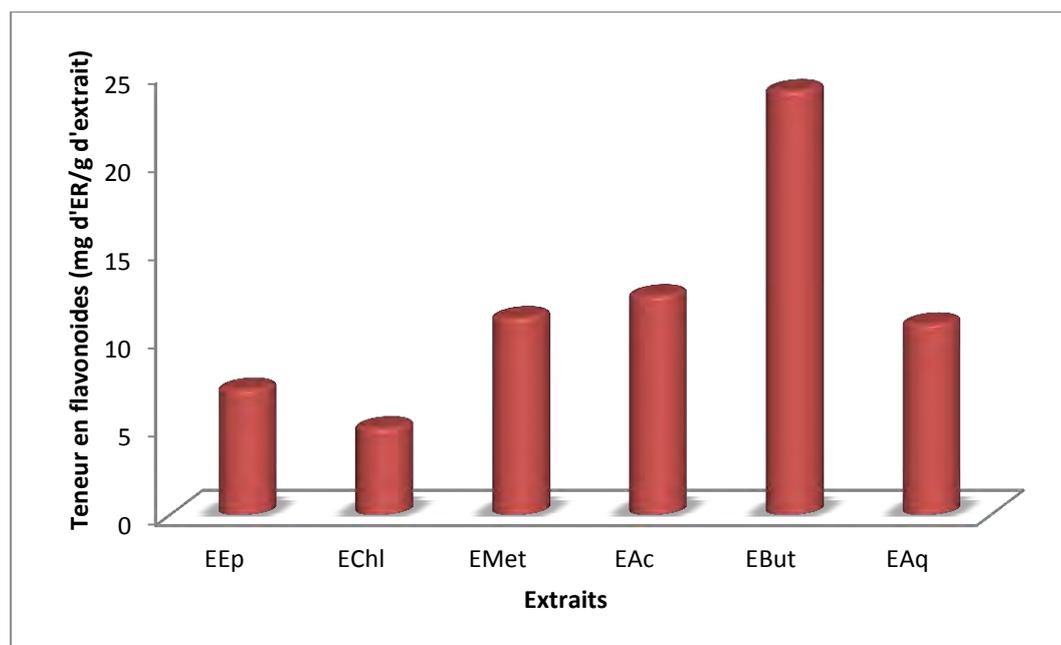


Figure 33 : Teneur en flavonoïdes de différents extraits d'*Opuntia ficus indica*

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

Selon Elâgoun *et al.*, en 2003, l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono O- glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides et C-glycosides.

Les résultats du dosage des flavonoïdes (Figure 33) révèlent que l'EMet contient $11,16 \pm 0,109$ mg ER/g d'extrait. EEp, EChl et EAq avec une teneur de $7,116 \pm 0,094$; $4,93 \pm 0,224$ et $10,81 \pm 0,174$ mg ER/g d'extrait respectivement, les deux fractions butanolique et d'acétate d'éthyle sont les plus riches avec les teneurs $24 \pm 0,367$ et $12,4 \pm 0,143$ mg ER/g d'extrait respectivement.

Statistiquement la différence entre les teneurs en flavonoïdes des extraits est très hautement significative ($p < 0,0001$) sauf entre l'EMet et L'EAq aucune différence significative n'a été constatée.

Les teneurs rapportées par Nadia Chougui *et al.*, (2013), sur les différents extraits d'*O.f.indica*, sont très élevées par rapport à nos résultats, cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes.

De même les résultats trouvés dans les travaux de Hyun-II Jun et *al.*, en 2013 ont montré que la teneur des flavonoïdes dans les extraits de chloroforme, d'acétate d'éthyle, butanol et aqueux d'*Opuntia humifusa* est de l'ordre de $57,6 \pm 4,7$; $89,7 \pm 3,7$; $37,9 \pm 1,5$ et $5,2 \pm 0,1$ mg EC/g d'extrait respectivement. Mais ces teneurs apparaissent supérieures par rapport à nos résultats.

Ces résultats obtenus sont nettement supérieurs au résultat trouvé par M. N. Bari et *al.*, (2012) qui est de $14,3 \pm 0,360$; $17,9 \pm 0,10$; $18,0 \pm 0,20$ et $443,8 \pm 0,30$ mg EC/100g de MS pour les extraits Chloroformique, Acétate d'éthyle, butanolique et méthanolique respectivement de raquettes d'*Opuntia Monacantha*.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

4.4 Dosage des tanins condensés : Proanthocyanidines

Le dosage des tanins a été effectué par la méthode n-Butanol / HCl adaptée par Vermerris et Nicholson en 2006. Les résultats sont exprimés en mg de cyanidine équivalent /100g matière sèche. (Figure 34)

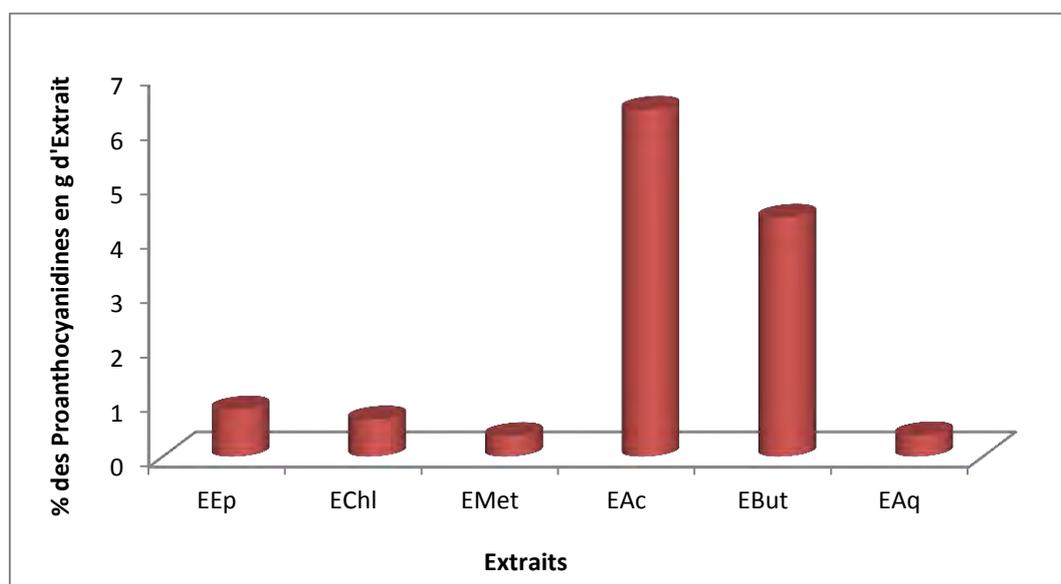


Figure 34 : Dosage des proanthocyanidines chez les différents extraits d'*Opuntia ficus indica*

Le dosage des tanins condensés montre que la teneur la plus élevée est celle de l'EAc ($6,368 \pm 0,336$) suivie par l'EBut ($4,383 \pm 0,167$), l'EChI ($0,678 \pm 0,341$), l'EEp ($0,86 \pm 0,128$), l'EAq ($0,38 \pm 0,056$) et l'EMet ($0,374 \pm 0,245$).

L'analyse statistique montre que la différence entre le taux de tanins condensés chez l'EEP, EChI, EMet et EAq est très hautement significative par rapport au taux des tannins chez les deux extraits : Acétate et Butanolique. ($p < 0,0001$).

Selon le même test d'analyse, la différence entre le taux de tanins condensés entre les quatre extraits EMet, EAq, EChI et EEp est non significative ($P > 0,05$).

Le dosage des tanins de différents extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica* représente les valeurs les moins élevées par rapport aux teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes, ce résultat est conforme avec ceux trouvés par Anaberta cardador-martínez (2011) ; Nadia Chougui et *al.*, (2013) et Rabhi A et *al.*, 2013.

Les plantes peuvent produire des substances phénoliques (tannoïdes) en réponse à un stress environnemental, suscité par différents facteurs : déficience en éléments nutritifs, sécheresse, surchauffage (températures élevées) et l'intensité lumineuse (Leinmüller E et *al.*, 1991). De même que le taux de tanins condensés dans le grand trèfle est supérieur quand il est cultivé dans un sol acide de basse fertilité par rapport à un sol fertile.

Le taux des tanins dans une plante dépend de deux facteurs principaux : le stade de développement végétatif et les conditions environnementales. Leur concentration varie considérablement entre les différentes espèces végétales et au sein de la même espèce où elle dépend du degré de maturité, de l'âge des feuilles, des fleurs et de la saison (Skadhauge B et *al.*, 1997).

4.5 Analyse chromatographique par HPLC

Opuntia ficus indica est une plante médicinale active, elle représente un polymorphisme chimique remarquable. Dans la même espèce, le contenu biochimique de ces extraits différents de manière significative selon où et dans quelles conditions la plante a fait sa croissance. La présence et la concentration de certains constituants chimiques fluctuent également selon la saison et la maturation de la plante (Amiot, 2005).

Les extraits aqueux et organiques d'*Opuntia ficus indica* ont été analysés par CLHP, afin de comparer leurs profils chromatographiques avec ceux des standards et d'obtenir une information sur la nature chimique des constituants.

La phase mobile utilisée pour analyser qualitativement nos extraits, est un mélange de solvants : Acide formique et l'Acétonitrile.

Les résultats de l'analyse HPLC des extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica* sont présentés dans le tableau 15.

L'Analyse des chromatogrammes obtenus qui sont présentés dans les tableaux 16 et 17 montre que les extraits apolaires (EEP et EChI) sont moins riches que les extraits polaires (EMe, EAc, EBut et EAq).

Les chromatogrammes et le nombre de pics montrent aussi que les extraits sont riches en flavonoïdes par rapports aux acides phénoliques. Les résultats d'analyse indiquent que l'extrait chloroformique est le plus pauvre en substances chimiques par rapport aux autres extraits.

Tableau 15 : Temps de rétention et nombre de pics de différents extraits

Extraits	Acides phénoliques à 280 nm	Flavonoïdes à 325 nm
	Temps de Rétention (mn)	Temps de Rétention (mn)
EEP	4,433	3,092
	12,768	12,767
	16,667	13,067
	22,750	14,132
	23,850	20,067
	24,383	25,033
	26,175	26,192
	27,392	26,900
	28,483	27,517
	28,800	29,433
	29,492	30,308
	30,208	32,483
	32,033	
	32,883	
	38,425	
	39,492	
	45,075	
	Total Pics = 17	Total Pics = 12
EChI	26,258	12,883
		13,258
		14,133
		20,383
		26,692
	Total Pics = 1	Total Pics = 5
EMet	1,783	2,658
	13,702	3,975
	19,017	7,158
	26,108	8,667
		8,942
		9,425
		10,092
		10,558
		11,250
		12,067
		13,017
		14,133
		15,712
		17,508
		19,958
	24,417	
	26,083	
	27,417	
	Total Pics = 4	Total Pics = 18

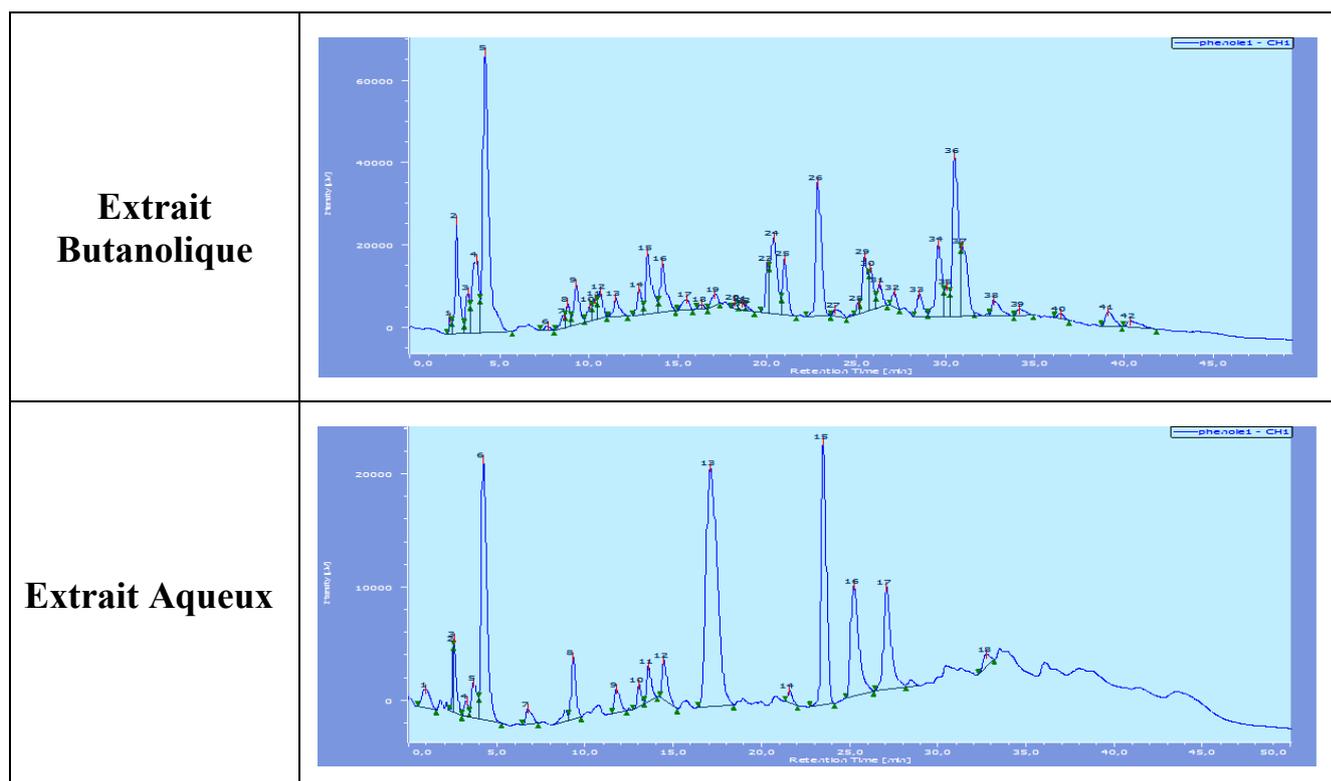
EAc	3,033	2,658
	12,762	4,008
	18,600	8,775
	20,278	8,983
	21,012	10,142
	22,758	10,658
	24,517	11,275
	25,800	13,058
	26,167	14,130
	27,083	19,883
	27,500	24,483
		26,075
	27,383	
	Total Pics = 11	Total Pics = 13
EBut	2,242	2,667
	2,608	3,967
	3,233	8,833
	3,717	9,417
	4,192	10,083
	7,683	10,625
	8,592	11,358
	8,825	12,892
	9,308	13,375
	9,106	14,135
	10,398	15,092
	10,642	15,710
	11,517	16,092
	12,765	16,542
	13,283	17,150
	14,687	17,742
	15,483	18,258
	16,308	18,950
	17,067	19,508
	18,167	20,117
	18,567	20,592
	18,808	21,033
	20,008	21,392
	20,275	22,552
	20,950	23,175
	22,817	23,708
	23,808	24,075
25,075	25,108	
25,433	25,817	
25,750	26,233	
26,258	27,075	
27,075	28,400	
28,492	29,142	
29,567	29,508	

	30,042	30,392
	30,475	30,717
	30,883	31,583
	32,658	32,100
	34,092	32,558
	36,358	33,850
	39,075	34,225
	40,275	36,025
	Total Pics = 42	Total Pics = 42
EAq	0,958	2,558
	2,500	2,650
	2,575	2,883
	3,242	3,283
	3,675	3,967
	4,192	8,742
	9,102	9,217
	11,758	10,050
	13,042	10,667
	13,707	12,392
	14,682	12,992
	17,067	13,392
	21,010	13,942
	23,458	14,130
	25,192	15,713
	27,050	18,953
	32,708	26,892
	27,683	
	28,225	
	Total Pics = 17	Total Pics = 19

Les chromatogrammes d'HPLC pour déterminer la richesse de différents extraits en acides phénoliques à 280nm sont représentés ci-dessous.

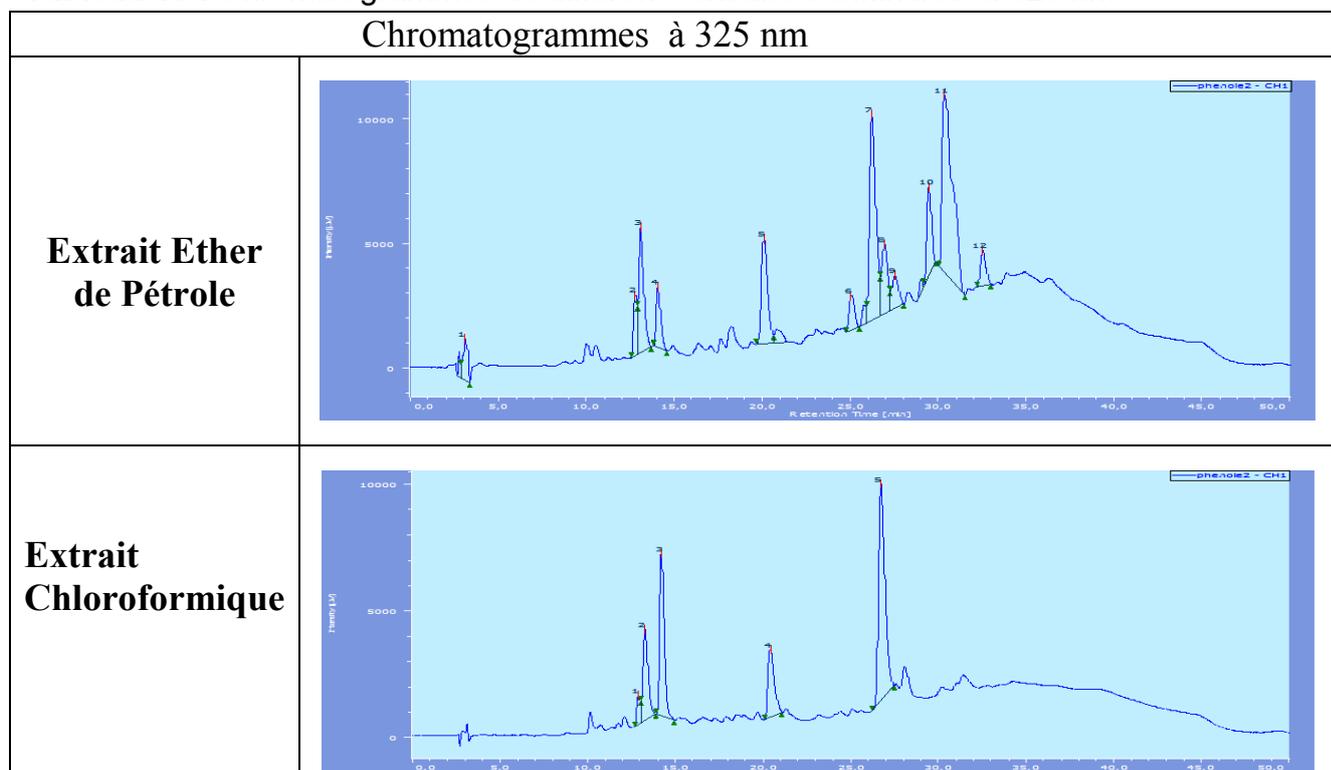
Tableau 16: Chromatogrammes de différents extraits d'*O.f.indica* à 280 nm

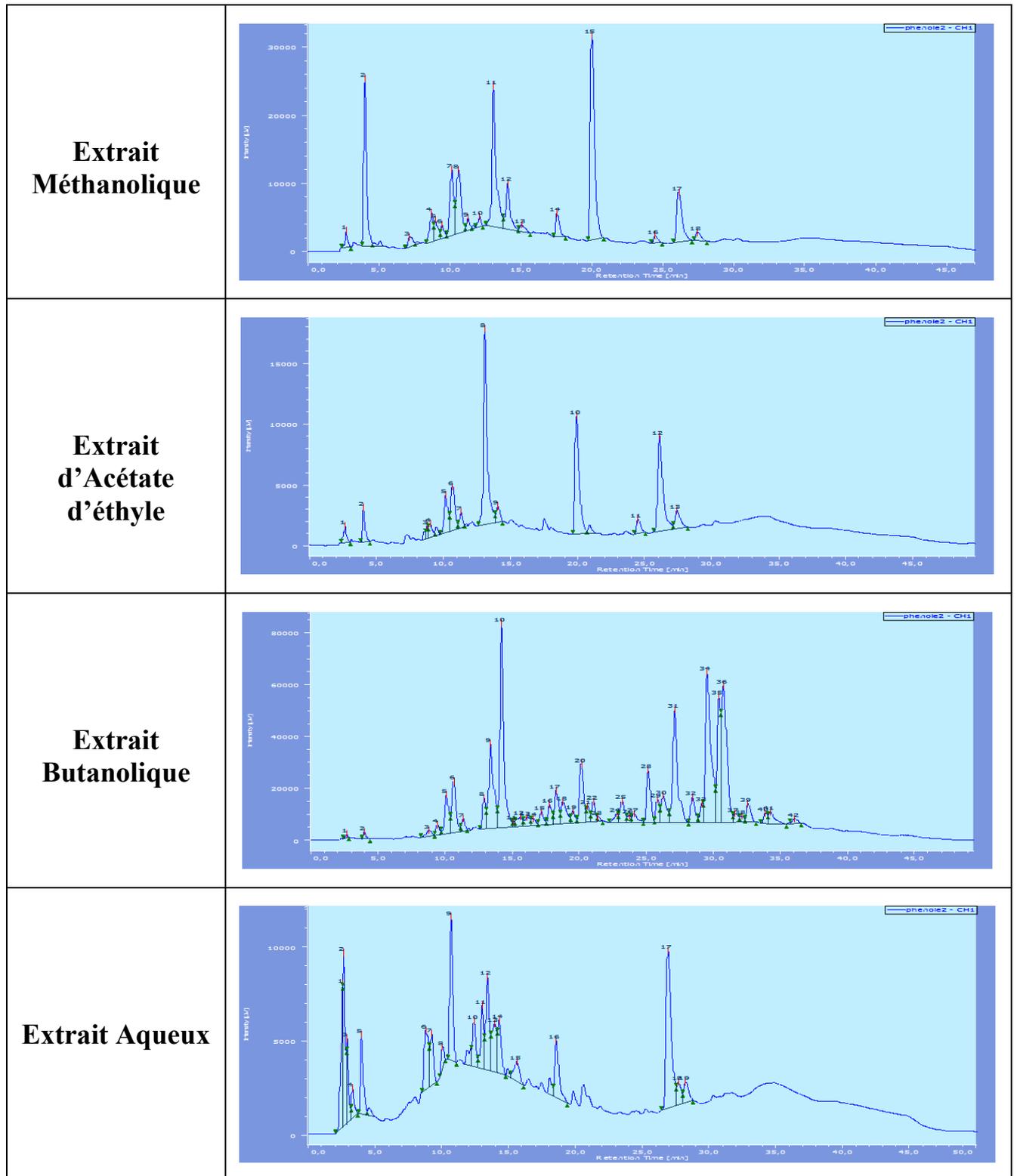
Chromatogrammes à 280 nm	
<p>Extrait Ether de Pétrole</p>	
<p>Extrait Chloroformique</p>	
<p>Extrait Méthanolique</p>	
<p>Extrait d'Acétate d'éthyle</p>	



Les chromatogrammes d'HPLC des différents extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica* à 325nm afin de détecter leur richesse en flavonoïdes sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Chromatogrammes de différents extraits d'*O.f.indica* à 325 nm





Quatre composés phénoliques purs (Ac gallique, Ac Ascorbique, Rutine et Quercétine) ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme standards. Leurs chromatogrammes sont représentés dans les tableaux 19 et 20 et leurs temps de rétentions (Tr) dans le tableau ci-suitant.

Tableau 18: Temps de rétention pour les standards

Standards	Flavonoïdes à 325 nm
	Temps de Rétention (mn)
Rutine	12,933
Quercétine	19,908
Acides phénoliques à 280 nm	
Temps de Rétention (mn)	
Ac Gallique	3,925
Ac Ascorbique	3,358

Tableau 19 : Chromatogrammes de différents standards d'acide phénoliques

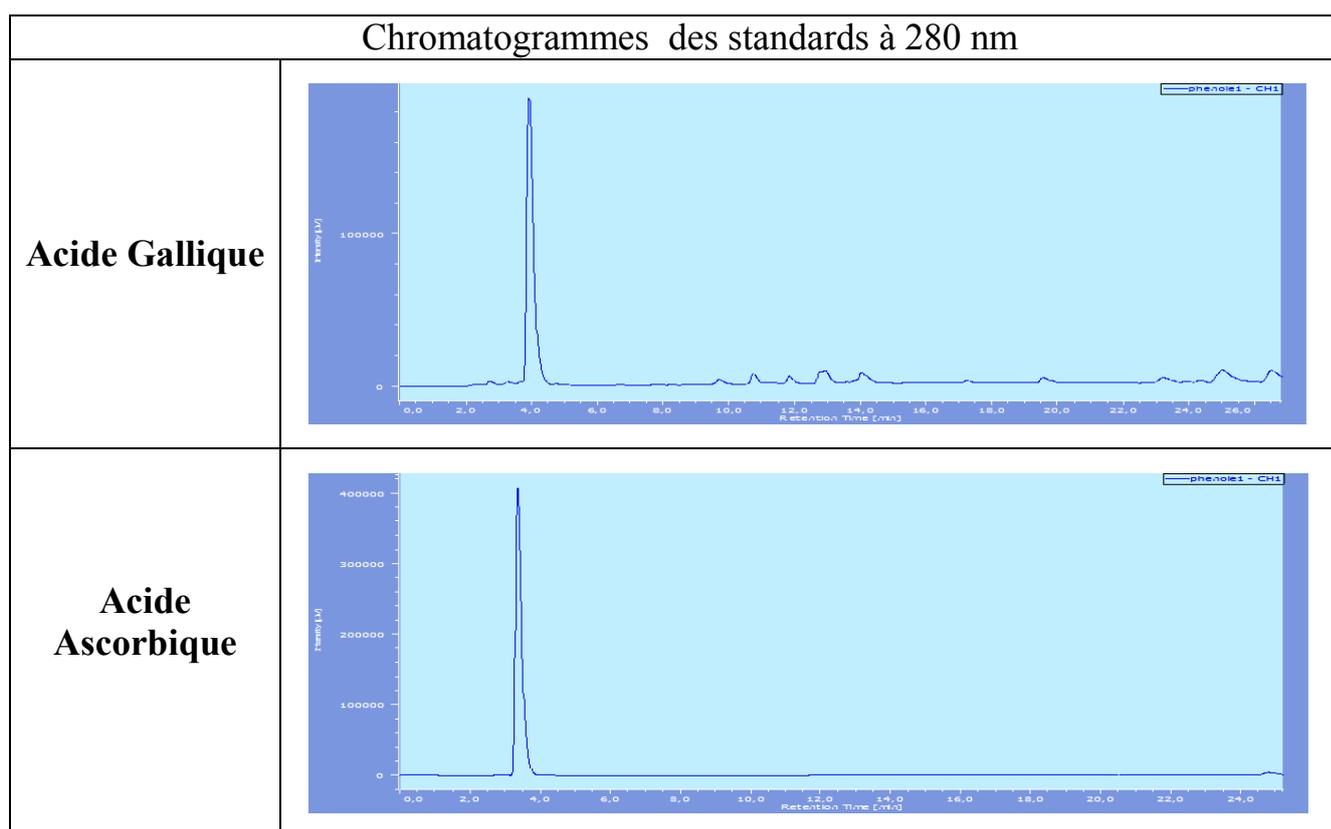
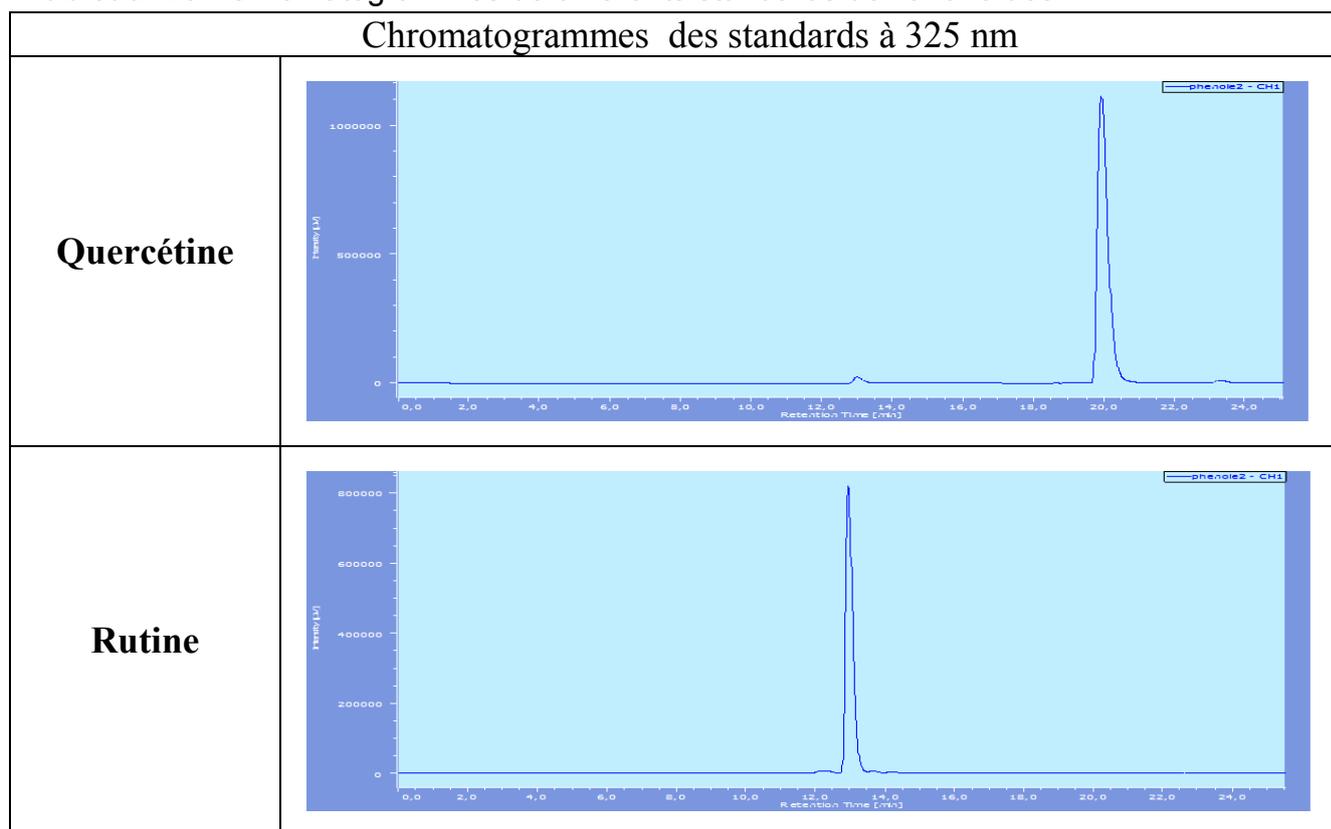


Tableau 20 : Chromatogrammes de différents standards de flavonoïdes



Les constituants contenus dans chaque extraits analysée ont été identifiés par comparaison avec les temps de rétention obtenus pour les standards, décrits dans la littérature (Galati et *al.*, 2003).

Tableau 21: Temps de rétention des acides phénoliques décrits par Galati et *al.*, 2003

Acides phénoliques à 280nm	
Standards	Temps de Rétention (mn)
Ac Protocatechuique	6,73
Ac Chlorogénique	7,91
Ac P-hydroxybenzoïque	9,10
Ac Syringique	10,13
Ac Isovanilique	10,39
Ac P-coumarique	12,76
Ac Ferulique	13,70
Ac Trans-m-coumarique	14,68
Ac Salicylique	20,27
Acide Trans-cinamique	21,01

Tableau 22 : Temps de rétention des flavonoïdes décrits par Galati et *al.*, 2003

Flavonoïdes à 325nm	
Standards	Temps de Rétention (mn)
Taxifoline	14,13
Myricetine	15,71
Luteoline	18,95
Kampferol	22,55
Isohamnetin	22,85

Les composés contenus dans les différents extraits d'*O.f.indica* sont identifiés par comparaison des temps de retentions des standards et la littérature avec les composés des différents chromatogrammes. L'ensemble des résultats sont représentés dans le tableau 23.

Tableau 23 : l'identification de différents constituants des extraits d'*O.f. indica*.

Extractions Standards	EEp	EChl	EMet	EAc	EBut	EAq
Ac Gallique	-	-	-	-	+	+
Ac Ascorbique	-	-	-	+	+	+
Ac Protocatechique	-	-	-	-	-	-
Ac Chlorogénique	-	-	-	-	-	-
Ac P-hydroxybenzoïque	-	-	-	-	+	+
Ac Syringique	-	-	-	-	-	-
Ac Isovanilique	-	-	-	-	+	-
Ac P-coumarique	+	-	-	+	+	-
Ac Ferulique	-	-	+	-	-	+
Ac Trans- m-coumarique	-	-	-	-	+	+
Ac Salicylique	-	-	-	+	+	-
Acide Trans-cinamique	-	-	-	+	-	+
Quercétine	+	+	+	+	+	-
Rutine	+	+	+	+	+	+
Taxifoline	+	+	+	+	+	+
Myricetine	-	-	+	-	+	+
Luteoline	-	-	-	-	+	+
Kampferol	-	-	-	-	+	-
Isohamnetin	-	-	-	-	-	-

Les chromatogrammes montrent la présence des composés phénoliques suivants : Ac Gallique, Ac Ascorbique, Ac P-hydroxybenzoïque, Ac Isovanilique, Ac P-coumarique, Ac Ferulique, Ac Trans-m-coumarique, Ac Salicylique, Acide Trans-cinamique, Quercétine, Rutine, Taxifoline, Myricétine, Luteoline, et Kampferol.

Les aires des pics obtenus montrent que les quantités diffèrent d'un extrait à un autre.

Cette comparaison, nous a permis de confirmer les résultats obtenus lors des tests de la caractérisation chimique concernant la présence des acides phénoliques et des flavonoïdes dans les différents extraits. Une étude sur le figuier de Barbarie a montré qu'il contient de 22 à 226 $\mu\text{g} / \text{g}$ d'acide gallique équivalent aux phénols totaux, de 95 à 374 $\mu\text{g} / \text{g}$ de quercétine équivalent aux flavonoïdes (Chavez-Santoscoy, 2009). ces résultats concordent avec ceux rapportés par Henri et *al.*, (2004) et Miraldi et *al.*, (2001).

L'analyse a détecté la présence de la rutine chez les différents extraits avec une quantité importante. D'autre part, l'analyse a révélé la présence de deux composés quercétine et kampferol chez quelques extraits et comme signalé par Tamer E. Moussa-Ayoub et *al.*, en 2011 ces métabolites peuvent être considérés comme des marqueurs chimio-taxonomiques de ce genre.

Les profils HPLC révèlent principalement des composés avec une grande masse moléculaire. Ces pics majoritaires existants chez les différents extraits restent non identifiés. Donc peu d'informations peuvent ainsi être déduites de ces chromatogrammes à ce stade du travail.

L'analyse colorimétrique a révélé une forte teneur en composés phénoliques dans les différents extraits de la plante soumis à l'étude. Ceci serait en accord avec les différents travaux d'isolement de plusieurs composés phénoliques dans cette plante (Weirong Cai et *al.*, 2010; Nadia Chougui et *al.*, 2013 ; Nizar yeddes et *al.*, 2014).

Les résultats de l'analyse HPLC confirment ceux de l'analyse colorimétrique à travers l'identification de quelques composés phénoliques. Nos résultats ont aussi montré que les P-coumarique, Quercétine, Rutine et Taxifolin étaient les plus rencontrés dans les divers extraits de notre plante ; ceci serait en accord avec les résultats de Galati et *al.*, (2003).

Chapitre 3 : Activités biologiques *in vitro*

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus de leurs intérêts dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé. De nombreuses études réalisées sur les produits naturels ont prouvé que ce sont particulièrement les composés phénoliques qui sont responsables de leurs activités antioxydantes. Nous avons donc évalué le pouvoir antioxydant de nos extraits qui se sont montrés riches en tanins et flavonoïdes. Pour ce faire, nous avons utilisé des méthodes à savoir : la méthode de réduction du fer (FRAP), de DPPH, de phosphomolybdate, tests de piégeage du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le radical hydroxyle OH.

Les résultats diffèrent sensiblement selon le test. L'utilisation de tests différents nous a permis d'avoir une meilleure lecture de l'activité anti-radicalaire de nos extraits.

1. Réduction du fer: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

L'activité antioxydante de six extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica* (EEp, EChI, EMet, EAc, EBut et EAq) a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (Li H-B et *al.*, 2008).

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Chung Y-C et *al.*, 2002)

En d'autre terme, le système FeCl₃/K₃Fe(CN)₆ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox (Amarowicz R et *al.*, 2004)

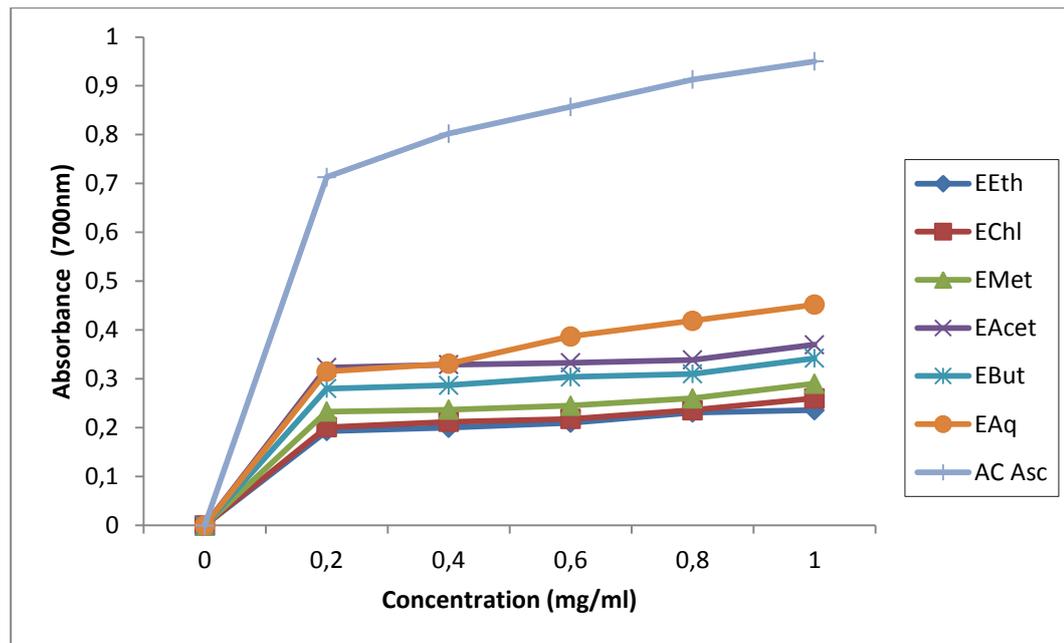


Figure 35 : Réduction du fer chez les différents extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica*

D'après nos résultats, nous avons remarqué chez tous les extraits testés l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées.

A la concentration de 1mg/ml, le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* est largement supérieur ($DO = 0,452 \pm 0,023$) par rapport aux autres extraits, mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique (Figure 35), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0,6 mg/ml.

Le pouvoir réducteur de l'espèce *O.f .indica* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju P et Becker K., 2007).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Bougandoura N et Bendimerad N, 2013)

Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés par Bari M. N. et *al.*, en 2012 sur les extraits de raquettes d'*Opuntia Monacantha* , ils ont montré que l'extrait méthanolique possède le pouvoir réducteur le plus élevé.

Statistiquement la différence entre le pouvoir réducteur de Fer chez les différents extraits entre eux et avec le référent est très hautement significative ($p < 0,0001$) sauf entre l'EEp et L'EChl on a constaté une différence hautement significative ($p < 0,001$).

2. Evaluation de l'activité antioxydante par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH)

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant. Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes de la figure 36, qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de différents extraits de la plante. Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50), qui constitue l'activité antioxydante des extraits étudiés.

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions \pm SD.

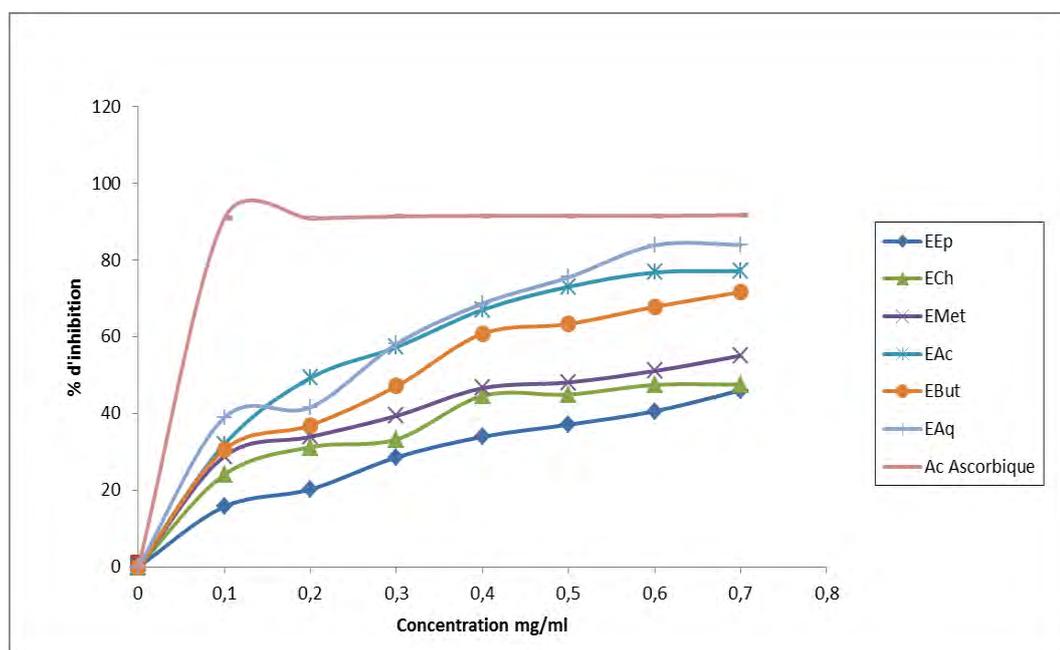


Figure 36 : Le % d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations de différents extraits d'*Opuntia ficus indica*

Tableau 24 : les valeurs d'IC50 chez les différents extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica*

Extraits	EEp	EChl	EMet	EAc	EBut	EAq	Ac Asc
IC50 (mg/ml)	0,722 ± 0,045	0,616 ± 0,032	0,536 ± 0,073	0,309 ± 0,054	0,379 ± 0,067	0,292 ± 0,015	0,068 ± 0,043

Selon les résultats enregistrés, les extraits aqueux, d'acétate d'éthyle et butanolique sont dotés d'un pouvoir antioxydant important, leurs IC50 respectives sont : 0,292 ± 0,015 ; 0,309 ± 0,054 et 0,379 ± 0,067 mg/ml mais relativement faible que celle d'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,068 ± 0,043mg/ml. Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (De Pooter H.L. et *al.*, 1986). Les polyphénols contenus dans les extraits d'*O.f.indica* sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits. Cela est en accord avec les travaux menés sur les extraits de *S. montana*, espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante et antimicrobienne (Ćetković G.S., et *al.*, 2007).

Comparativement à d'autres études, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Bari M. N. et ses collaborateurs en 2012 sur les extraits de raquettes d'*Opuntia Monacantha* où les pourcentages d'inhibition de radical DPPH est supérieur chez les fractions riches en polyphénols et flavonoïdes l'EAc, l'EBut et l'EAq.

L'extrait aqueux, d'Acétate d'éthyle et butanolique affichent la plus grande activité antioxydante ; ceci semble être en accord avec les résultats de l'analyse colorimétrique et de l'analyse HPLC. Cette dernière a révélé les extraits qui possèdent le plus grand nombre de composés et avec des concentrations élevées.

L'extrait méthanolique affiche une activité antioxydante relativement faible malgré la présence de quelques polyphénols. Bari M. N. et *al.*, en 2012 indiquent que ces composés ne sont peut-être pas extraits ou se trouveraient en faible quantité, comme l'atteste l'analyse HPLC.

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Kouri et *al.*, 2007). Ce dernier réagit avec le

radical DPPH en réduisant un nombre égal des groupements hydroxyles portés par la molécule de l'antioxydant (Bondet et *al.*, 1997).

Des études montrent que l'activité anti-radicalaire est corrélée avec le taux des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits des plantes médicinales (Mariod et *al.*, 2009 ; Locatelli et *al.*, 2010). Ceci mène à suggérer que l'effet antioxydant de différents extraits de notre plante peut être dû à un synergisme entre les polyphénols et d'autres composants.

L'examen statistique de ces résultats permet de mettre en évidence une différence très hautement significative ($p \leq 0,0001$) entre les valeurs d'IC50 des extraits et le standard, De même, l'analyse a montré une différence non significative ($p = 0,078$) entre l'IC50 de l'EAc et l'EAq.

3. Evaluation de l'activité antioxydante par le phosphomolybdate

L'analyse de Molybdate Phosphate est un essai direct qu'on emploie principalement pour mesurer la possibilité et la puissance des antioxydants non enzymatique.

La comparaison entre les différentes activités antioxydantes de nos extraits avec celle de l'acide ascorbique (Vit C) est montrée dans la figure 37

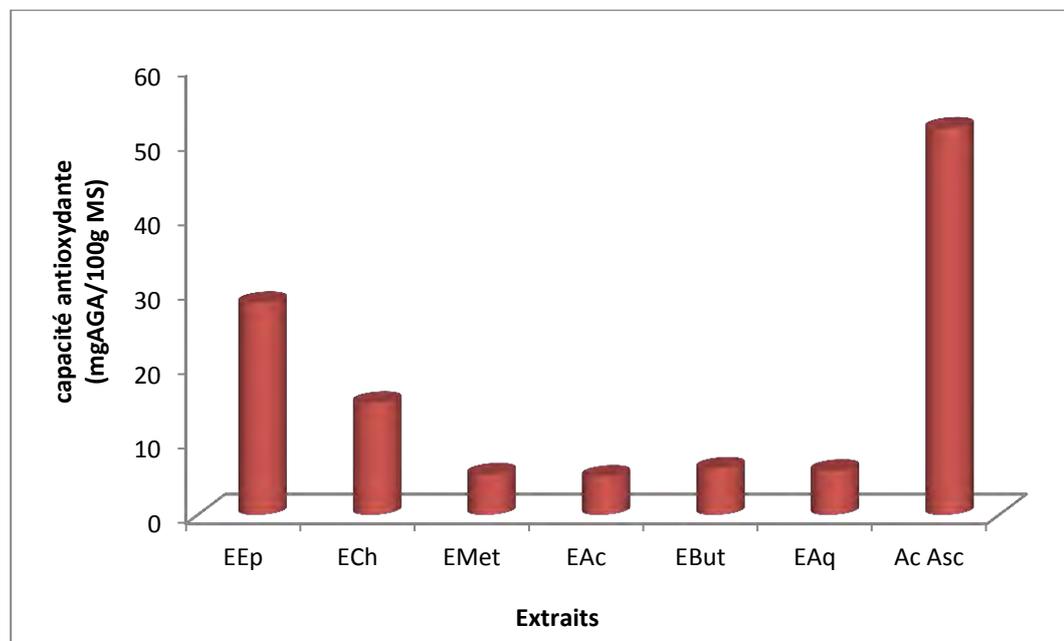


Figure 37 : Test de phosphomolybdate chez les différents extraits d'*O.f.indica*

Pour les différents extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica*, on note que les deux extraits (EEp et EChl ; $p < 0,05$) qui sont riches en matière grasse possèdent une activité antioxydante plus importante ($28,4 \pm 0,342$; $15 \pm 0,624$ mg/100g de Ms) que les autres extraits qui sont riches en polyphénols (EMet, EAc, EBut et EAq), et qui montrent des activités voisines ($5,4 \pm 0,254$; $5,1 \pm 0,734$; $6,2 \pm 0,347$ et $5,89 \pm 0,476$ mg/100g de Ms avec $p > 0,05$) respectivement, alors que la vitamine C possède une activité antioxydante importante par rapport aux extraits étudiés avec une valeur significative ($51,8 \pm 0,217$; $p < 0,0001$).

Ces résultats sont tout à fait contraires aux résultats obtenus par le test DPPH. Cette contradiction est due certainement aux types des tests utilisés et le mécanisme des réactions mises en jeu.

Dans le test DPPH les extraits riches en polyphénols sont les plus actifs suivis par les autres extraits. Ce résultat est prévu car les composés phénoliques présentent une activité antiradicalaire certaine.

Par contre dans le test de Molybdate de phosphate, les extraits riches en matière grasse possèdent des pouvoirs antioxydants très importants plus que les fractions phénoliques.

Nos résultats confirment ceux trouvés par Hadbaoui.Z en 2007 sur l'activité antioxydante de graines de sorgho. Elle a montré que le pouvoir antioxydant est très important chez les fractions lipidiques plus que les fractions phénoliques.

4. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène

Les résultats de l'activité antioxydante figurent dans le tableau 25 et expriment les capacités de détoxification *in vitro* du peroxyde d'hydrogène par les différents extraits. Cette molécule très réactive est un générateur de dérivés oxygénés très toxiques tel que le radical hydroxyle.

Tableau 25 : les valeurs d'IC50 de l'effet de piégeage du peroxyde H₂O₂ par les différents extraits ainsi que l'acide ascorbique.

Extraits	IC50 (mg/ml)	R ²
EEp	0,525 ± 0,043	0,9933
EChl	0,627 ± 0,232	0,9777
EMet	1,644 ± 0,063	0,9999
EAc	1,029 ± 0,153	0,9573
EBut	1,034 ± 0,106	0,9866
EAq	1,238 ± 0,056	0,9658
Ac Asc	0,068 ± 0,032	0,9957

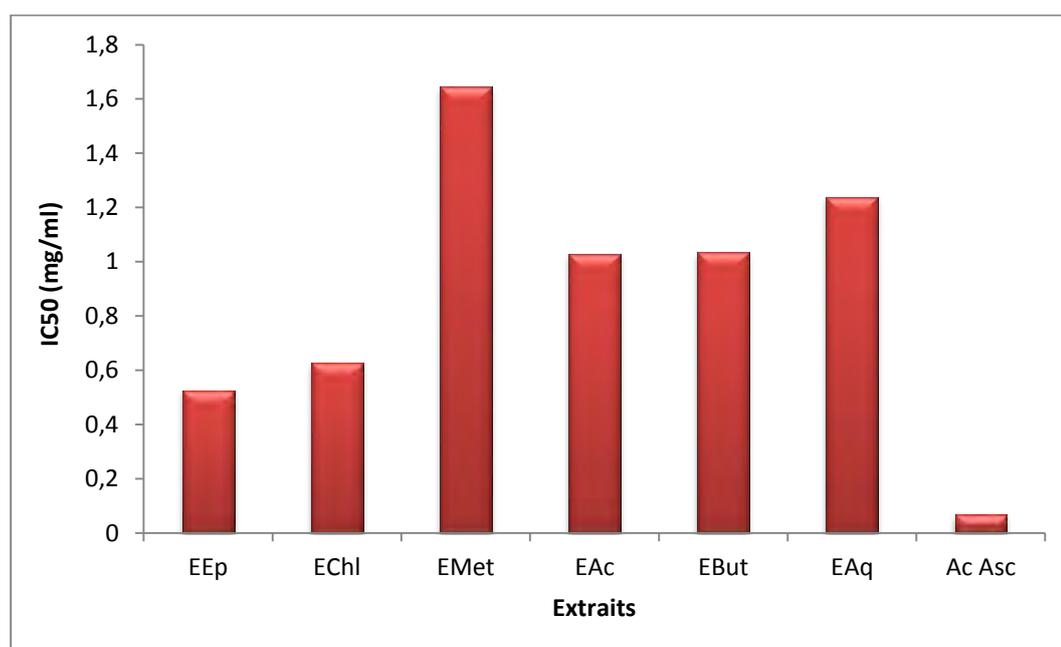


Figure 38 : Histogramme d'IC50 de différents extraits d'*O.f.indica*

Les extraits d'*O.f.indica* sont capables de piéger l'hydrogène peroxyde d'une manière dépendante de la quantité (figure 39).

Les résultats obtenus révèlent une bonne activité et donc tous les extraits ont la capacité de neutraliser le peroxyde d'hydrogène, l'extrait d'éther de pétrole, l'extrait chloroformique, les deux fractions acétate d'éthyle et butanolique ainsi que l'extrait

aqueux ont donnés des valeurs IC50 plus basses à celle de l'extrait brut (tableau 25 et figure 38).

La comparaison entre l'acide ascorbique (IC50 = 0,068 ± 0,032 mg/ml) et l'ensemble des résultats obtenus dans le tableau 25, montre suite à une analyse statistique :

Une différence hautement significative ($p < 0.001$) avec un pouvoir de piégeage du peroxyde d'hydrogène de l'acide ascorbique supérieur et meilleur des six extraits. Les résultats de cette analyse n'exclue pas qu'il y a des extraits qui sont de bons antioxydants, comme le montre les valeurs IC50, qui figurent dans le tableau 25.

Les recherches ont montré que les constituants phytochimiques tels que les flavonoïdes et les autres composés phénoliques ayant des effets biologiques multiples, comme l'activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, et une activité antimicrobienne (Venkatanarayan et *al.*, 2010).

Les flavonoïdes et les composés phénoliques ont de bons potentiels d'antioxydants et les mécanismes d'action : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (Hodek et *al.*, 2002) soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker et *al.*, 1996).

Le mécanisme le mieux utilisé dans la protection antioxydante est l'interaction directe entre l'extrait (ou composé) et le peroxyde d'hydrogène sans altérer la membrane cellulaire et de limiter les dommages (Annan et Houghton, 2008).

5. Test de piégeage des radicaux d'hydroxyles

Les radicaux d'hydroxyles sont les plus réactifs, ils peuvent oxyder des acides aminés, produire des coupures de brin d'ADN et des modifications des bases puriques et pyrimidiques, et attaquer des lipides au niveau des membranes et des lipoprotéines, initiant ainsi la peroxydation lipidique. Sont formés :

- selon la réaction de Fenton qui est un exemple radicalaire catalysé par des métaux de transitions et conduisant à la formation de OH \cdot
- les radiations ionisantes sont aussi des générateurs des OH \cdot . (Delattre et *al.*, 2005).

Les résultats de ce test de piégeage des radicaux d'hydroxyles sont mentionnés dans le Tableau 26 et la figure 41.

Les extraits d'*O.f.indica* étaient capables de piéger le radical hydroxyl d'une manière dépendante de la concentration (figure 40).

Tableau 26 : les valeurs d'IC50 de l'effet de piégeage des radicaux hydroxyles par les différents extraits ainsi que l'acide gallique.

Extraits	IC50 (mg/ml)	R ²
EEp	0,033 ± 0,187	0,9848
EChl	0,523 ± 0,136	0,9986
EMet	0,026 ± 0,054	0,9871
EAc	0,029 ± 0,026	0,9563
EBut	0,042 ± 0,109	0,9512
EAq	0,271 ± 0,456	0,9203
AGA	0,027 ± 0,345	0,8092

La capacité de piégeage du radical hydroxyle d'un extrait est directement liée à son activité anti-oxydante. Elle est plus efficace chez les extraits EMet, EAc, EBut et EEp avec des valeurs d'IC50 : 0,026 ± 0,054 ; 0,029 ± 0,026 ; 0,042 ± 0,109 et 0,033 ± 0,187 mg/ml respectivement ($p < 0,05$). Alors qu'elle est moins efficace chez les deux extraits EChl et EAq ($p < 0,001$) avec des valeurs d'IC50 de 0,523 ± 0,136 et 0,271 ± 0,456 mg/ml respectivement. La valeur d'IC50 obtenue par l'Acide gallique est de 0,027 ± 0,345 mg/ml.

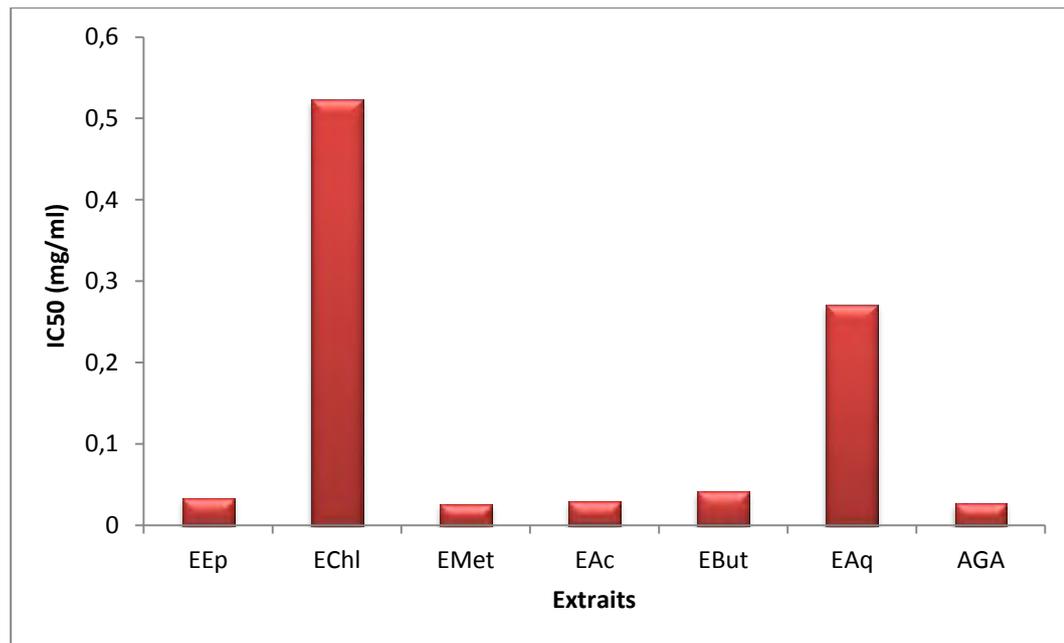


Figure 41 : Histogramme de différentes valeurs d'IC50 pour le test d'inhibition des radicaux hydroxyles

La comparaison de nos résultats par rapport à ceux rapportés dans la littérature nous permettons de constater que la valeur d'IC50 trouvée par Alimi H et *al.*, en 2013 de l'extrait méthanolique pour la variété inerme d'*O.f.indica* ($0,68 \pm 0,49\text{mg/ml}$) est largement plus élevée que la nôtre ($0,026 \pm 0,054.\text{mg/ml}$).

Les polyphénols contenus dans les extraits d'*O.f.indica* sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits. (Alimi H et *al.*, 2013)

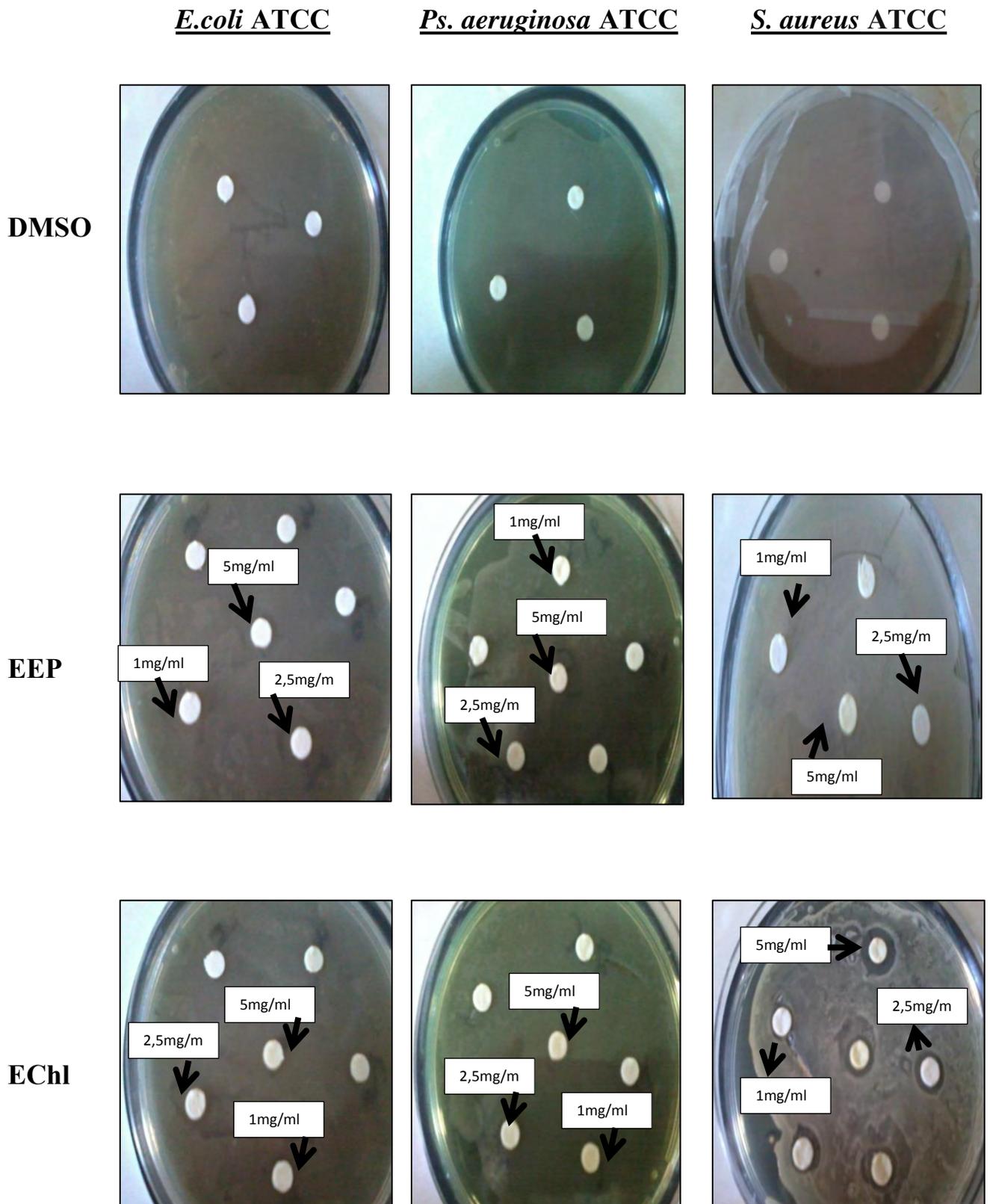
La capacité de scavenging de l'espèce *O.f.indica* est probablement due à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'hydrogène et d'électron. (Alimi H et *al.*, 2013)

6. Activité antimicrobienne

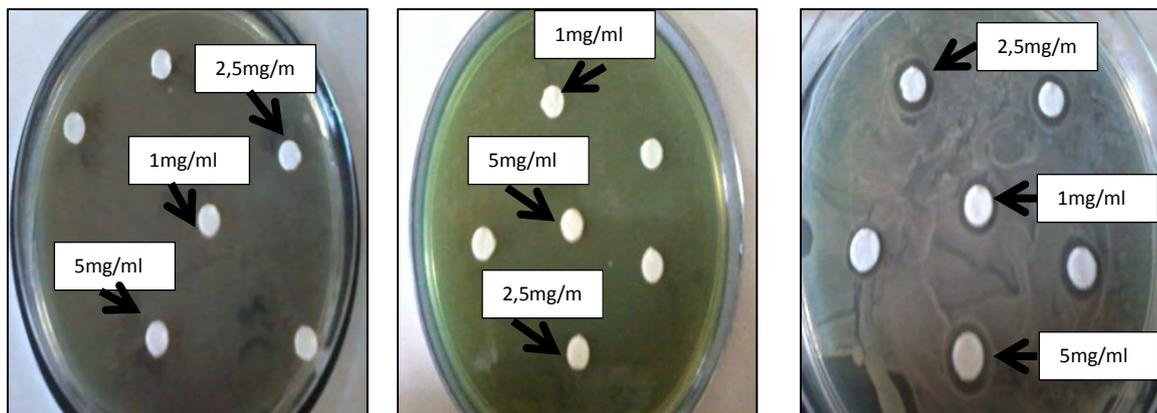
6.1 Méthode de diffusion (Antibiogramme)

Les observations effectuées sur les effets des extraits de raquettes d'*O.f.indica* sur la croissance des souches bactériennes testées : *S. aureus*, *Ps. Aeruginosa* et *E.colie* sont représentées dans le tableau 27et la figure 42

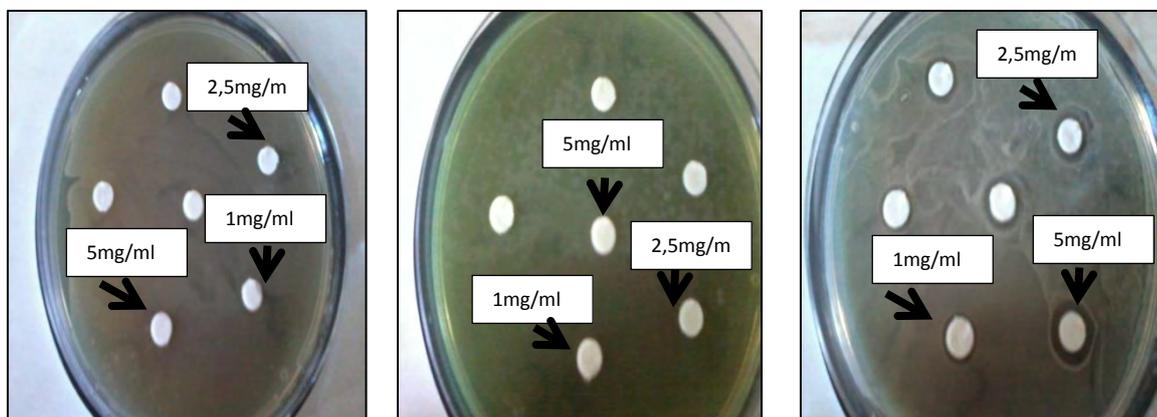
Figure 42: Activité antimicrobienne des extraits d'*Opuntia ficus indica*



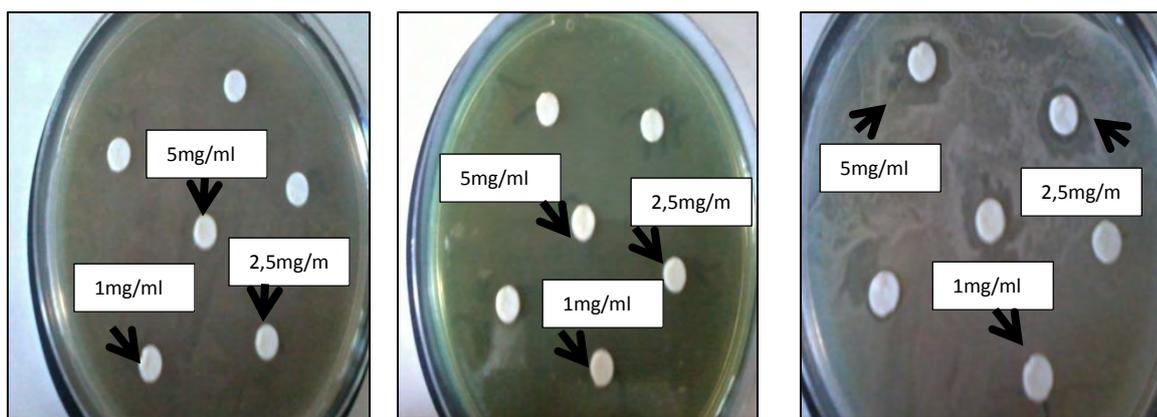
EMet



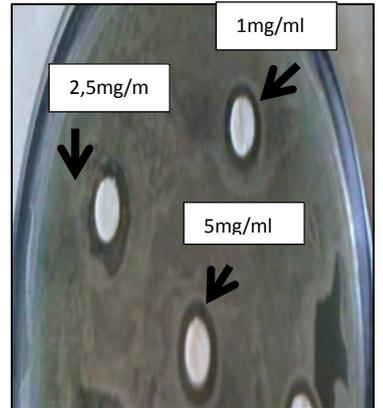
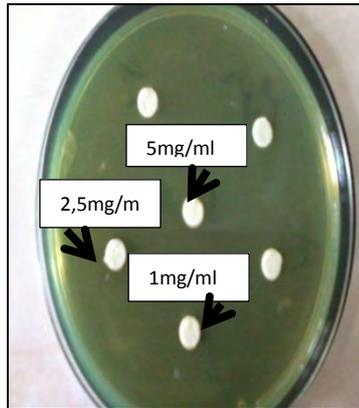
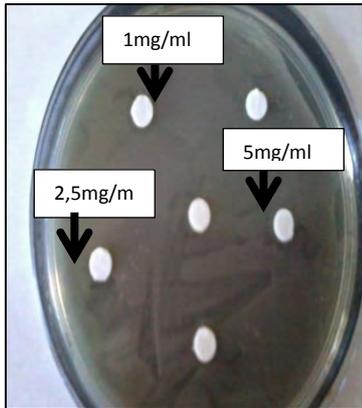
EAc



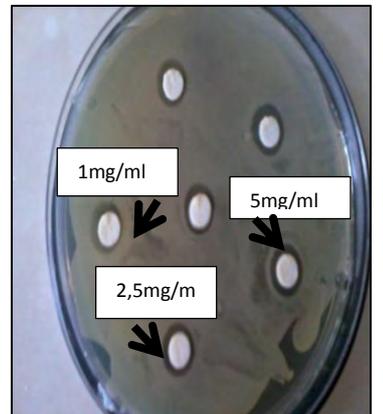
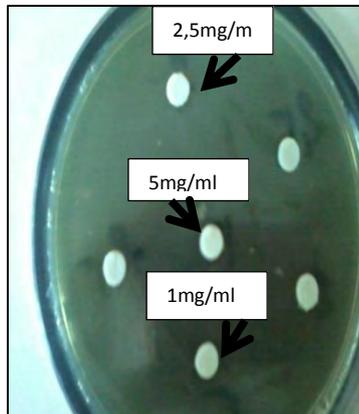
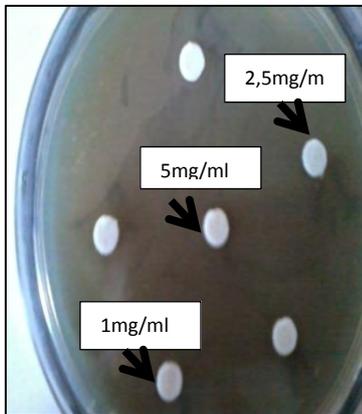
EBut



EAq



Rutine



**Ac
Ascor-
bique**

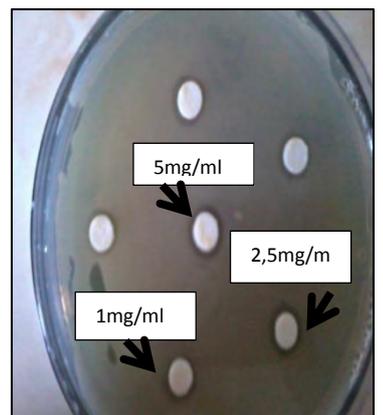
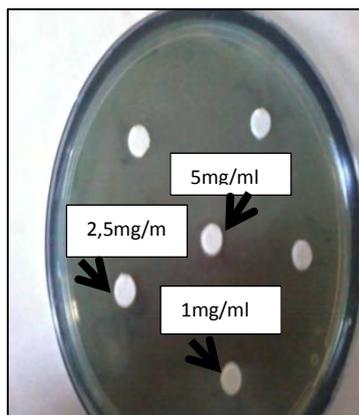
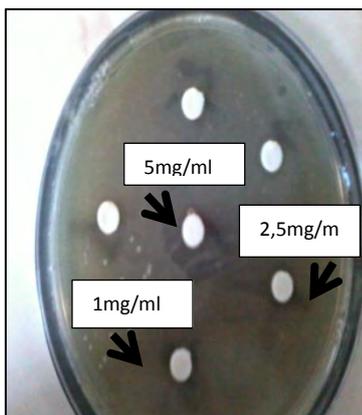


Tableau 27: les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) par la méthode de disques.

Souches		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
		<i>E.colie</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
EEp	1mg/ml	7,97 ± 0,143	8,04 ± 0,023	7,14 ± 0,126
	2,5mg/ml	8,51 ± 0,056	8,18 ± 0,126	8,32 ± 0,034
	5mg/ml	8,9 ± 0,145	8,23 ± 0,012	8,43 ± 0,143
EChl	1mg/ml	8,19 ± 0,076	8,26 ± 0,106	8,98 ± 0,045
	2,5mg/ml	8,30 ± 0,129	8,76 ± 0,004	9,67 ± 0,104
	5mg/ml	8,83 ± 0,204	8,77 ± 0,014	10,04 ± 0,016
EMet	1mg/ml	8,17 ± 0,064	00	9,03 ± 0,045
	2,5mg/ml	8,57 ± 0,012	00	9,50 ± 0,114
	5mg/ml	8,77 ± 0,143	00	10,78 ± 0,034
EAc	1mg/ml	7,83 ± 0,045	00	9,46 ± 0,045
	2,5mg/ml	8,49 ± 0,034	00	9,62 ± 0,067
	5mg/ml	8,78 ± 0,103	00	11,18 ± 0,104
EBut	1mg/ml	8,10 ± 0,023	00	7,88 ± 0,123
	2,5mg/ml	8,51 ± 0,242	00	9,02 ± 0,201
	5mg/ml	8,63 ± 0,106	00	9,40 ± 0,104
EAq	1mg/ml	8,27 ± 0,034	00	9,39 ± 0,067
	2,5mg/ml	8,33 ± 0,067	00	9,46 ± 0,023
	5mg/ml	8,84 ± 0,036	00	10,25 ± 0,012
Ac. Asc	1mg/ml	8,48 ± 0,012	00	8,07 ± 0,123
	2,5mg/ml	8,96 ± 0,125	00	8,46 ± 0,024
	5mg/ml	9,03 ± 0,042	00	8,66 ± 0,067
Rutine	1mg/ml	8,08 ± 0,106	7,27 ± 0,056	9,06 ± 0,104
	2,5mg/ml	8,38 ± 0,059	7,73 ± 0,067	9,62 ± 0,024
	5mg/ml	8,67 ± 0,034	7,78 ± 0,045	9,89 ± 0,104
DMSO		00	00	00

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de ces extraits, on a préféré de les tester contre plusieurs cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

La sensibilité des bactéries aux extraits est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose (figure 42).

Les résultats montrent que tous les extraits de raquettes d'opuntia se sont avérés inactifs contre *Escherichia colie* ATCC et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC testées, ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé. En revanche la souche de *staphylococcus aureus* ATCC a manifesté une résistance relative vis-à-vis d'EChI, EMet, EAc et Aq malgré les faibles zones d'inhibition observées (entre $9,03 \pm 0,045$ et $11,18 \pm 0,104$ mm).

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (Turkmen et *al.*, 2007 ; Falleh et *al.*, 2008), Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et les concentrations accrues en NaCl (Georgantelis et *al.*, 2007).

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Balentine et *al.*, 2006).

La résistance des deux souches *Escherichia colie* ATCC et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar.

Nos résultats obtenus avec l'extrait méthanolique ont été comparé avec ceux trouvés par Somaie Shafiei, et *al.*, en 2013, ils ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique d'*Opuntia stricta* . Nous avons obtenu des résultats très proches avec la souche d'*E.coli* ATCC ; en revanche, ils ont enregistré une faible activité par rapport à nos résultats pour le même extrait sur la souche *S. aureus*, cela est peut-être dû au fait que nous avons utilisé des méthodes d'extraction différentes.

La zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits, ce qui a été constaté aussi par Dordevic et ses collaborateurs, (2007). Les auteurs ont révélé des zones d'inhibition de l'ordre de (20.5 ± 1.8 mm), (12.8 ± 0.5 mm), (16.3 ± 0.5 mm) respectivement pour les souches *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC pour une dilution au 2% , ces zones sont augmentées de l'ordre de : (21.8 ± 0.9 mm), (13.5 ± 0.5 mm), (19.3 ± 0.5 mm) pour une dilution au 4%.

La charge du disque influe l'activité antimicrobienne, Rasooli et ses collaborateurs, (2008) ont remarqué que l'inhibition de la croissance est forte lorsque le disque est plus chargé.

Nous avons employé une quantité moyenne de 10 μ l d'extrait par disque, par rapport à Bari M.N et *al.*, (2012) qui ont employé des fractions plus riches : 100 μ l par disque.

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats. Natarajan et *al.*, (2005) et Fazeli et *al.*, (2007) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques que la méthode de diffusion en milieu gélosé

Brantner et *al.* (1996) rapportent que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les stéroïdes à une certaines concentration peuvent inhiber la croissance des microorganismes. Il est démontré que les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires. Le nombre et la position des groupements hydroxyles présents sur le noyau aromatique des composés phénoliques peuvent entraîner la toxicité des microorganismes (Cowan, 1999).

Les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'épigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine, (Shan et *al.*,2007) et lutéoline (Askun et *al.*,2009) sont des substances antibactériennes importantes. L'HPLC a révélé, dans tous les extraits, la présence de la quercétine mais en petite quantité et l'absence de la catéchine, ces deux flavonoïdes doués d'activité antibactérienne; ce qui peut expliquer l'inefficacité des extraits de cette plante.

L'activité antimicrobienne ne dépend pas seulement de la présence des composés phénoliques, mais également de la présence de divers métabolites secondaires, de l'emplacement et le nombre des groupes d'hydroxyles (Falleh et *al.*, 2008).

6.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice, on a utilisé la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 28.

Pour la souche de *staphylococcus*, la concertation minimale inhibitrice de la phase d'acétate est de 100mg/ml, l'extrait méthanolique est de 150mg/ml et pour la phase aqueuse est de 200 mg/ml alors que pour les autres extraits est supérieure à 200 mg/ml

Les deux autres souches *Escherichia coli* ATCC et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC sont plus résistante, d'après les résultats obtenus nous avons constaté que la concentration inhibitrice minimale (CMI) pour les différents extraits est supérieure à 200mg/ml.

Tableau 28: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de raquettes d'*O.f.indica*

Microorganisme	Extraits	CMI
<i>Escherichia colie</i> ATCC	EEp	>200mg/ml
	EChl	>200mg/ml
	EMet	>200mg/ml
	EAc	>200mg/ml
	EBut	>200mg/ml
	EAq	>200mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	EEp	>200mg/ml
	EChl	>200mg/ml
	EMet	>200mg/ml
	EAc	>200mg/ml
	EBut	>200mg/ml
	EAq	>200mg/ml
<i>staphylococcus aureus</i> ATCC	EEp	>200mg/ml
	EChl	>200mg/ml
	EMet	150mg/ml
	EAc	100mg/ml
	EBut	>200mg/ml
	EAq	200mg/ml

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de Bari M. N et ses collaborateurs (2012), qui ont déterminé les CMI's de différents extraits de raquettes d'*Opuntia Monacantha* sur quatre souches microbiennes, notamment : *S. aureus* ATCC et *E. coli* ATCC. Ils ont enregistré une forte activité par rapport à nos résultats.

Chapitre 4 : Etude Pharmacologique et Toxicologique

1. Etude de la toxicité

1.1 Etude de la toxicité aigüe d'*Opuntia ficus indica*

1.1.1 L'Administration par voie orale (per Os)

Les animaux traités avec les doses de 500, 2500, 5000 et 10000 mg/kg de l'extrait aqueux par simple application et par voie orale ont présenté une carte clinique dépourvue de symptômes de toxicité. Leur comportement ressemble à celui des animaux témoins. Les variations de poids corporel et les masses relatives des organes des animaux traités et témoins sacrifiés après 14 jours, sont présentées dans le tableau 29.

Tableau 29: Variations des poids corporels des rats normaux et traités en essai de la toxicité aigüe par voie orale

	Lot CRL	Lot1 : 500 mg/kg	Lot2 : 2500 mg/kg	Lot3 : 5000 mg/kg	Lot4 : 10000 mg/kg
Poids initiale (g)	194,03 ± 0,01	98,75 ± 0,009	75,66 ± 0,014	100,25 ± 0,013	103,25 ± 0,004
Poids finale (g)	215 ± 0,12	117,014 ± 0,018	95,14 ± 0,01	123 ± 0,012	123,66 ± 0,001
Gains de poids (g) après 14j	20,97	18,264	19,48	22,75	20,41

D'après les résultats, on constate qu'il y a une augmentation significative ($p < 0,05$) dans la masse relative du foie et rate entre le 1^{er} et 14^{ème} jours chez le lot des rats qui avaient reçu une dose élevée de 10000 mg /kg (tableau 30).

Tableau 30 : Valeurs absolues et relatives du poids des organes des rats normaux et traités en essai de la toxicité aigüe par voie orale

	Lot : CRL	Lot1 : 500 mg/kg	Lot2: 2500 mg/kg	Lot3: 5000 mg/kg	Lot4: 10000 mg/kg
Poids des organes (g)					
Foie	4,20 ± 0,652	4,76 ± 0,454	5,09 ± 0,601	4,96 ± 0,553	5,87 ± 0,344
Cœur	0,49 ± 0,107	0,44 ± 0,103	0,40 ± 0,035	0,37 ± 0,064	0,47 ± 0,0534
Reins	0,79 ± 0,094	0,74 ± 0,07	0,73 ± 0,164	0,72 ± 0,056	0,85 ± 0,123
Rate	0,37 ± 0,078	0,50 ± 0,049	0,50 ± 0,061	0,51 ± 0,034	0,68 ± 0,104
Poumon	0,99 ± 0,132	0,82 ± 0,201	0,80 ± 0,167	0,75 ± 0,183	1,09 ± 0,211
Poids relatif					
Foie	3,232 ± 0,723	3,489 ^{Ns} ± 0,362	3,817 ^{Ns} ± 0,432	4,116 ^{Ns} ± 0,231	4,619* ± 0,345
Cœur	0,377 ± 0,021	0,359 ^{Ns} ± 0,045	0,323 ^{Ns} ± 0,043	0,344 ^{Ns} ± 0,123	0,369 ^{Ns} ± 0,145
Reins	0,607 ± 0,127	0,579 ^{Ns} ± 0,103	0,584 ^{Ns} ± 0,301	0,590 ^{Ns} ± 0,012	0,668 ^{Ns} ± 0,245
Rate	0,284 ± 0,143	0,366 ^{Ns} ± 0,032	0,392 ^{Ns} ± 0,042	0,404 ^{Ns} ± 0,021	0,535* ± 0,367
Poumon	0,761 ± 0,145	0,601 ^{Ns} ± 0,164	0,647 ^{Ns} ± 0,141	0,577 ^{Ns} ± 0,345	0,857 ^{Ns} ± 0,732

1.1.2 L'Administration par voie intra péritonéal (IP)

Après l'administration des doses comprises entre 1000 et 3000 mg/kg P.C d'extrait aqueux de raquettes d'*Opuntia ficus indica* par voie intrapéritonéale, aux différents lots des rats, les différents signes de toxicité sont regroupés dans le tableau 31, alors que le total et les taux de mortalité sont enregistrés dans le tableau 32.

➤ Comportement des rats

Tableau 31: Comportement et signes de toxicité enregistrés chez les rats soumis à une injection intrapéritonéale des doses croissantes de l'extrait Aqueux.

Lots	Témoins	Lot1	Lot2	Lot3
Doses (mg/kg de P.C)	L'eau distillée	1000	2000	3000
Comportement normal	+	+	-	-
Démarche anormale	-	-	+	+
Activité réduite	-	-	+	+
Difficulté de respiration	-	-	-	+
Convulsion	-	-	-	+
Diarrhée	-	-	-	-
Coma	-	-	+	+
Sang dans les urines	-	-	-	-
Gonflement de la partie d'injection	-	-	+	+

Les rats du lot soumis à une injection de 1000 mg/kg P.C, présente un comportement normal comparable à celui des témoins. De même, peu de signes de toxicité ont été enregistrés chez les rats soumis à une injection I.P de 2000mg/kg P.C.

Par contre, dès l'injection de 3000mg/kg P.C aux rats, nous avons enregistré des troubles et des signes de toxicité graves qui conduisent jusqu'à la mort de la majorité des rats du lot.

Les rats présentent surtout des convulsions avec de fortes agitations ; une accélération de rythme cardiaque avec des difficultés respiratoires, puis un coma profond jusqu'à la mort.

Après 72 heures, les animaux survivants ont retrouvé un comportement normal comparable à celui des témoins.

➤ Détermination des DL50

Tableau 32: Taux de mortalité des rats soumis à une injection intrapéritonéale unique des doses croissantes d'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica*

Lots	Doses (mg/kg P.C)	Log dose	Effectif (n)	1 ^{er} jour	Après 48 h	Taux de mortalité (%)	Mortalité (unité probits)
Témoins	Eau distillée	0	6	0	0	0%	-
Lot1	1000	3	6	0	0	0%	1,90
Lot2	2000	3,301	6	1	1	33,33%	4,56
Lot3	3000	3,477	6	1	3	66,66%	5,41

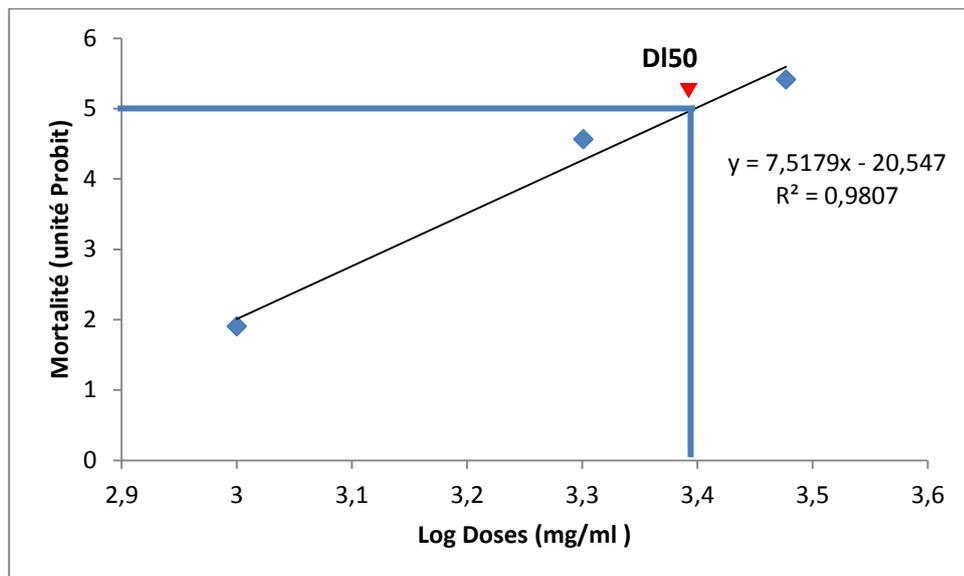


Figure 43: Détermination de la DL50 de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* par la méthode de Miller et Tainter.

D'après la droite de régression linéaire présentée dans la Figure 43, la DL50 est estimée à 2501,25 mg/kg P.C. Cette DL50 a permis de classer notre extrait aqueux de raquettes d'*Opuntia ficus indica* dans la catégorie des substances faiblement toxique, selon la classification de Hodge et Sterner (1943).

1.2 Evaluation de la toxicité chronique de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* chez le lapin Néozélandais.

1.2.1 Etat général des animaux

Au cours de toute la période d'expérimentation, aucun animal n'a manifesté un comportement anormal soit du lot traité ou non traité.

1.2.2 Evolution du poids

Le tableau 33 représente les résultats obtenus de la variation de poids corporel des groupes de lapins normaux et lapins expérimentés après un traitement quotidien de 90 jours par un extrait aqueux de cladodes d'*Opuntia ficus indica* à une dose de 100mg/kg.

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que l'administration de l'extrait aqueux induisait une augmentation légère du poids corporel chez le groupe de lapins traités. Cette augmentation est à l'ordre de 2,961% ; 4,1% ; 5,011% ; 5,922% ; 6,833% et de 8,2% par rapport au poids corporel initial après chaque semaine de traitement. Par ailleurs, le groupe sain témoin a subi durant les mêmes périodes une augmentation régulière de 9,146% ; 12,715% ; 16,694% ; 17,760% ; 18,744% et de 20,795%. L'analyse statistique des résultats du changement de la moyenne du poids corporel entre les deux groupes « témoin et traité » montre qu'il y a une différence très hautement significative ($p < 0,0001$).

1.2.3 Modification du poids des organes

Les résultats obtenus concernant le poids de la rate des deux lots (témoin et traité) sont presque similaires. Tandis que, le poids du foie et reins était plus élevé que celui du groupe témoin (tableau 34 et Figure 44). L'augmentation du poids du foie et reins peut être liée à une congestion par résorption du sang dans ces organes (Rasekh et al., 2008). Ces résultats nécessitent cependant, des analyses plus approfondies pour connaître l'effet de l'extrait sur ces organes.

L'analyse statistique établies avec le logiciel Anova indique que ce changement du poids des organes entre les deux groupes est non significatif ($p > 0,05$).

Tableau 33: Variation du poids corporel chez les deux groupes pendant 12 semaines de traitements

Groupes	Paramètres	J1	J15	J30	J45	J60	J75	J90
CRL	Poids corporel	2,438 ± 0,156	2,661 ± 0,092	2,748 ± 0,057	2,845 ± 0,028	2,871 ± 0,051	2,895 ± 0,010	2,945 ± 0,04
	% gain de poids corporel	0	9,146	12,715	16,694	17,760	18,744	20,795
OFIJ	Poids corporel	2,195 ± 0.101	2,26 ± 0.106	2,285 ± 0.141	2,305 ± 0.146	2,325 ± 0.104	2,345 ± 0.006	2,375 ± 0.06
	% gain de poids corporel	0	2,961 ****	4,1 ****	5,011 ****	5,922 ****	6,833 ****	8,2 ****

Tableau 34: Le poids de certains organes dans le groupe témoin et le groupe traité pendant 12 semaines.

	CRL	OFIJ
Poids des organes		
Foie (g)	103,345 ± 0.2	86,48 ± 0.054
Rate (g)	1,197 ± 0.03	1,233 ± 0.165
Reins (g)	8,176 ± 0.391	8,084 ± 0.547
Poids relatif des organes		
Foie (g)	3,509	3,641 ^{Ns}
Rate (g)	0,040	0,051 ^{Ns}
Reins (g)	0,277	0,340 ^{Ns}

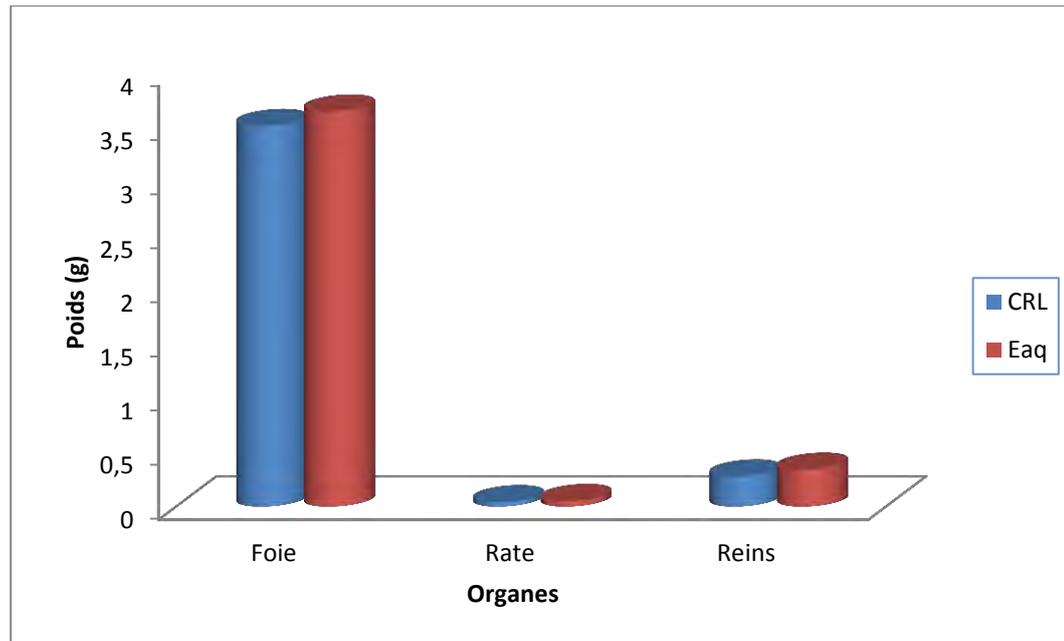


Figure 44: Poids relatifs des organes de lapins traités par l'extrait aqueux comparés au lot témoin pendant 12 semaines

1.2.4 Analyse biochimique

Les résultats de l'influence de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* sur le profil lipidique des lapins sains et traités sont rassemblés dans la figure 45 et le tableau 35. Nous avons constaté une diminution non significative de la concentration sérique du cholestérol total ($0,207 \pm 0.06$ et 0.525 ± 0.253 g/l chez le groupe traité et témoin respectivement) et des triglycérides ($1,142 \pm 0.255$ et $1,16 \pm 0.338$ g/l pour le groupe traité et témoin respectivement).

Les enzymes hépatiques ont été augmentées chez les lapins traités par extrait aqueux ($P > 0,05$). Aspartate aminotransférase (AST) a montré une augmentation non significative dans le groupe traité comparativement avec le groupe témoin. De même, l'Alanine aminotransférase (ALT) est élevée de manière non significative chez les lapins testés comparativement aux animaux témoins (Fig 45-B, 45-C).

La glycémie à jeun a été significativement réduite dans le groupe traité par rapport au groupe témoin (fig45-E). En revanche, les deux paramètres la Créatinine et l'urée montrent une diminution mais non significative dans le lot expérimental (Fig 45-D, 45-H).

Les résultats montrent également que les concentrations de protéines totales et d'albumine dans le groupe traité ont été inférieures, cette diminution est significative pour les protéines totales et n'est pas statistiquement significative pour l'Albumine comparativement au groupe témoin (Fig 45-F, 45-G)

Tableau 35: paramètres biochimiques chez le lot des lapins traités et le lot témoin après 12 semaines.

Paramètres sanguins	Témoin (n=6)	OFIJ (n=6)
CHOL	0.525 ± 0.253	0.207 ^{Ns} ± 0.06
ALAT	16.25 ± 3.40	22.33 ^{Ns} ± 1.527
ASAT	23.25 ± 4.5	31 ^{Ns} ± 9.848
CREA mg/L	7.6 ± 1.14	7 ^{Ns} ± 0.816
GLU (g/L)	1.18 ± 0.08	0.93* ± 0.07
TP	58.83 ± 4.167	48.75* ± 2.872
ALB	16.5 ± 1.378	14.25 ^{Ns} ± 2.06
UREE	0.258 ± 0.08	0.222 ^{Ns} ± 0.03
TG	1.16 ± 0.338	1.142 ^{Ns} ± 0.255

Nous avons constaté que l'administration orale de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* à une dose journalière de 100mg/kg pendant trois mois a également diminué la moyenne du gain du poids corporel chez les lapins par rapport à celle observée chez le groupe témoin.

Les résultats de poids corporel sont en accord avec ceux publiés par Louacini B. k., *al.*, (2012) qui ont constaté qu'un traitement de 30 jours par *opuntia ficus indica* provoque chez les bovins une perte de poids.

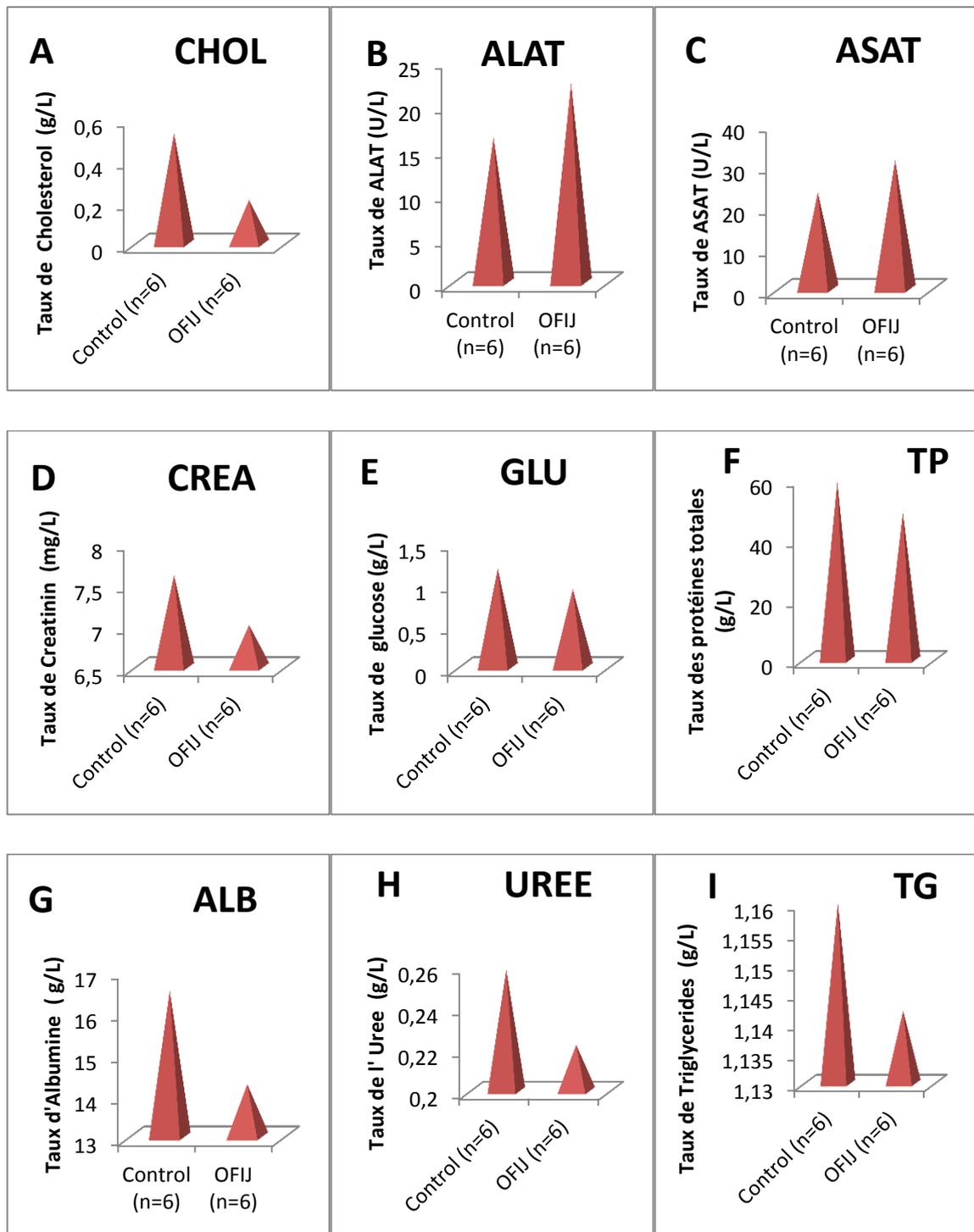


Figure 45: Paramètres biochimiques des lapins traités par EAq d'*O.f.indica* comparés au lot témoin après 12 semaines.

Dans la présente étude, nous avons constaté que l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* a pu jouer un rôle crucial dans la baisse de la concentration sérique de glucose, soit par la stimulation de la sécrétion de l'insuline, soit par une action extra-pancréatique et donc par l'influence de l'absorption de glucose et son utilisation par les différents tissus. L'administration de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* aux lapins a baissé la concentration sérique du glucose de 21,186 % après le troisième mois du traitement.

Ces résultats viennent donc confirmer les premières conclusions de Frati A.C et *al.*, 1990 et Godard M.P et *al.*, 2010 qui ont constaté que l'administration de l'extrait d'*Opuntia ficus indica* provoque une diminution significative de la glycémie.

L'effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* peut être assimilé à la fois aux constituants organiques qu'aux constituants inorganiques. Entre autre, il est important de noter que les constituants inorganiques que les plantes médicinales contiennent jouent parfois un rôle primordial dans l'amélioration de leurs propriétés médicinales y compris l'activité hypoglycémiant. En effet, Bhaskar et *al.*, (2008), ont étudié l'effet hypoglycémique de l'extrait aqueux de *Mucuna pruriens* « 200 mg/kg » chez des rats rendus diabétique par STZ, indiquent qu'un certains nombres de minéraux essentiels tels que Na, K, Ca, Zn, Mg, Fe, Cu et Mn peuvent être associés à un mécanisme de libération de l'insuline et de son activité.

Certains flavonoïdes, qui ont été isolés des plantes, inhibent les transporteurs du glucose dans les intestins, diminuent l'expression des gènes qui contrôlent la néoglucogenèse, augmentent le stockage du glucose dans le foie et réduisent la dégradation du glycogène (Waltner-Law et *al.*, 2002 ; Li et *al.*, 2004 ; Sarkhail et *al.*, 2007).

Un grand nombre de travaux de recherche ont montré l'effet hypoglycémique de plusieurs plantes contenant des polysaccharides, des terpènes, des flavonoïdes ainsi que plusieurs d'autres composés selon plusieurs mécanismes (Sarkhail et *al.*, 2007). Nos résultats de screening phytochimique et les études de la littérature ont montré que *Opuntia ficus indica* est riche par les composés phénoliques donc il est possible que l'action hypoglycémiant de la plante soit liée à la présence de ces composés.

Dans notre étude, on a enregistré une diminution de la concentration sérique du cholestérol total et des triglycérides. Plusieurs auteurs rapportent que la baisse de la

concentration sérique des lipides par un régime ou des médicaments thérapeutiques diminue fortement les risques de maladies coronaires (Eddouks et al., 2007).

Nous avons constaté que chez les lapins expérimentés, un traitement de trois mois par un extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* (dose 100mg/kg) a permis de réduire la concentration sérique du cholestérol total avec une baisse de 60.571 % par rapport aux lapins témoins.

Ces résultats obtenus sont en accord avec ceux publiés par *Oguogho A. et al.*, (2009) et *Ennouriet M et al.*, (2007) qui ont constaté que chez des rats un traitement par l'extrait d'*Opuntia ficus indica* provoque une diminution significative de la concentration plasmatique du cholestérol total par rapport à celle observée chez les témoins sains.

Le mécanisme sous-jacent par lequel l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* a exercé son effet hypocholestérolémiant semble être par une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol, par liaison avec des acides biliaires dans l'intestin et par l'augmentation d'excrétion biliaire (Kritchevsky, 1978).

D'autre part, on a également constaté que l'administration journalière de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* pendant trois mois provoquait une baisse non significative de la concentration sérique des triglycérides chez le groupe des lapins traités (1.551 %) par rapport au groupe témoin.

L'*Opuntia ficus indica* a pu réduire le taux sérique des triglycérides par diminution de la synthèse des acides gras (Bopanna et al., 1997), augmentation du catabolisme des LDL, activation de la LCAT et des lipases tissulaire (Khanna et al., 2002).

Un grand nombre de travaux de recherche ont montré l'effet hypolipidémique de plusieurs flavonoïdes, terpènes et d'autres composés phénoliques (Sarkhail et al., 2007). Donc l'effet hypolipidémique de l'*Opuntia ficus indica* peut être lié à la présence de certaines de ces molécules.

Les paramètres biochimiques ont montré une augmentation non significative des enzymes ASAT et ALAT concluant à un impact positif de l'extrait aqueux sur la fonction hépatique. (Ncibi S et al., 2008).

L'Albumine est une protéine synthétisée essentiellement par le foie, c'est le constituant majeur des protéines plasmatiques. L'albumine peut être diminuée dans les maladies chroniques du foie (Kaplan et al., 2007). Nos résultats montrent la diminution de ce constituant après 3mois de traitement mais de manière non significative.

1.3 Test de toxicité sur larves d'*Artemia salina*.

Après avoir exposé des larves du stade *nauplii* de l'espèce *Artemia* aux différentes concentrations des six extraits pendant 24 h, le taux de mortalité varie selon les concentrations (Tableau 36).

Tableau 36 : Pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia* en fonction de la concentration des six extraits d'*O.f.indica* après 24 heures d'exposition.

Extraits	Doses testées %		Conditions de T° et H.R		% Mortalité après 24h	
	N de larves	Concentration µg/ml	T °c	H.R %	% Mortalité Témoin	% Mortalité
EEp	10	100	28	25	0	0
		250				3,33
		500				26,66
		1000				46,66
EChl	10	100	28	25	0	0
		250				3,33
		500				16,66
		1000				66,66
EMet	10	100	28	25	0	6,66
		250				10
		500				30
		1000				73,33
EAc	10	100	28	25	0	0
		250				13,33
		500				26,66
		1000				53,33
EBut	10	100	28	25	0	0
		250				15
		500				40
		1000				80
EAq	10	100	28	25	0	15
		250				26,66
		500				55
		1000				90
Sulfate de cuivre	10	100	28	25	0	100
		250				100
		500				100
		1000				100

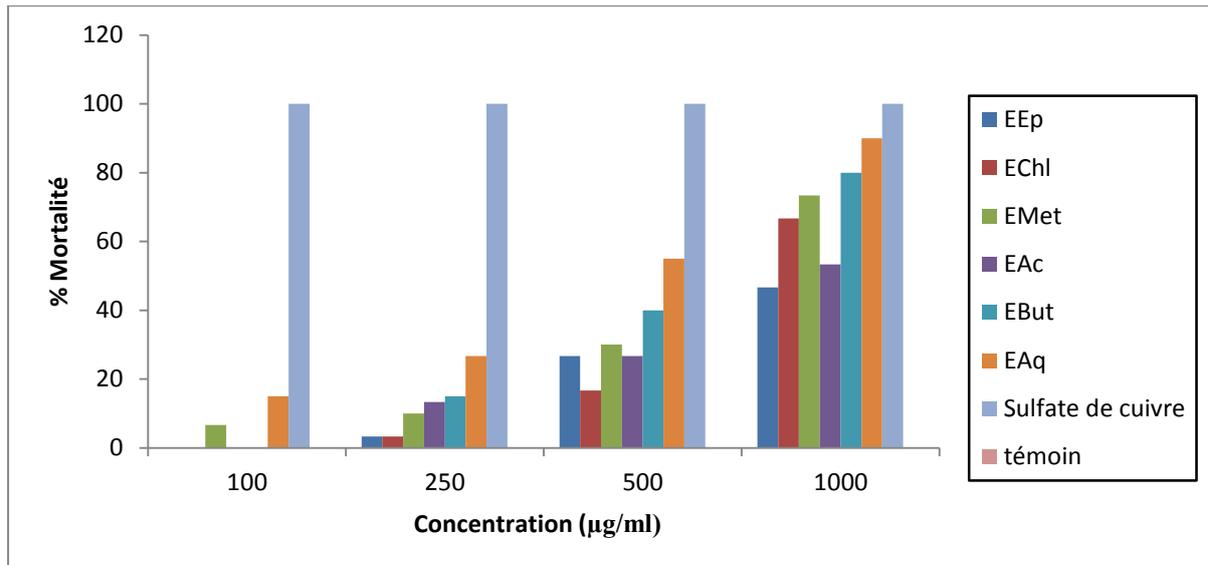


Figure 46 : Pourcentages de mortalité des larves suivant les extraits d'*O.f.indica* testés.

Pour tous les extraits, la mortalité des larves varie entre 0 et 90 %. Alors que chez le référent toxique sulfate de cuivre elle atteint le taux maximal 100%.

De l'ensemble de ces résultats, un premier classement de l'efficacité toxique des extraits testés est mis en évidence (figure 46). Ainsi les extraits qui ont donné un taux de mortalité sur les larves plus que les autres sont : l'extrait aqueux et l'extrait butanolique. Par revanche l'extrait d'éther de pétrole a donné le taux le plus faible.

Tableau 37 : Concentrations létales CL50 et CL95 (24 h) des six extraits d'*O.f.indica* à l'égard des larves d'*Artemia*

Extraits	CL50 (µg/ml)	CL95 (µg/ml)
EEp	1030,78 ± 0,324	1859,513 ± 0,536
EChI	832,232 ± 0,674	1419,699 ± 0,736
EMet	721,994 ± 0,215	1305,652 ± 0,326
EAc	926,097 ± 0,541	1708,706 ± 0,764
EBut	646,049 ± 0,338	1154,524 ± 0,592
EAq	501,793 ± 0,156	1035,601 ± 0,437

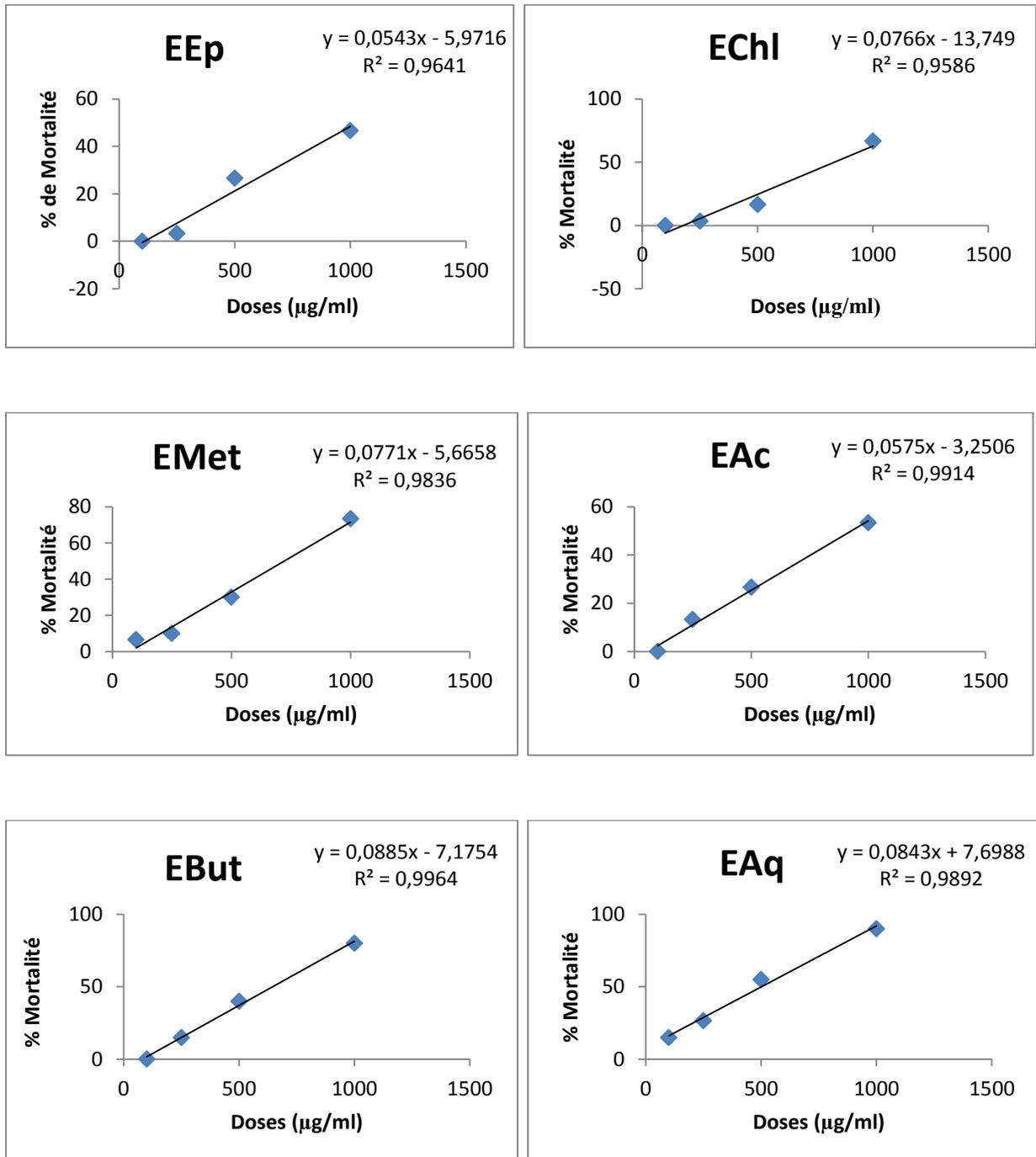


Figure 47: Détermination de la DL50 chez les différents extraits d'*O.f.indica* estimée par la méthode de Reed et Muench (1938)

Selon la classification d'Abbott et les résultats de CL50 des différents extraits obtenus (tableau 37), nous avons classé nos extraits D'EChI, EMet, EAc, EBut et EAq dans la catégorie des substances faiblement toxique, alors que l'extrait d'éther de pétrole dans la catégorie des substances non toxique.

2. Activité Hypo et Antihyper-glycémiant de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica*

2.1 Essais chez des lapins normoglycémiques

L'Administration de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* à la dose de (200mg/kg, per os), chez des lapins normo-glycémiques entraîne une baisse significative de la glycémie de base chez des lapins au bout de 1 heure d'observation. ($0,91 \pm 0,03$ à $0,85 \pm 0,04$) ($p < 0,001$; $n = 6$). (Tableau 38 ; Figure 48).

Tableau 38 : Effet de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* sur la glycémie de base des lapins normo-glycémiques

Lots		Glycémies (g/l de sang)			
		H0	60 mn	120 mn	180 mn
Témoïn		$0,91 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,02$
Extrait Aqueux	200mg/kg	$0,91 \pm 0,03$ Injection	$0,85 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,05$	$0,79 \pm 0,03$
	% Réduction	0	3,40	3,48	7,05

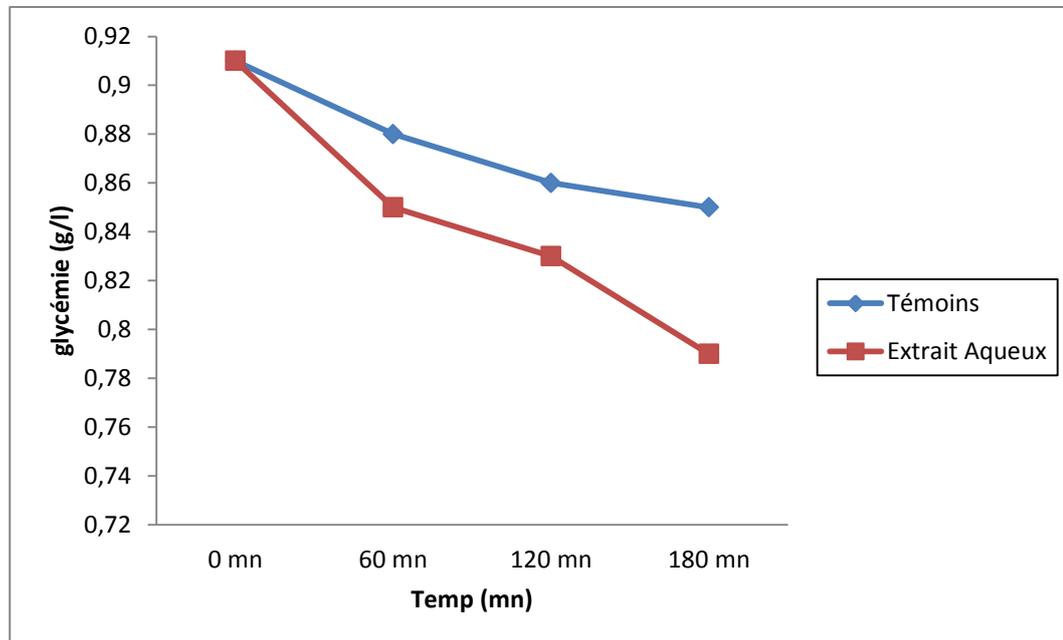


Figure 48 : Effet de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* sur la glycémie de base

2.2 Essais chez des lapins en hyperglycémie temporaire

Chez un groupe de lapins-témoins, l'administration de glucose à la dose de 4g/kg per os entraîne une hyperglycémie significative avec un pic qui apparaît au bout de 30 mn. La glycémie varie de $1,02 \pm 0,07$ à $2,03 \pm 0,04$ g/l ($p < 0,001$; $n = 6$). Chez des lapins préalablement traités avec de l'extrait aqueux (200mg/kg, per os), la variation de la glycémie obtenue après administration du glucose est moins importante que celle du groupe témoin ($1,01 \pm 0,03$ à $1,59 \pm 0,05$ g/l) ($p < 0,05$; $n = 6$). (Tableau 39 ; Figure 49)

Tableau 39 : Effet de l'extrait d'*Opuntia ficus indica* sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale

Lots	Doses	Glycémies (g/l de sang)				
		- 90 mn	30 mn	60 mn	120 mn	180 mn
Témoin	Eau distillée	1,02 ± 0,07	2,03 ± 0,04	1,75 ± 0,02	1,40 ± 0,05	1,19 ± 0,04
Extrait aqueux	200mg/kg	1,01 ± 0,03	1,59 ± 0,05	1,37 ± 0,04	1,24 ± 0,03	0,93 ± 0,03

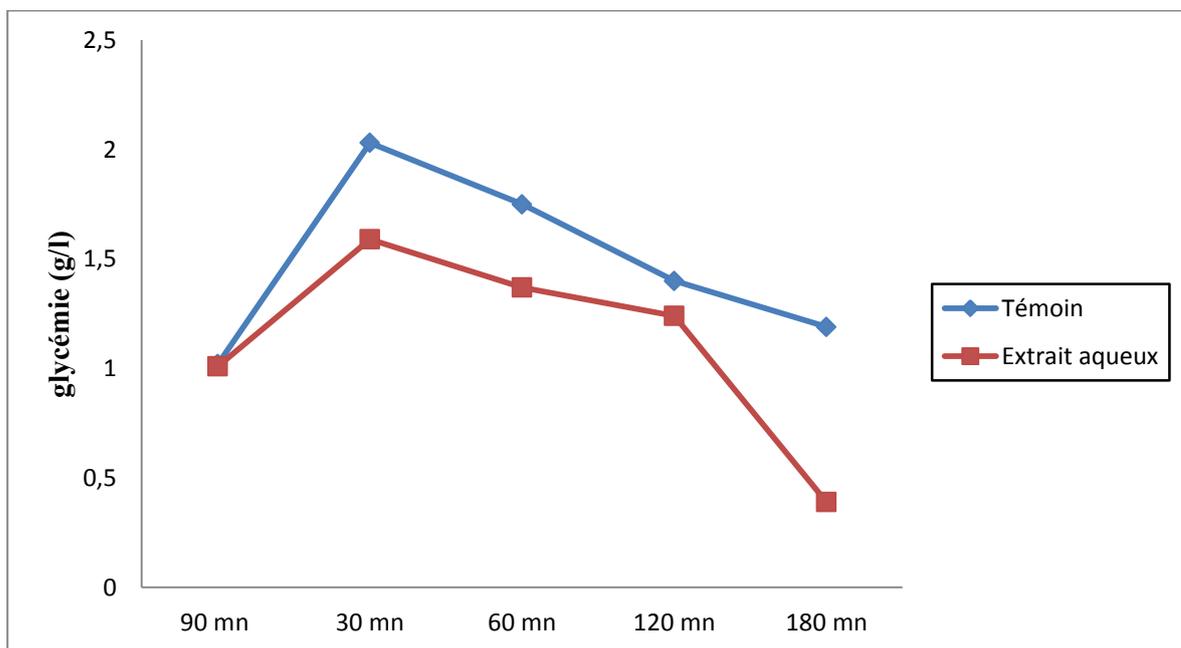


Figure 49 : Effet de l'extrait aqueux sur l'hyperglycémie provoquée par voie orale

Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'activité hypo-glycémiant de l'extrait de raquettes d'*Opuntia ficus indica*. Les résultats obtenus montrent l'effet hypo-glycémiant sur la glycémie de base des lapins normo-glycémiques de l'extrait aqueux, 1 heure après administration, à une dose de 200mg/kg. Ces résultats suggèrent que les composés responsables de cet effet hypoglycémiant de raquettes d'*Opuntia ficus indica* qui sont extractibles dans l'eau seraient plutôt des substances à groupements polaires. En effet, la variation de baisse de la glycémie est de $0,85 \pm 0,04$ g/l. Cette observation nous a amené à tester l'activité anti-hyperglycémique de l'extrait aqueux sur le modèle d'hyperglycémie provoquée par voie orale. Sur ce modèle, l'extrait (200mg /kg, per os) entraîne une baisse significative de la glycémie ($0,93 \pm 0,03$ g/l).

Les résultats de cette étude sont en accord avec les travaux d'Andrade I.C et *al.*, (1997), Manpreet Kaur et *al.*,(2012) qui montrent l'effet hypoglycémiant chez les différents espèce de genre *Opuntia*.

L'activité de l'extrait de la plante contient des polyphénols dans la régulation de la glycémie sur des modèles d'animaux diabétique a été décrite par Ragunathan. V et *al.*, (1994).

Nos résultats ont montré la présence des polyphénols dans les extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica*. Ces composés sont extractibles dans l'eau. Ceci pourrait expliquer au moins en partie les bases pharmacologiques de l'activité hypoglycémiant et antidiabétique de l'extrait aqueux de raquettes d'*Opuntia ficus indica*.

Cependant, les résultats de la présente étude sont en accord avec les travaux de Cunha et *al.*, (2008), de Dhanabal et *al.*, (2007), d'Adeneye et *al.*, (2007) et de Puri (2001) sur les flavonoïdes respectivement de la plante *Leandra lacunosa*, *Nymphaea stellata*qui, *Musanga cecropioide* et de *Biophytum sensitivum*, où ils ont été prouvés l'activité antihyperglycémique des flavonoïdes chez les rats

D'autres auteurs (Esmaili et Yazdanparas, 2004 ; Sharma et *al.*, 2006 ; Shipra et *al.*, 2009) ont démontré que les extraits flavonoïque des plantes *Eugenia jambolana*, *Cassia auriculata* L et *Teucrium polium* stimulent et régénèrent les cellules β du pancréas.

3. Etude de l'effet hémolytique des extraits d'*Opuntia ficus indica* *in vitro*

Les courbes ci-dessous représentent le pourcentage des cellules restantes en fonction de la concentration des extraits d'*Opuntia ficus indica* (Figure 51)

Après l'incubation *in vitro* des globules rouges des lapins avec des concentrations variables des extraits, on a observé une diminution de taux de cellules restantes en fonction de la concentration.

Les concentrations des extraits provoquant 50% d'hémolyse sont mentionnées dans le tableau 40 et figure 50

Tableau 40 : Concentrations des extraits provoquant 50% d'hémolyse

Extraits	EEp	EChI	EMet	EAc	EBut	EAq	Saponine
IC50 (mg/ml)	1,538 ± 0,054	1,313 ± 0,054	0,538 ± 0,084	0,389 ± 0,043	1,587 ± 0,067	0,606 ± 0,021	0,328 ± 0,045

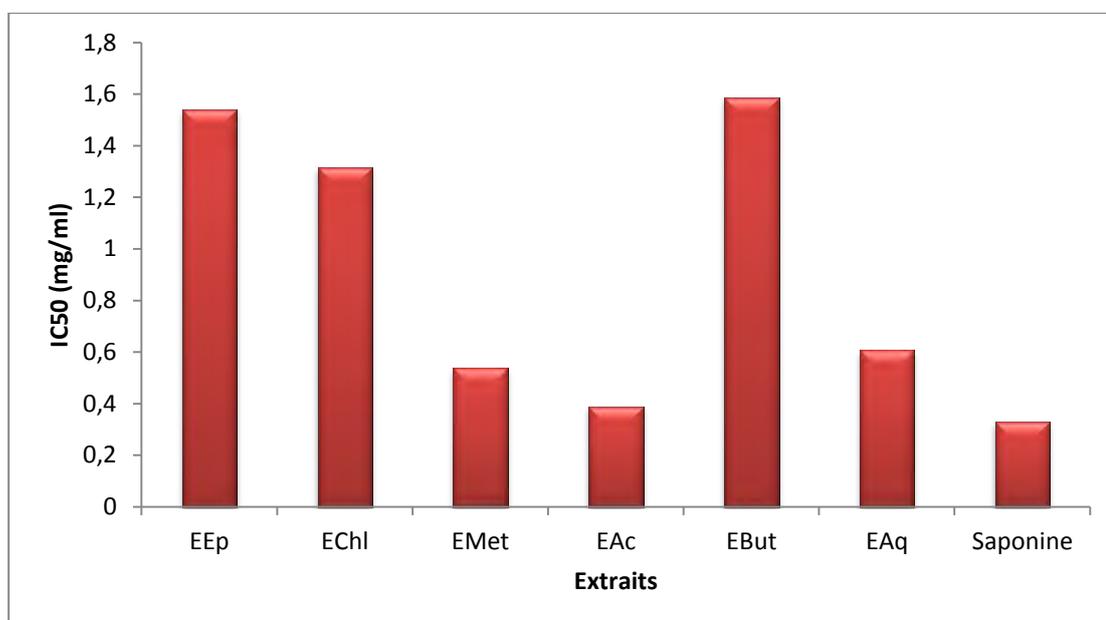


Figure 50 : Histogramme des concentrations des extraits provoquant 50% d'hémolyse

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des augmentations des absorbances (taux d'hémolyse) durant les 60 min d'incubation des érythrocytes isolés en présence des différentes concentrations des extraits testés d'*O.f.indica*.

De même, nous avons noté que le pourcentage des cellules restantes diminue en fonction des concentrations. Les doses provoquant 50% d'hémolyse sont de $1,538 \pm 0,054$; $1,538 \pm 0,054$; $0,538 \pm 0,084$; $0,389 \pm 0,043$; $1,587 \pm 0,067$; $0,606 \pm 0,021$ mg/ml pour l'EEp, EChl, EMet, EAc, EBut et EAq respectivement. Ces valeurs sont largement supérieures par rapport à la valeur d'IC50 de tube d'hémolyse total effectué par le Saponine, qui égale à $0,328 \pm 0,045$ dans les mêmes conditions.

Les globules rouges ont été choisis comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro* à cause de leurs facilités d'isolement et leurs simplicités. Ils sont un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaire via la membrane érythrocytaire (Wajeman et al., 1992).

Les résultats de l'effet hémolytique des différents extraits de raquettes d'*O.f.indica*, ont montré que cette plante présente un effet toxique faible face aux érythrocytes isolés par rapport à l'hémolyse totale. L'étude statistique de ces valeurs a montré qu'il existe une différence très hautement significative ($P < 0,0001$) entre les tubes d'hémolyse totale avec la saponine et les tubes traités avec les extraits.

Les propriétés hémolytiques sont attribuables à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire ; l'interaction induit une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions: entrée de Na^+ et H_2O , sortie de K^+ , la membrane éclate, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine (majester-savornin, 1991).

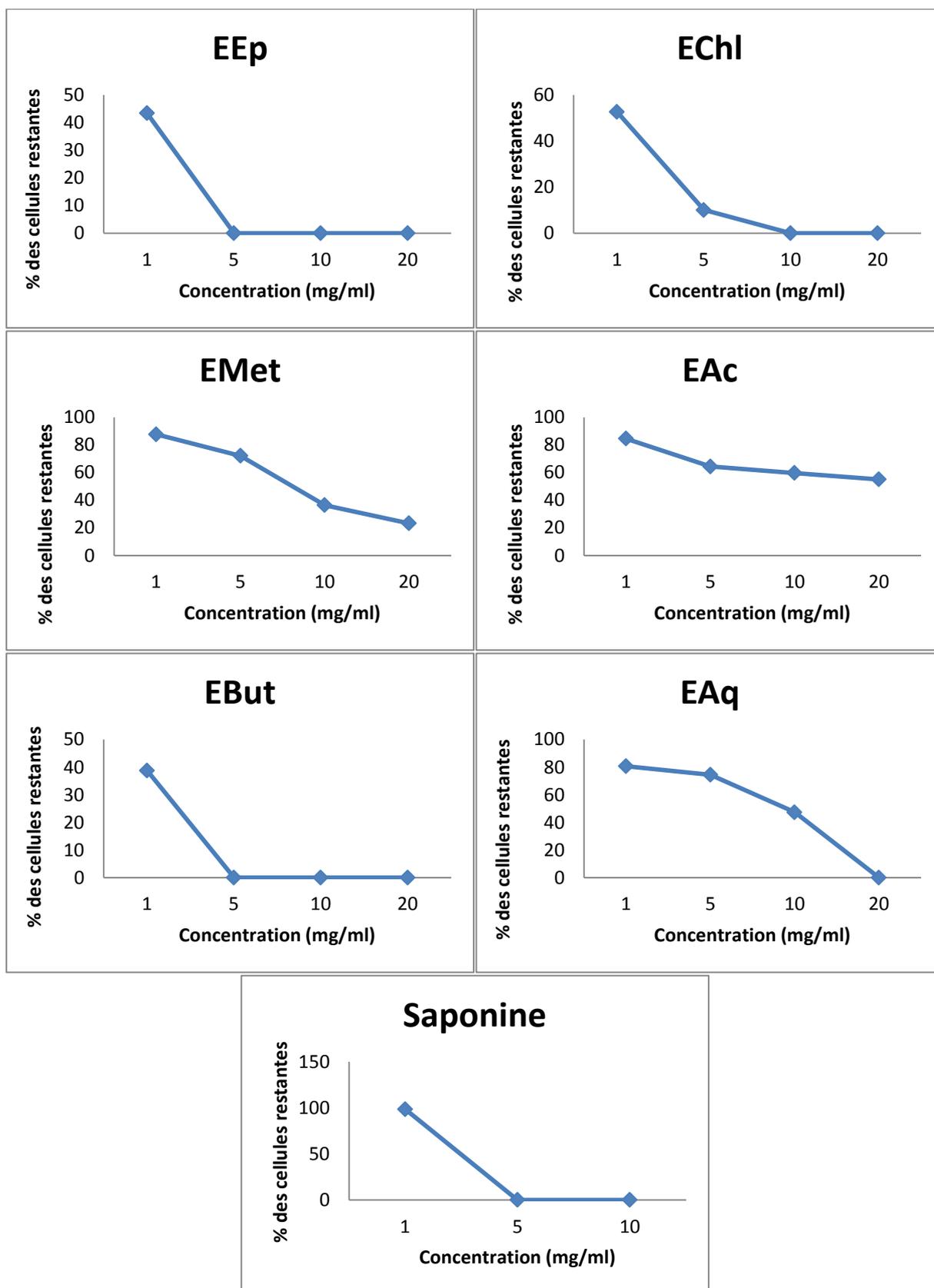


Figure 51: Pourcentages des cellules restantes du sang des lapins après traitement par des extraits d'*O.f. indica*.

4. Détermination de l'activité antalgique

4.1 Test de torsion « méthode de l'acide acétique »

Le groupe témoin ayant reçu de l'eau physiologique présente après injection intrapéritonéale de l'acide acétique à 1%, une moyenne de contorsions de $95 \pm 6,71$ sur une durée de 20 minutes. Le temps de latence d'apparition de ces contorsions est de 5 minutes (Tableau 41).

L'administration per os de l'Aspirine à la dose de 100 mg/kg, prévient de façon significative l'apparition de contorsions liées à l'administration de l'acide acétique ($28 \pm 2,160$ vs $95 \pm 6,71$) ($p < 0,0001$; $n=6$) (Tableau 41).

L'administration per os de l'extrait aqueux de raquettes d'*O.f.indica* prévient de façon dose dépendante, l'apparition de contorsions chez les rats.

Avec les doses 1000, 2000 et 3000 mg/kg de l'extrait aqueux, les contorsions observées sont significativement différentes de celles observées avec le groupe témoin ($67.5 \pm 3,5$; $53.66 \pm 2,054$ et $31,5 \pm 3,5$ respectivement ($p < 0,0001$, $n=6$) (Tableau 41).

Tableau 41 : Etude de l'activité antalgique de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* à l'acide acétique

Lots	Nombre de crampes (NC)	pourcentage d'inhibition (PI)
Lot Témoin	95 ± 15	-
Lot1 : 1000mg/Kg	$67.5 \pm 3,5$ ****	28,947
Lot2 : 2000mg/Kg	$53,66 \pm 2,054$ ****	43,515
Lot3 : 3000mg/Kg	$31,5 \pm 3,5$ ****	66,842
Lot4 : Aspirine	$28 \pm 2,160$ ****	70,526



Figure 52: Effet de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* sur la douleur induite par l'Acide acétique chez le rat

4.2 Test de la plaque chauffante

L'extrait aqueux d'*O.f.indica* aux doses de 1000, 2000 et 3000 mg/kg et l'Aspirine à la dose de 100mg/Kg augmentent significativement le temps de réaction sur la plaque chauffante par rapport aux témoins.

Ce temps est de $2,19 \pm 0,292$ sec pour les témoins alors qu'il est de $2,90 \pm 0,935$ sec ($P < 0,0001$) ; $4,17 \pm 0,676$; $5,02 \pm 0,714$ respectivement pour les lots traités et de $5,20 \pm 0,736$ sec ($P < 0,0001$) pour le lot d'aspirine. (Tableau 42)

Tableau 42 : Etude de l'activité antalgique de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* sur la plaque chauffante

Lots	Le temps de la réaction (sec)
Lot Témoin	$2,19 \pm 0,292$
Lot1 : 1000mg/Kg	$2,90 \pm 0,935$ ****
Lot2 : 2000mg/Kg	$4,17 \pm 0,676$ ****
Lot3 : 3000mg/Kg	$5,02 \pm 0,714$ ****
Lot4 : Aspirine	$5,20 \pm 0,736$ ****

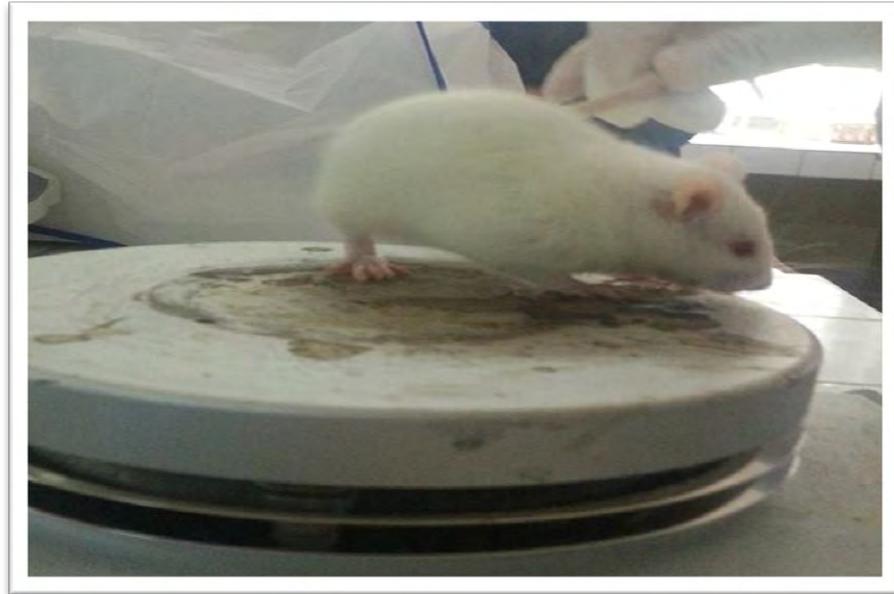


Figure 53 : Effet de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* sur la douleur induite par la plaque chauffante chez le rat

4.3 Test de Tail-flick

Aux trois doses étudiées, l'extrait aqueux d'*O.f. indica* augmente significativement le temps de réaction. Cet effet est plus important aux doses de 2000 et 3000 mg/kg et comparable à celui de l'Aspirine 100 mg/kg (Tableau 43).

Tableau 43: Etude de l'activité antalgique de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* par la méthode de tail-flick

Lots	Le temps de la réaction (sec)
Lot Témoin	2,32 ± 0,499
Lot1 : 1000mg/Kg	4,37 ± 0,798****
Lot2 : 2000mg/Kg	5,22 ± 0,375****
Lot3 : 3000mg/Kg	6,27 ± 0,314****
Lot4 : Aspirine	6,72 ± 0,476****



Figure 54: Le test Tail-flick chez le rat

La majorité des groupes chimiques présents dans l'extrait aqueux d'*O.f.indica*, comme les tanins, les saponosides, les flavonoïdes, les coumarines et les anthocyanosides, sont extractibles par l'eau. L'eau semble être le meilleur solvant pour extraire la majorité des constituants chimiques responsables des différentes activités biologiques, ce qui démontre la pertinence de la forme traditionnelle d'utilisation. (Ekoumou C., 2003)

Selon des études antérieures, l'activité analgésique des extraits serait due à la présence de stérols (campestérol, B-sitostérol, lupéol), saponines, composés phénoliques ou alcaloïdes. L'effet antalgique de ces composés est confirmé dans plusieurs plantes médicinales comme *Aloe vera*, *Jatropha curcas*, *Jasminum amplexicaule*, *Ficus glome rata*, *Stylosanthes fruticosa*, *Elephantopus tomentosus* et *Citrullus colocynthis*.

L'extrait aqueux présente une activité analgésique selon le test de torsion, de la plaque chauffante et de Tail-flick. Aux doses de 1000 mg/kg, 2000 mg/kg et 3000 mg/Kg de poids corporel, a donné des résultats comparables à celui de l'effet antalgique de l'Aspirine administré à la dose de 100 mg/kg.

L'administration intrapéritonéale (i.p.) d'acide acétique chez les rats a entraîné de vives contractions abdominales. Ces contractions sont dues à la production et à la libération des médiateurs algogènes via les cyclooxygénases (COX) et la biosynthèse des prostaglandines (Elisabetsky et *al.*, 1995), notamment la PGE2 produite par la COX-1. Ces médiateurs libérés sensibilisent les nocicepteurs cholinergiques et histaminiques péritonéaux.

Le test à l'acide acétique permet la mise en évidence des effets analgésiques de faibles intensités, mais ce potentiel analgésique est non spécifique (Vogel et Vogel, 1997) car, il n'est pas possible d'indiquer si ce potentiel analgésique résulte d'une action périphérique ou centrale (Asongalem et *al.*, 2004).

L'administration de l'aspirine (100mg/kg) en traitement préventif aux rats a inhibé de façon significative l'action algogène de l'acide acétique. Cette activité analgésique de l'aspirine résulte de la suppression de la formation des médiateurs de la douleur dans les tissus périphériques, car elle inhibe l'activité de la COX-1 et de la COX-2 (Hirose et *al.*, 1984).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux d'*O.f.indica* présente un effet analgésique significatif en réduisant le nombre de contorsions abdominales à toutes les doses. Ceci suggère que l'extrait posséderait des composés qui agiraient selon le même mécanisme que l'aspirine, et par ce fait, inhiberait la COX-1 et la COX-2, empêchant la synthèse des prostaglandines. Tous les analgésiques étant doués de la propriété d'inhiber les contorsions abdominales induites par l'acide acétique, ce test est utile pour effectuer un premier tri des substances possédant une action analgésique (Le Bars et *al.*, 2001), mais ne permet pas de donner avec précision le mode d'action de la substance testée.

L'activité analgésique centrale de l'extrait a été évaluée en testant son effet sur la douleur induite par un stimulus thermique (la plaque chauffante) et le test de Tail-flick chez les rats. Pour ces deux tests, seuls les analgésiques centraux augmentent le temps de latence au saut de l'animal (Paola et *al.*, 1997).

Les résultats découlant de cette étude montrent que l'Aspirine (100 mg/kg) a inhibé significativement la douleur dans les deux tests.

L'aspirine agit au niveau central et son pouvoir analgésique est dû à une activité agoniste des récepteurs opioïdiques μ , associée à une activité inhibitrice de recapture neuronale de la sérotonine et de la noradrénaline. Cette activité est renforcée par le contrôle descendant inhibiteur au niveau spinal (Paola et al., 1997). L'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* a significativement inhibé la douleur de manière dose dépendante induite par la chaleur. Ces résultats suggèrent que l'extrait agirait via les mêmes mécanismes que l'Aspirine et serait par conséquent un inhibiteur des processus centraux de la douleur.

Dans tous ces tests, la dose de 3000 mg/kg a été plus efficace et a significativement inhibée les différents modèles de douleur comparée au témoin négatif traité avec l'eau distillée. A l'issue de ces résultats, il ressort que l'extrait aqueux de raquettes d'*Opuntia ficus indica* posséderait des propriétés analgésiques centrale et périphérique. Des résultats similaires ont été obtenus par Dongmo et al. (2005) avec la fraction butanolique d'*Acacia pennata* et Malainine M-E et al. (2001) qui ont montré que la fraction alcoolique de raquette d'*Opuntia ficus indica* présente des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires.

5. Effet des extraits d'*Opuntia ficus indica* sur la cicatrisation chez le lapin

Au cours de la période d'expérimentation, aucune mortalité n'a été observée chez les animaux.

Tous les lapins ont été en bonne santé et ils ont été disponibles pour l'évaluation. Les paramètres morphologiques ont été utilisés pour évaluer l'efficacité des extraits d'*Opuntia ficus indica* pour la cicatrisation des plaies, comparativement aux brûlures non traitées.

5.1 Essais sur les plaies de brûlures thermiques.

➤ brûlures effectuées par un métal chauffé dans l'eau bouillante

Au J0, toutes les plaies avaient le même diamètre ainsi que les mêmes signes de l'inflammation.

Vers 24h à 48 h, la résorption de l'exsudat inflammatoire a été débutée. Cette étape a été achevée par une détersion complète en chronologie variable en fonction de chaque type de traitement. La durée la plus courte a été celle de l'extrait aqueux suivie par l'extrait méthanolique, et ensuite les plaies non traitées qui ont manifesté un retard de détersion.

Les pourcentages de contraction des plaies traitées avec les extraits aqueux et méthanolique d'*Opuntia ficus indica* ont été significativement plus élevés que le pourcentage de contraction des plaies non traitées du 2^{ème} au 24^{ème} Jour.

Les résultats de l'évolution des brûlures traitées avec les différents produits, ont été mentionnées dans le tableau 44, le pourcentage de contraction de la plaie est calculé chaque 3 jours jusqu'au 26^{ème} jour.

Il y a eu une réduction progressive de la surface de la plaie avec le temps. (figure 55 et 56).

Tableau 44 : Pourcentages de contraction des plaies de brûlures avec le métal chauffé dans l'eau bouillante.

Lots (n = 6)	Contraction de la plaie (%) Moyenne ±SD							
	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J21	J24
EAq	01,893 ± 1,35****	02,332 ± 1,77****	09,026 ± 0,56****	40,669 ± 1,42****	49,526 ± 0,62****	81,988 ± 2,01****	90,466 ± 1,37****	98,816 ± 1,05****
EMet	04,795 ± 0,44****	05,224 ± 0,23****	05,596 ± 1,11*	30,601 ± 1,46****	48,304 ± 0,77****	79,445 ± 0,55****	89,707 ± 1,08****	96,535 ± 1,34****
CRL	00,104 ± 0,57	02,229 ± 0,86	05,534 ± 2,11	13,328 ± 1,78	34,571 ± 0,89	56,473 ± 0,44	64,838 ± 1,56	70,947 ± 0,77

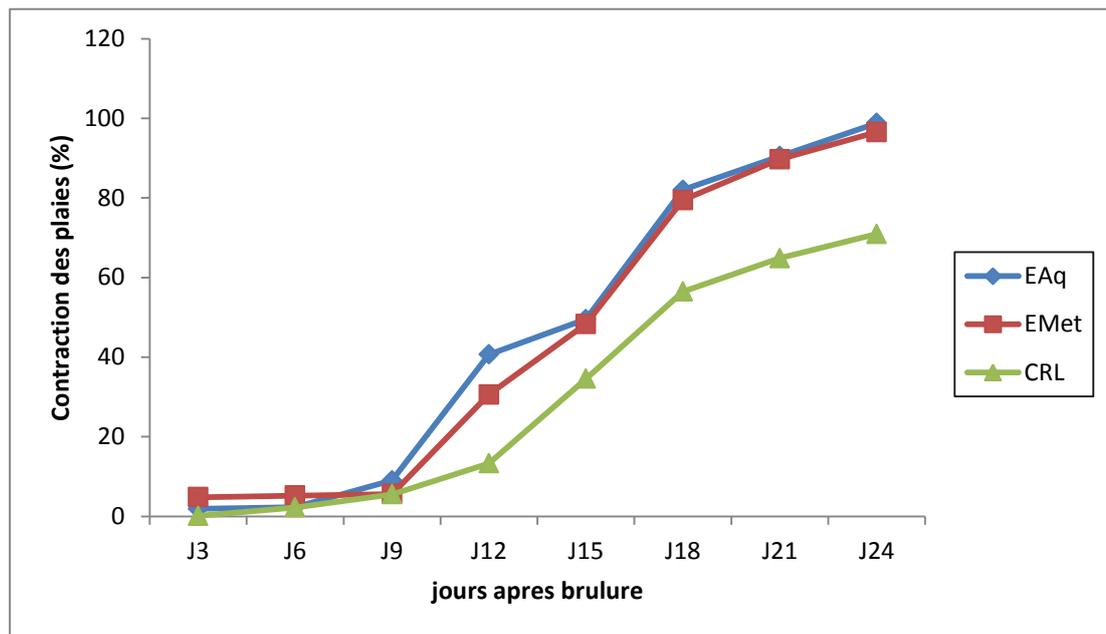


Figure 55: Schéma de pourcentages de contraction des plaies de brûlures avec le métal chauffé dans l'eau bouillante.

L'évaluation du processus de la cicatrisation a plusieurs approches telles que clinique, physique, physiologiques, biochimiques, histologiques et génétiques.

L'étude a adopté des paramètres morphologiques, y compris le pourcentage de contraction de la plaie et la période d'épithélialisation.

De J3 au J6, la contraction de la plaie a été mieux dans le groupe traité par l'extrait méthanolique par rapport aux deux autres groupes et cette différence était significative ($P < 0,0001$).

A partir de 6^{ème} jour, l'extrait aqueux a marqué une meilleure contraction que l'extrait méthanolique et le groupe témoin (CRL), et cette contraction a été significativement supérieure.

Au 15^{ème} jour l'extrait aqueux n'a pas amélioré le pourcentage de contraction de la plaie par rapport au méthanolique ($p > 0,05$), notant que ce pourcentage des deux groupes a été significativement supérieur ($p < 0,05$) par rapport au groupe non traité.

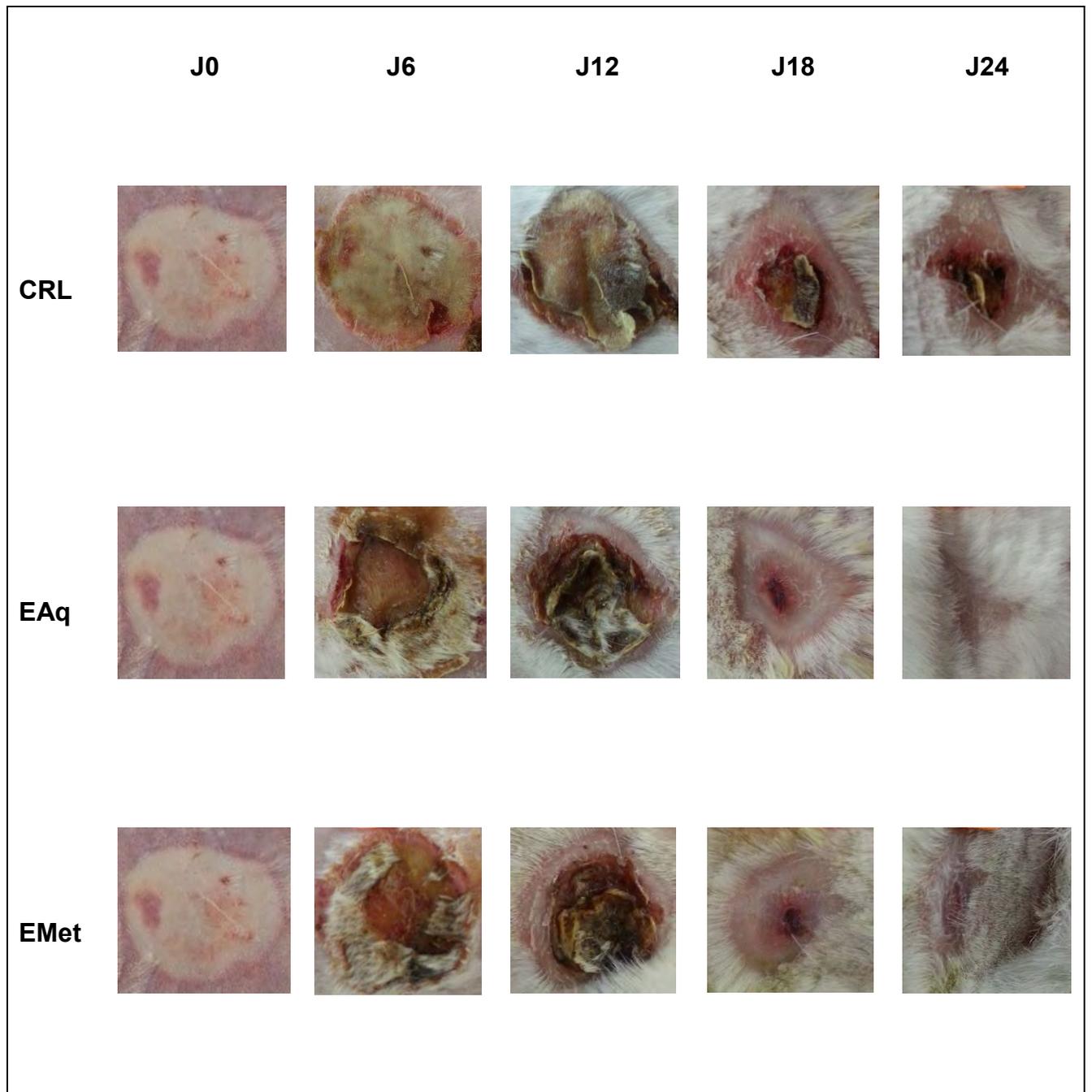


Figure 56: Chronologie de la cicatrisation des plaies de brûlures avec le métal chauffé avec l'eau bouillante chez le model lapin.

Aux jours 24, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre les deux extraits EAq et EMet, en outre les résultats ont montré un pourcentage de contraction de la plaie semblable, mais cette différence est significative par rapport au résultat obtenue avec le groupe non traité ($p < 0,0001$)

Notre étude a confirmé scientifiquement les propriétés curatives des extraits d'*Opuntia ficus indica* ; les extraits ont montrés une véritable activité de cicatrisation sur les brûlures expérimentales dans le modèle lapin, en diminuant la phase inflammatoire, favorisant la contraction de la plaie et en réduisant la période d'épithélialisation.

Selon la littérature, les raquettes d'*Opuntia* sont utilisées pour la régénération tissulaire et la réduction de l'inflammation, l'oedème et l'exsudation. Sa viscosité élevée offre une barrière de protection pour éviter l'infection des blessures, effectivement sceller la plaie (Molan, 1999).

➤ Brûlures effectuées par la plaque chauffante

Les résultats de pourcentage de contraction sont présentés au niveau du tableau 45 et la figure 57.

Tableau 45 : Evaluation du pourcentage de contraction des plaies effectuées par la plaque chauffante durant la période expérimentale

Lots (n = 6)	Contraction de la plaie (%) Moyenne \pm SD				
	J3	J6	J9	J12	J15
EAq	5,383 \pm 2,154****	9,997 \pm 4,563****	12,829 \pm 3,789****	78,567 \pm 4,739****	95,303 \pm 3,615****
EMet	4,620 \pm 5,342****	9,926 \pm 2,749****	12,002 \pm 4,504****	67,327 \pm 3,582****	88,545 \pm 3,648****
Cicatryl®	3,781 \pm 4,563*	9,710 \pm 2,573****	11,230 \pm 5,732****	48,395 \pm 3,854****	78,127 \pm 2,683****
CRL	3,609 \pm 1,435	9,645 \pm 3,951	9,966 \pm 2,714	38,77 \pm 3,093	63,924 \pm 4,982

Le 3^{ème} jour, les surfaces des plaies dans tous les lots sont sèches et ils ont montré un faible degré de gonflement.

La plupart des plaies dans les différents lots ont commencé à se contracter à partir du bord.

Du 6^{ème} au 9^{ème} jour, toutes les plaies ont montré un épaissement de la peau, et le pourcentage de contraction des groupes traités est faiblement changé par rapport au groupe contrôle.

Le jour 12, les plaies traitées par l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique d'*Opuntia ficus indica* ont montré une réduction remarquable de la taille avec un pourcentage de contraction de $78,567 \pm 4,739$ et $67,327 \pm 3,582$ respectivement par rapport au groupe de contrôle positif ($48,395 \pm 3,854$) et contrôle négatif ($38,77 \pm 3,093$)

Au jour 15, les plaies traitées avec l'EAq ont montré une exsudation modérée suivie par les plaies traitées avec l'EMet par rapport au deux autres les témoins positifs et négatifs. Le pourcentage de contraction est de $95,303 \pm 3,615$; $88,545 \pm 3,648$; $78,127 \pm 2,683$; $63,924 \pm 4,982$ respectivement. (Figure 58)

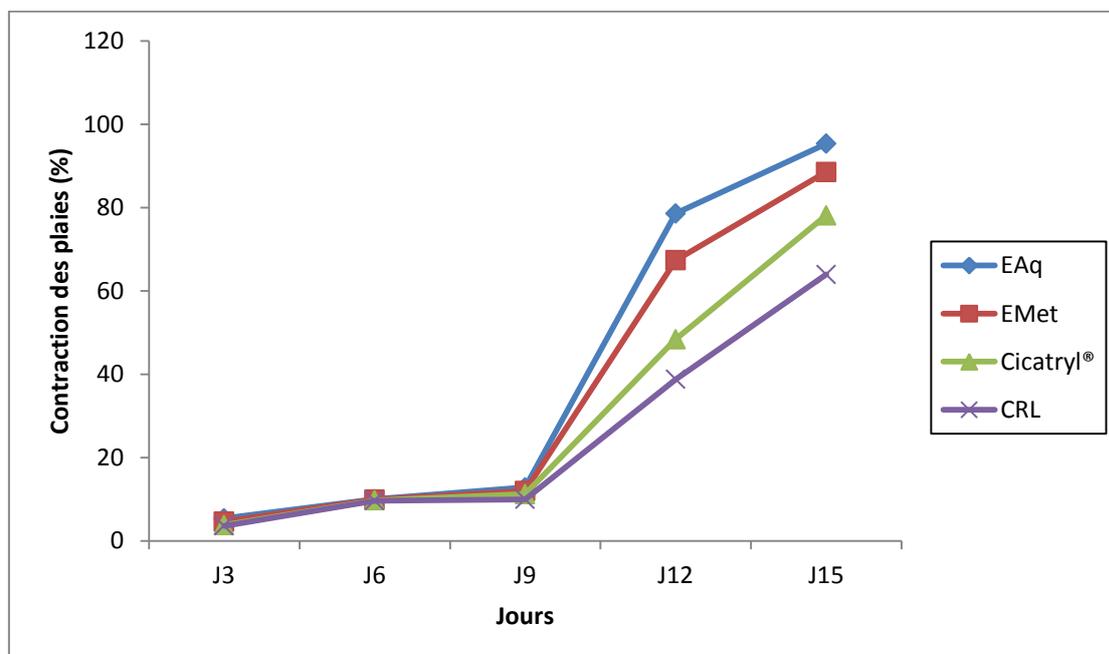


Figure 57: Schéma des pourcentages de contraction des plaies effectuées par la plaque chauffante durant la période expérimentale.

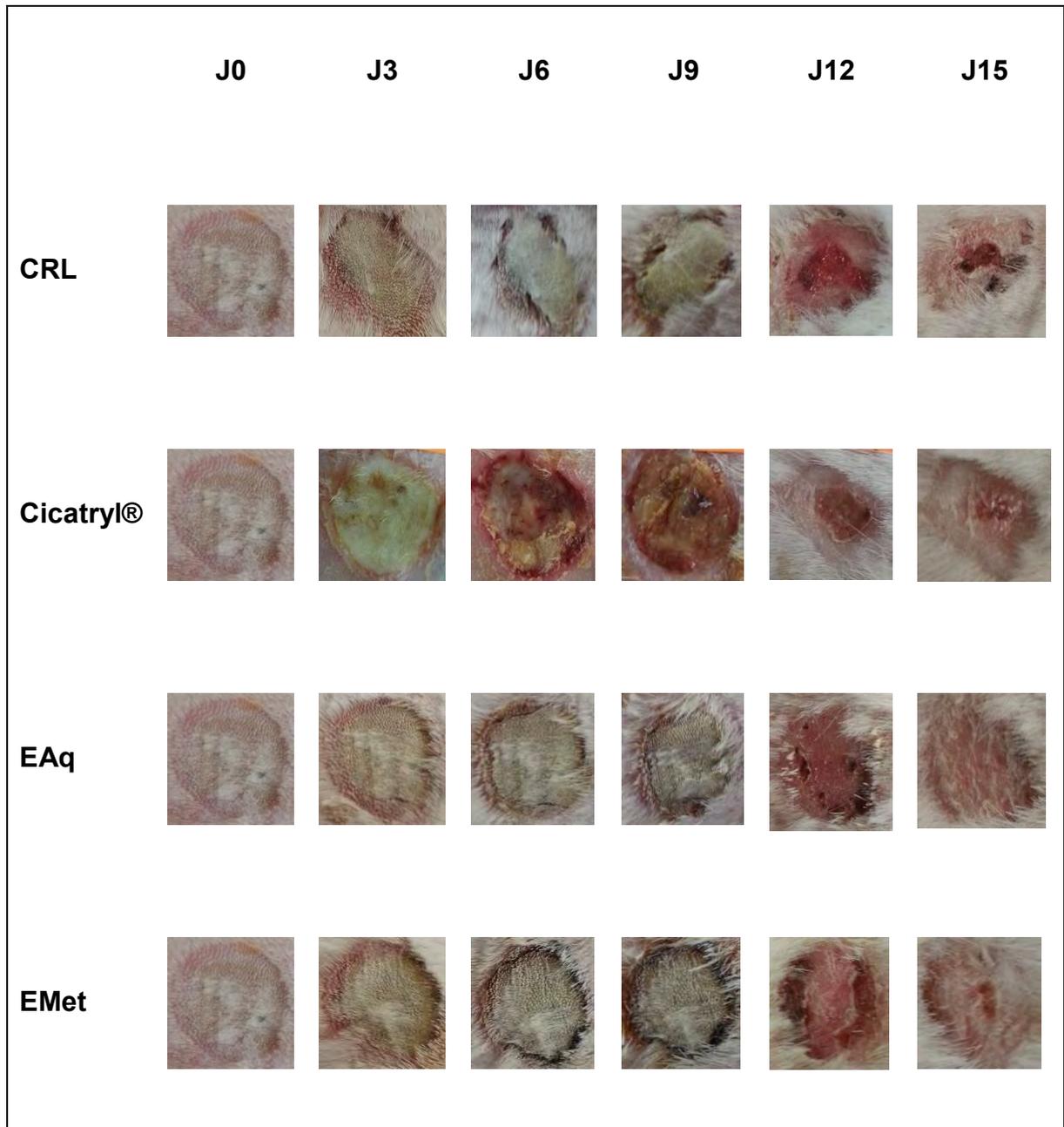


Figure 58: Chronologie de la cicatrisation des plaies effectuées par la plaque chauffante chez le model lapin.

5.2 Essais sur les plaies d'excision

Le tableau 46 répertorie l'évolution du pourcentage de contraction des plaies, leur moyennes et écart-type durant toute la période d'expérimentation (J0 à J9).

Tableau 46 : Evaluation du pourcentage de contraction des plaies d'excision durant la période expérimentale

Lots (n = 6)	Contraction de la plaie (%) Moyenne \pm SD		
	J3	J6	J9
EAq	11, 557 \pm 2,35****	45,605 \pm 8,851****	92,089 \pm 3,401****
EMet	7,269 \pm 3,247****	31,214 \pm 3,143****	78,089 \pm 4,342****
Cicatryl®	6,126 \pm 3,918****	29,609 \pm 8,802****	70,750 \pm 5,124 ^{Ns}
CRL	4,445 \pm 4,5	21,342 \pm 7,552	61,132 \pm 3,210

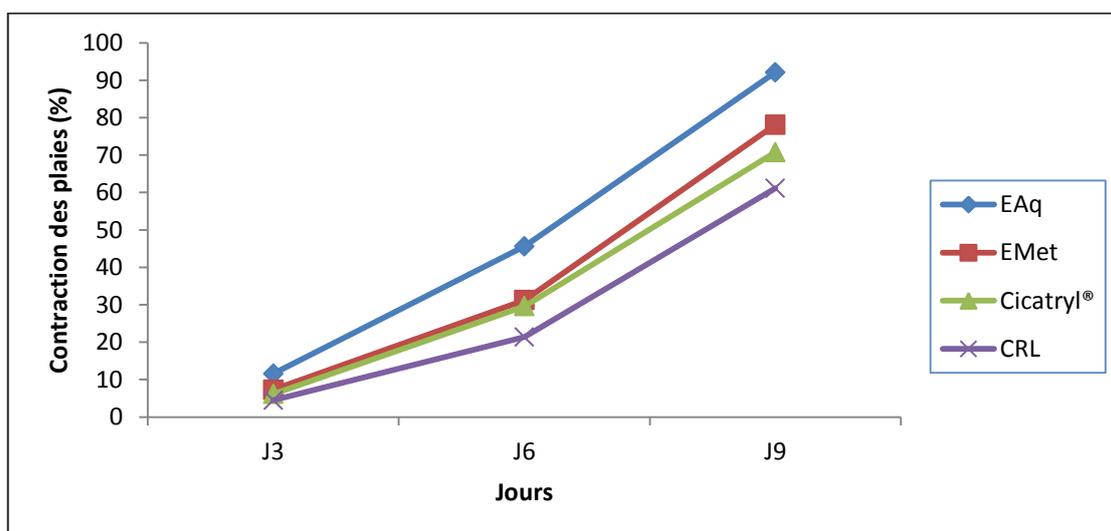


Figure 59: Schéma des pourcentages de contraction des plaies d'excision traitées et non traitées

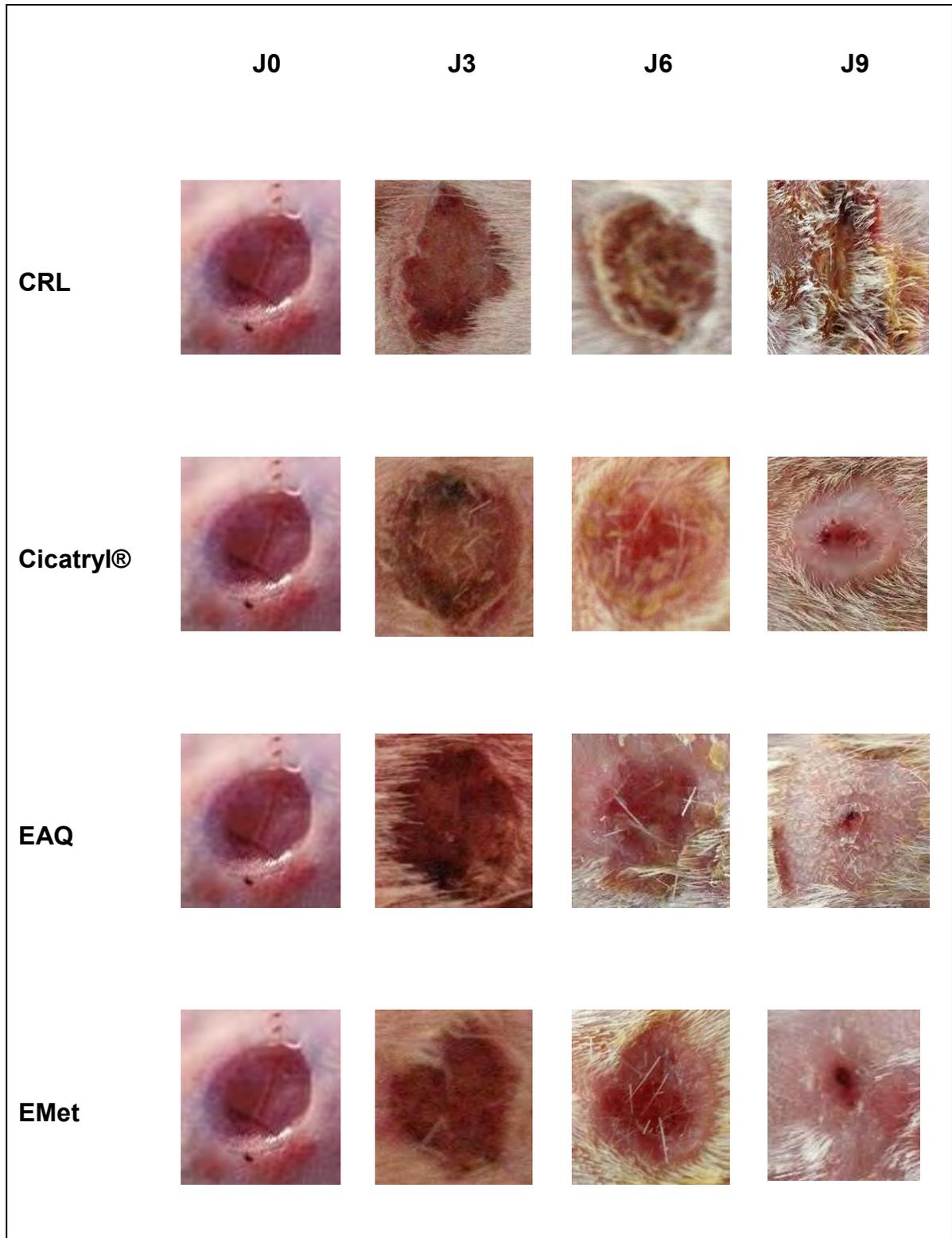


Figure 60: Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision chez le model lapin

On constate une réduction des surfaces des plaies dans les quatre lots mais de façon inégale. L'interprétation du tableau 46 nous donne les résultats ci-après :

Des différences proportionnellement égales à celles des plaies initiales se maintiennent durant les trois premiers jours de l'expérimentation entre le pourcentage de contraction des plaies traitées (Cicatryl®, EAq, EMet) et les témoins respectivement $6,126 \pm 3,918$; $7,269 \pm 3,247$; $11,557 \pm 2,35$ et $4,445 \pm 4,5$ (tableau 46).

A partir du sixième jour, s'amorce une réduction importante des surfaces des plaies traitées cela traduit par l'augmentation du pourcentage de contraction. Sa valeur est supérieure à celle des témoins négatifs ($21,342 \pm 7,552$) et des témoins positifs ($29,609 \pm 8,802$) (Tableau 46 et figure 59, 60)

Par ailleurs, lorsque on compare le pourcentage de contraction final de chaque lot, on constate qu'au neuvième jour, le pourcentage de contraction des plaies représente $92,089 \pm 3,401$ pour le lot traité avec l'EAq; $78,089 \pm 4,342$ pour le lot traité avec l'EMet ; $61,132 \pm 3,210$ pour le lot de témoin négatif et $70,750 \pm 5,124$ pour le lot de témoin positif.

Les plaies traitées, témoins négatifs et témoins positifs se contractent toutes mais à des vitesses légèrement différentes, un peu plus rapides pour les plaies traitées avec les extraits de la plante.

Cette étude a démontré que les deux extraits aqueux et méthanolique d'*O.f.indica* augmentent le taux de guérison des plaies d'excision et des deux types de brûlures thermiques. Le pourcentage de contraction est significativement supérieur à celui du groupe non traité.

D'après Leaper DJ et *al.*, (1998), dans le cas d'excision, une lésion tissulaire peut être clôturée dans les 6-12 h si elle n'est pas contaminée puisque elle est due à une perte minimale de cellules.

En outre, il est bien connu que le collagène est une protéine essentielle des tissus conjonctifs, le plus souvent présente sous forme fibrillaire, et elle est responsable de la résistance des tissus (Iocono JA et *al.*, 1998). Ainsi, l'augmentation du pourcentage de contraction des plaies traitées par les extraits d'*Opuntia* peut indiquer une augmentation de collagène dans la lésion des plaies.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Park, E. H. et Chun, M.J en 2001 sur *Opuntia ficus indica* qui ont montré une augmentation de pourcentage de contraction ou la synthèse de collagène chez les plaies des rats traités par l'extrait méthanolique et aqueux par rapport au témoin.

L'effet cicatrisant de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* est montré aussi au niveau des travaux réalisés par Bnelakssira B.S et *al.*, (2013) chez des lapins.

Pour les plaies de brûlures, il y a une perte importante de cellules et de tissus par rapport à une plaie d'excision, ce qui rend le processus de réparation plus compliqué (Cotran RS et *al.*, 1994). La cicatrisation des plaies chez les différents lots est également observée, mais à différents points dans le temps. Le pourcentage de contraction chez les plaies traitées par l'EAq est significativement supérieur par rapport au groupe témoin négatif.

La différence dans les principaux constituants des extraits d'*Opuntia* utilisés dans cette étude peut expliquer les résultats obtenus. Anand et *al.*, 2010 indiquent que les extraits riches en flavonoïdes et les molécules qui possèdent des propriétés antioxydantes peuvent aider à contrôler le stress oxydatif des plaies et ainsi accélérer la cicatrisation.

6. Evaluation de l'effet hépato-protecteur de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica*.

Au cours de la période d'expérimentation, aucune mortalité n'a été observée chez les rats qui ont été disponibles pour l'évaluation.

6.3 Modifications cliniques et poids corporel

Tous les animaux des quatre groupes expérimentaux ont été cliniquement et physiologiquement normaux pendant la période expérimentale, malgré quelques signes cliniques habituels observés comme l'anorexie, l'hypoactivité, qui sont réversibles et sont apparus chez les rats pendant une courte période.

L'administration quotidienne de l'extrait aqueux de raquettes d'*O.f.indica* à différentes doses ainsi que le CCl4 a perturbé l'évolution corporelle des rats (tableau 47).

Après le quinzième jour, le gain de poids corporel chez les rats du lot traité avec le CCL4 seulement et les lots traités avec les deux doses (100 et 250 mg/kg) de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* est significativement différent à celui obtenu chez le groupe témoin ($P < 0,0001$). En effet les valeurs représentent 21,3 ; 31,74 ; 14,39 ; et 105,12g respectivement (tableau 47 et figure 61).

Tableau 47 : Variation du poids corporel chez les rats après 15 jours de traitement

	Lot1	Lot2	Lot3	Lot4
Poids initiale (g)	211,5 ± 8,12	241,66 ± 6,89	219,8 ± 7,19	255 ± 7,7
Poids finale (g)	316,62 ± 6,20	273,4 ± 8,01	234,19 ± 5,16	276,3 ± 4,22
Gains de poids (g) après 15j	105,12	31,74 ^{****}	14,39 ^{****}	21,3 ^{****}

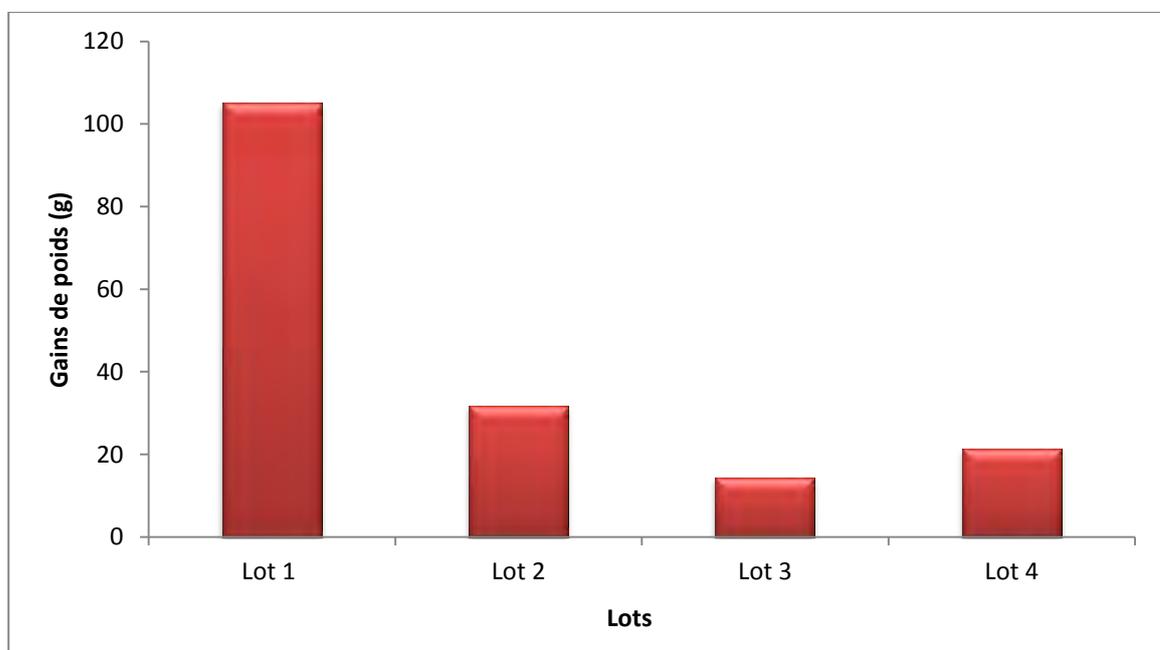


Figure 61 : Gains du poids (g) après 15 jours de traitement

➤ Valeurs absolues et relatives du poids des organes

La comparaison entre le poids relatif du foie des lots traités (avec la toxine CCL4 et l'EAq à 100mg/kg) par rapport à celui de témoin a montré une différence significative ($p < 0,0001$). En revanche aucune différence significative n'a été observée entre le groupe traité par la dose de 250 mg/kg vs témoin.

Le poids relatif du cœur et de la rate ne présente aucune différence significative chez les groupes traités comparé au groupe témoin. Alors que le poids des reins et poumons sont significativement différents ($p < 0,0001$). (Tableau 48)

Tableau 48 : Valeurs absolues et relatives du poids des organes après 15 jours de traitement

	Lot1 : Témoin	Lot 2	Lot 3	Lot 4
Poids des organes (g)				
Foie	9,244 ± 1,484	9,812 ± 0,7	8,162 ± 1,773	7,775 ± 0,971
Cœur	1,042 ± 0,218	0,912 ± 0,126	0,852 ± 0,229	0,947 ± 0,156
Reins	1,725 ± 0,211	1,777 ± 0,233	1,588 ± 0,535	1,831 ± 0,271
Rate	0,840 ± 0,241	0,772 ± 0,051	0,723 ± 0,191	0,682 ± 0,159
Poumon	2,025 ± 0,254	2,378 ± 0,136	2,011 ± 0,442	2,428 ± 0,719
Poids relatif				
Foie	2,919 ± 0,181	3,588 ± 0,345 ^{****}	3,485 ± 0,345 ^{****}	2,81 ± 0,246 ^{Ns}
Cœur	0,329 ± 0,171	0,333 ± 0,078 ^{Ns}	0,353 ± 0,122 ^{Ns}	0,342 ± 0,204 ^{Ns}
Reins	0,544 ± 0,06	0,649 ± 0,137 ^{****}	0,678 ± 0,051 ^{****}	0,662 ± 0,132 ^{****}
Rate	0,265 ± 0,023	0,282 ± 0,048 ^{Ns}	0,288 ± 0,077 ^{Ns}	0,246 ± 0,142 ^{Ns}
Poumon	0,639 ± 0,138	0,869 ± 0,175 ^{****}	0,858 ± 0,272 ^{****}	0,878 ± 0,168 ^{****}

6.4 Analyse biochimique

Les effets de l'extrait aqueux de raquettes d'*Opuntia ficus indica* sur les enzymes hépatiques (ALAT et ASAT) des rats intoxiqués par CCl₄ sont résumés dans le tableau 49.

Tableau 49: paramètres biochimiques des rats mâles *Wistar* traités avec l'extrait aqueux et CCL4

Paramètres sanguins	Lot1 : Témoin (n=6)	Lot 2 (n=6)	Lot 3 (n=6)	Lot 4 (n=6)
ALAT (UI/L)	60 ± 18,876	95,5 ± 5,71 ^{****}	68 ± 19,67 ^{****}	66 ± 5,656 ^{****}
ASAT (UI/L)	151 ± 26,229	250,33 ± 30,98 ^{****}	180 ± 3,915 ^{****}	171,6 ± 73,11 ^{****}
CREA (mg/L)	6,25 ± 3,304	6,4 ± 1,949 ^{Ns}	6,33 ± 1,914 ^{Ns}	6 ± 1,516 ^{Ns}
GLU (g/L)	0,993 ± 0,065	1,002 ± 0,550 ^{Ns}	0,948 ± 0,199 ^{****}	0,907 ± 0,204 ^{****}
UREE (mg/L)	0,25 ± 0,097	0,245 ± 0,049 ^{Ns}	0,24 ± 0,021 ^{Ns}	0,235 ± 0,045 ^{Ns}

Les résultats ont montré une augmentation significative de l'ALAT et de l'ASAT dans le groupe des rats intoxiqués par le CCl₄ par rapport au groupe témoin.

Le traitement des rats par l'extrait aqueux aux doses de 100 et 250mg/Kg a montré une diminution significative des deux enzymes hépatique l'ALAT et de l'ASAT (p<0,0001) par rapport au groupe des rats intoxiqués par le CCl₄.

Les résultats exposés dans le tableau 49, ont montré qu'il n'a pas eu d'importantes modifications sur les indicateurs des reins (CREA, Urée). Par contre le taux de glucose a été diminué d'une façon significative chez les deux lots traités avec l'extrait aqueux de la plante.

Selon l'échelle de Hodge et Sterner en 2009, le CCL4 est considéré un produit hautement toxique, ce qui justifie son utilisation pour l'induction de l'hépatopathie. Le CCl₄ est un produit reconnu pour sa capacité à provoquer une augmentation des transaminases et des modifications histopathologiques au niveau du foie (Yan-Yun L et al., 2004). On sait également que le CCl₄ est un hépatotoxique dose-dépendant. Sa toxicité est essentiellement due à l'apparition des radicaux libres ou des formes toxiques de l'oxygène qui induisent une peroxydation lipidique aboutissant à la destruction des

membranes cellulaires. Le CCl₄ est aussi un hépatotoxique à action obligatoire et prévisible de type indirect (Testud F., 2005)

L'augmentation des taux sériques des transaminases après l'administration du CCl₄ est la preuve d'une atteinte hépatique significative. Les lésions hépatiques induites par le CCl₄ sont couramment utilisées comme modèle pour le dépistage des drogues hépatiques, et l'étendue des dommages est évaluée par le niveau des transaminases cytoplasmiques (ALAT et ASAT) en circulation (Patrick-Iwuanyawu K C et al., 2007 ; Sangare MM et al., 2014).

La diminution du taux des enzymes hépatiques par l'extrait de plante est un indicateur des effets hépatotropes. Cela est également le signe des capacités à réduire les effets dommageables ou à préserver les mécanismes du fonctionnement du foie contre les perturbations d'une hépatotoxine (Sangare M M et al., 2014)

L'ALAT, ASAT sont les meilleurs indicateurs du mauvais fonctionnement du foie. À la dose de 250mg/kg d'EAq, le taux d'ALAT passe de $95,5 \pm 5,71$ à $66 \pm 5,656$ UI/l et le taux d'ASAT passe de $250,33 \pm 30,989$ à $171,66 \pm 73,11$ UI/l, cela confirme son efficacité sur le fonctionnement des cellules hépatiques.

Nos résultats obtenus confirment celles trouvés avec Ncibi S et al., (2008) sur l'effet hépato-protecteur de l'extrait aqueux de raquettes d'*Opuntia ficus indica* chez des rats intoxiqués par le chlorpyrifos.

La capacité des substances hépatoprotectrices à réduire les effets dommageables ou à préserver les mécanismes du fonctionnement du foie contre les perturbations d'une hépatotoxine est un indice de leur effet protecteur (Krishna K L et al., 2010). La baisse du taux des transaminases montre que les traitements à l'EAq s'opposent aux effets du CCl₄. Cet effet est incontestablement dû à la présence d'un certain nombre de molécules dont les mécanismes d'action restent à définir.

Chapitre 5 : Potentiel allélopathique du figuier de barbarie « *Opuntia ficus-indica* » Sur la germination et la croissance des végétaux.

Nombreuses espèces végétales synthétisent et relâchent dans l'environnement des molécules capables d'influencer la germination et la croissance des plantes croissant dans leur voisinage (Macias et *al.*, 1999).

L'interaction entre plantes par l'intermédiaire de molécules chimiques, l'allélopathie, suscite actuellement un intérêt grandissant. Une meilleure connaissance de ce phénomène pourrait offrir des perspectives intéressantes pour la gestion de la flore spontanée des parcelles cultivées et ainsi contribuer à diminuer l'utilisation d'herbicides de synthèse.

Afin de démontrer la réalisation de ce phénomène, des biotests effectués *in vitro* ont montré l'influence de l'extrait aqueux d'*O.f.indica*, avec différentes concentrations, sur la germination et la croissance de plantules d'*Allium cepa* et *Phaseolus vulgaris*.

1. Effets de l'extrait aqueux du figuier de barbarie sur la germination d'*Allium cepa* et *Phaseolus vulgaris*

L'extrait aqueux d'*Opuntia ficus-indica* quel que soit leur concentration, ralentissent la cinétique de la germination des grains d'*Allium cepa* et *Phaseolus vulgaris* (Figures 62 et 63) et diminuent significativement le taux de la germination final (Tableau 50).

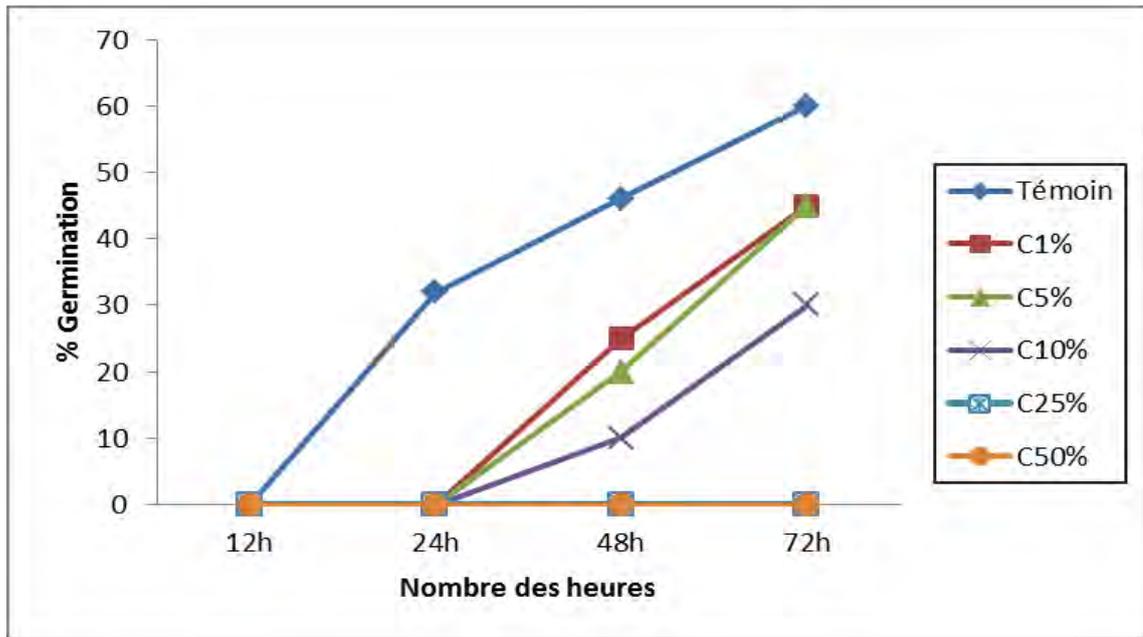


Figure 62 : Effet de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* sur la cinétique de germination d'*Allium cepa*

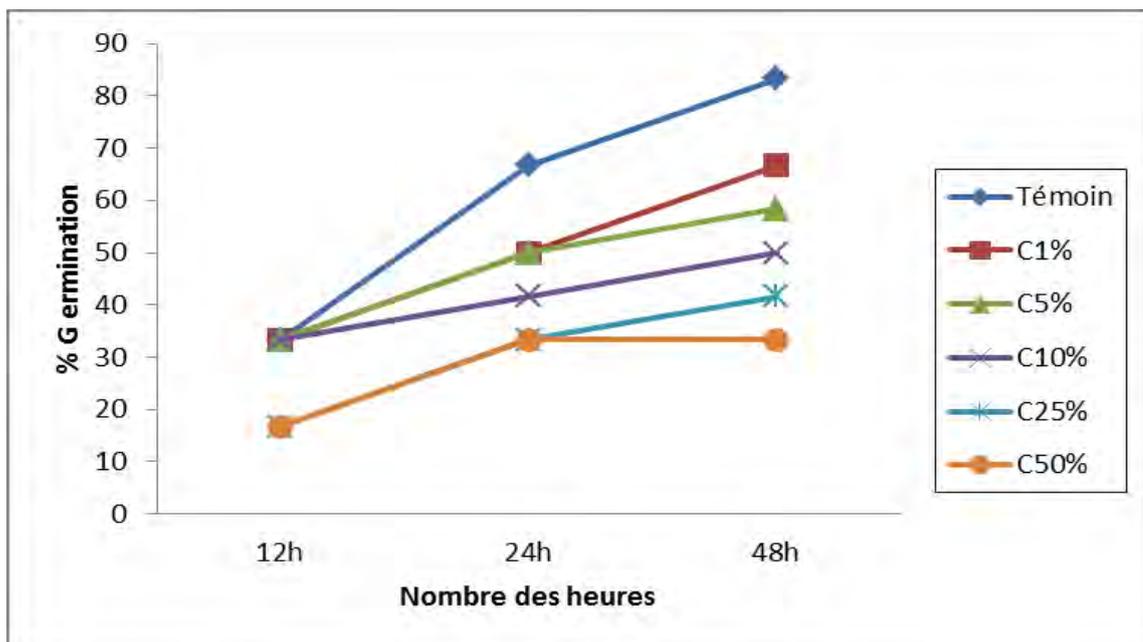


Figure 63 : Effet de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* sur la cinétique de germination du *Phaseolus vulgaris*

Tableau 50 : Effet de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* sur le taux de germination d'*Allium cepa* et *Phaseolus vulgaris*

Traitement	Effet des extraits du figuier de barbarie sur les graines d' <i>Allium cepa</i>		Effet des extraits du figuier de barbarie sur les graines de <i>Phaseolus vulgaris</i>	
	Taux de germination	% d'Inhibition	Taux de germination	% d'Inhibition
Témoin	60%	-	83%	-
C1%	45%	25%	66%	20%
C5%	45%	25%	58%	30%
C10%	30%	50%	50%	40%
C25%	0%	100%	41%	51%
C50%	0%	100%	33%	60%

➤ Chez *Allium cepa*

Les extraits de concentration égale à C25% et C50% qui induisent les effets inhibiteurs les plus élevés, avec des taux d'inhibition de 100%. Alors, que les effets inhibiteurs étaient faible (50%) et sans intérêt (25%) respectivement pour les extraits avec les concentrations C10%, C5% et C1%.

➤ Chez *Phaseolus vulgaris*

L'effet inhibiteur de l'extrait aqueux de raquettes d'*Opuntia ficus indica* avec différentes concentrations (C10%, C25% et C50%) sur la germination des graines de *Phaseolus vulgaris* était faible (40 à 60%). Alors que, pour les autres concentrations était sans intérêt pratique.

2. Effets des extraits du figuier de barbarie sur la croissance des plantules d'*Allium cepa* et *Phaseolus vulgaris*

Le tableau 51 et les figures 64, 65 montrent l'effet inhibiteur de la pluparts des concentrations étudiées de l'extrait aqueux du figuier de barbarie sur la longueur des racines des plantules d'*Allium cepa* et *Phaseolus vulgaris* après 48 heures d'incubation.

➤ Chez *Allium cepa*

Les concentration de l'extrait aqueux du figuier de barbarie C25% et C50% ont montré un très bon effet (supérieur 96%). Cette inhibition était moyenne (76 et 77%) et bonne (87%) respectivement pour les extraits C1%, C5% et C10%.

➤ Chez *phaseolus vulgaris*

Les effets inhibiteurs étaient sans intérêt pratique (13 à 31%) pour les extraits C1%, C5%, C10% et C25%, à effet faible (44%) pour l'extrait C50%.

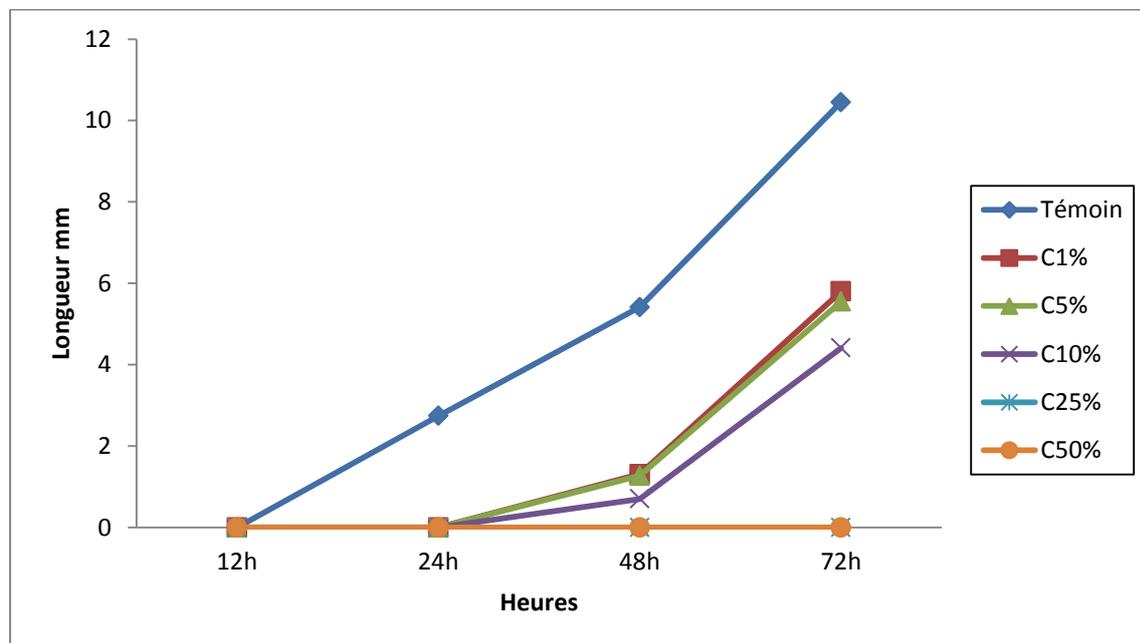


Figure 64 : Effet de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* sur la longueur des racines des plantules d'*Allium cepa*

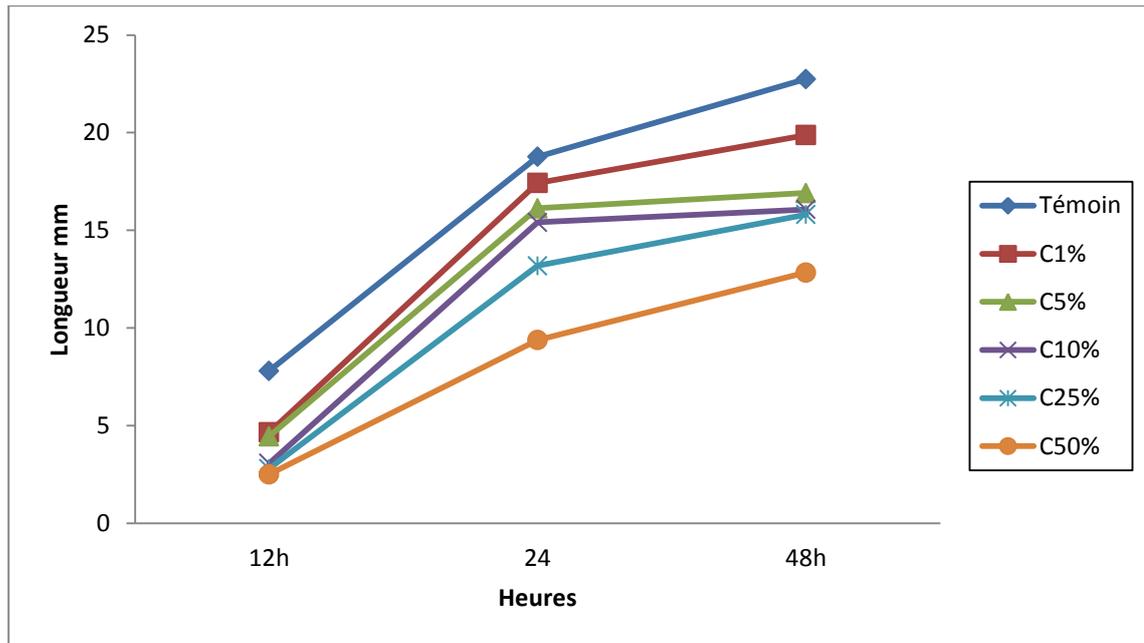


Figure 65 : Effet de l'extrait aqueux d'*O.f.indica* sur la longueur des racines des plantules de *phaseolus vulgaris*

Tableau 51 : Effet de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* sur la croissance des plantules d'*Allium cepa* et *Phaseolus vulgaris*

traitement	Effet sur longueurs des racines d' <i>Allium cepa</i>		Effet sur longueurs des racines de <i>Phaseolus vulgaris</i>	
	mm	% d'inhibition	mm	% d'inhibition
Témoin	5,412±2,07	-	22,75±6,12	-
C1%	1,31±0,947	76%	19,88±4,40	13%
C5%	1,27±0,191	77%	16,91±4,731	26%
C10%	0,7±0,989	87%	16,07±1,65	29%
C25%	-	100%	15,81±5,66	31%
C50%	-	100%	12,84±5,89	44%

Les résultats que nous avons obtenus sur la germination des graines et le développement des plantules d'*Allium cepa* et *phaseolus vulgaris* montrent que l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* retarde la germination des graines et il s'interrompte dans un stade avancé ou encore elle ne se produit pas. Kruse et al., (2000) ont montré que lorsque des plantes sensibles sont exposées aux allélochimiques, la germination des

graines est retardée. En ce qui concerne certaines graines, la germination s'arrête dans le stade gonflement de la graine. Pour d'autres, la germination s'arrête au début de l'apparition de la radicule.

Kruse et *al.*, (2000) ont montré aussi que l'effet des substances allélochimiques se manifeste par des variations morphologiques qui sont observées le plus souvent aux premiers stades de développement, des effets sur l'allongement de la tigelle et de la radicule. Dans la plupart des tests que nous avons réalisés, l'effet inhibiteur des extraits est plus important sur la germination des graines.

Les différents effets des extraits sur la germination des graines et le développement des plantules peuvent être expliqués par les différences des quantités (concentration) et caractéristiques physicochimiques qui probablement mettent en jeu des substances allélochimiques spécifiques.

Pour chaque espèce allélopathique l'inhibition augmente lorsque la concentration de l'extrait augmente, Arslan et *al.*, (2005), Uremis et *al.*, (2005), Turk et Tawaha (2003) et Batish et *al.*, (2002) ont montré que l'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits.

Nos résultats confirment celles trouvés par Rsaiss N. et *al.*, 2013, ils ont montré l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux de raquettes du figuier de barbarie sur la germination et la croissance du jujubier

Rsaiss N. et *al.*, 2013 ont rapporté que les composés allélopathiques sont le plus souvent des composés phénoliques et qu'ils ont un effet inhibiteur sur la germination des graines et sur la croissance des germes; leurs effets peuvent être synergiques ou additifs. Ces substances affectent les mécanismes fondamentaux des plantes cibles comme la photosynthèse, la synthèse des protéines, la perméabilité membranaire, la respiration, la division cellulaire et la germination. Pour être considérés comme des composés allélopathiques, les acides phénoliques doivent notamment être sous forme active (libre et protonée) et interfèrent sur les processus physiologiques, biochimiques et moléculaires des plantes cibles. En effet, leurs effets sur la germination ou sur la croissance des plantes-cibles ne sont que les signes secondaires de modifications primaires. Alors que leurs cibles principales, non exclusives l'une et l'autre sont: les hormones (auxine, gibbérellines, acide abscissique) qui contrôlent les grandes étapes du

cycle vital de la plante (germination, croissance, floraison) et les membranes (perturbation de leur perméabilité). Ainsi, les substances allélopathiques peuvent être exploitées pour la lutte contre les mauvaises herbes et servir à l'élaboration d'herbicides.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ces dernières années, de nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes, qui sont considérés comme de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

A l'issus de ce travail, une étude caryologique de l'espèce *Opuntia ficus indica* est réalisée à l'aide des techniques de cytogénétiques classiques (coloration au carmin acétique et la coloration aux nitrates d'argent AgNO_3). Les résultats obtenus confirment le niveau de ploïdies de cette espèce qui est $2n = 8x = 88$ avec un nombre de base $x = 11$. L'établissement du caryotype a mis en évidence la présence de trois types chromosomiques. La coloration aux nitrates d'argent a permis de détecter un nombre de nucléoles variant de 1 à 4 avec une majorité de 1 nucléole par cellule ce qui indique qu'il y a un site actif.

Dans le présent travail, le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, tanins, stérols, triterpènes et les coumarines.

La détermination des rendements en extraits a montré une rentabilité importante en extraits polaires (MeOH et Aq) de plantes allant de 2,360 à 9,1668 %, alors qu'elle s'affaiblit en passant aux extraits apolaires (EEP, EChI).

La présence des composés phénoliques dans nos extraits est mise en évidence par des essais de caractérisation en tube qui sont confirmés par HPLC.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés dans les six extraits analysés montre que l'EBut, EAc, EAq et EMet sont les plus riches en ces métabolites. Tandis que l'EEp et EChI sont considérés comme les extraits les plus pauvres.

L'activité antioxydante *in vitro* est aussi étudiée avec la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), la méthode de réduction du fer (FRAP), méthode de phosphomolybdate et des tests du piégeage de peroxyde

d'hydrogène H₂O₂ et le radical OH. Les résultats obtenus montrent que les deux fractions (d'acétate d'éthyle et butanolique) sont plus actives par rapport aux autres.

L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits d'*Opuntia ficus indica* par la méthode de diffusion en milieu solide a révélé que les extraits EEp, EDm et EMe possèdent un pouvoir antibactérien dose dépendant sur la souche *Staphylococcus aureus*, la plus forte activité a été obtenue avec l'EAc avec une zone d'inhibition égale à 11,18 mm à la concentration de 5mg/ml.

La concentration minimale inhibitrice des extraits a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide.

Au terme de notre étude, des différentes activités pharmacologiques ont été prouvées, permettant ainsi de justifier et d'objectiver les indications thérapeutiques des préparations traditionnelles à base d'*Opuntia ficus indica*.

D'après les résultats des tests toxicologiques, réalisés *in vitro et in vivo*, sur des érythrocytes isolés du sang, sur des larves, des rats et lapins, en présence de différentes concentrations des extraits de raquettes de cette plante, nous avons constaté que cette plante est très faiblement toxique. Elle peut être une source très importante dans les domaines thérapeutiques et pharmacologiques pour soulager les différentes maladies.

Nos résultats indiquent que l'extrait aqueux présente une haute activité hypoglycémiant chez des lapins possède une hyperglycémie provoquée par le glucose, en diminuant d'une manière significative la concentration sérique du glucose.

Cette étude a permis de démontrer une activité analgésique très significative de l'extrait aqueux de raquettes d'*Opuntia ficus indica* chez les rats dès la dose de 1000mg/kg, en utilisant les modèles des douleurs induites par des stimuli chimiques et thermiques.

L'évaluation de l'activité cicatrisante des deux extraits : aqueux et méthanolique, sur trois types de plaies a révélé qu'ils ont des propriétés cicatrisantes. Cependant, l'extrait aqueux a montré une meilleure contraction de la plaie pendant la réaction inflammatoire et la phase proliférative.

Nos résultats montrent aussi que l'extrait aqueux de la plante provoque une nette amélioration du statut antioxydant hépatique chez les rats y ont une toxicité hépatique

induite par le CCL4. En effet, Une diminution de la concentration des deux enzymes hépatique ALAT et ASAT a été démontrée.

Les composés allélopathiques détectés dans les raquettes du figuier de barbarie sont des composés phénoliques qui ont un effet inhibiteur sur la germination et la croissance des plantes cibles.

En perspectives, des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour déterminer, d'une part les composés des raquettes d'*Opuntia ficus indica* (notamment ce qui concerne l'identification et la purification des composés phénoliques) qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part, le mécanisme absolu par lequel ces composés accomplissent leurs effets antioxydants.

Référence

Bibliographique

Référence Bibliographique

A

- **Abdel-barry J.A., Abdel-hassan I.A., Al-hakiem H.H., 1997.** Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum raecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* Pp 149-155
- **Aberkane M.C., 2006.** Etude phytochimique de la plante *Publicaria laciniata*. Thèse de doctorat. Université de Batna. Pp163.
- **Adeneye A.A., Ajagbonna O.P., Ayodele O.W., 2007.** Hypoglycemic and antidiabetic activities on the stem bark aqueous and ethanol extracts of *Musanga cecropioides* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia.* Pp502–505.
- **Alimi H., Bouoni Z., Feriani A., Hfaeidh N., Sakly M., Ben Rhouma K., 2013.** Preliminary characterization, antioxidant activities and ulcer curative effect of *opuntia ficus indica* f. inermis roots polysaccharides in rats. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research.* Pp42-51.
- **Al-Sobarry M., Alwashli A., Cherrah Y., Alaoui K., 2013.** Toxicité aiguë et action analgésique d'extrait éthanolique des feuilles d'*Aloe perryi*, plante endémique du Yémen. *Phytothérapie.* Pp17-21.
- **Ali N.A.A., Julish W.D., Kusunick C., Lindesquist U., 2001.** Screening of yamani medicinal plant for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology.* Pp173-179.
- **Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddamc P., Barl B., Weil J.A., 2004.** Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry.* Pp 551–562.
- **Amiot J., 2005.** *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- **Anand T., Naika M., Kumar P.G., Khanum F., 2010.** Antioxidant and DNA damage preventive properties of *Centella asiatica* (L) Urb. *Phcog J.* Pp53–58.

- **Anaberta C.M., Cristian J.M., Georgina S., 2011.** Revalorization of cactus pear (*Opuntia* spp.) wastes as a source of antioxidants. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Pp 782-788.
- **Andrade-Castañeda I., Gonzalez-Sanchez J., Frati-Munari A.C., 1997.** Hypoglycemic Effect of an *Opuntia streptacanta* Lemaire Dialysate. *J. PACD.* Pp73-75
- **Annan K., Houghton P.J., 2008.** Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. *Journal of Ethnopharmacology.* Pp141-144.
- **Aravodis E., 2005.** Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology.* Pp128-133.
- **Arba M., 2009.** Le cactus opuntia, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc Rabat. *Maroc.* Pp14-16.
- **Arif T., Bhosale J.D., Kumar N., Mandal T.K., Bendre R.S., Lavekar S., Dabur R. 2009.** Natural products-antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res.* Pp 626-638.
- **Arslan M., Uremis I., Uludag A., 2005.** Determining bio-herbicidal potential of rapeseed, radish and turnip extracts on germination inhibition of cutleaf ground-cherry (*Physalis angulata* L.) seeds. *Journal of Agronomy.* Pp134-137.
- **Askun T., Tumen G., Satil F., Ates M., 2009.** In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem.* Pp 289-294.
- **Asongalem E.A., Foyet H.S., Folefoc G.N., Dimo T., Ngongang J., Kamtchouing P., 2004.** Analgesic and anti-inflammatory activities of *Erigeron floribundus*. *J. Ethnopharmacol.* Pp 301-308.
- **Audigié C., Figarella J., Zonszain F., 1978.** Manipulation d'analyse biochimique. *Doin Edition, Paris.* P 247.

B

- **Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarch council. Mauritius.* Pp 83-94.
- **Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C., Pinkas M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts

from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Journal of Arzneimittel-Forschung*. Pp1086-1089.

- **Balentine C.W., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Duong D.Q., Pohlman F.W., 2006.** The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*. Pp 413-421.
- **Barbera G., Carimi F., Inglese P., 1992.** Past and role of the Indian-fig prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller, Cactaceae) in the agriculture of Sicily. *Economic Botany*. Pp 10-20.
- **Bari M.N., Zubair M., Rizwan K., Rasool N., Bukhari I.H., Akram S., Bokhari T.H., Shahid M., Hameed M., Viqar U.A., 2012.** Biological Activities of *Opuntia Monacantha* Cladodes. *J. CHem. Soc. Pak*. Pp 990-995
- **Batish D.R., Singh H.P., Kohli R.K., Saxena D.B., Kaur S., 2002.** Allelopathic effects of parthenin against two weedy species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. *Environmental and experimental botany*. Pp149-155.
- **Ben Laksira B.S., Halmi S., Djerrou Z., Beroual K., Bachtarzi K., Maamri Z., Hamdi Pacha Y., 2013.** Cicatrizing effect of *Opuntia ficus indica* aqueous extract and seeds powder in New Zealand rabbits. *Int. J. Med. Arom. Plants*. Pp.159-162.
- **Ben Salem H., Nefzaoui A., Ben Salem L., 2002.** Supplementing spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) based diets with urea-treated straw or oldman saltbush (*Atriplex nummularia* L.). Effects on intake, digestion and sheep growth. *J. Agric. Sci. Camb*. Pp85-92.
- **Bensegueni A., Belkhiri A., Boulebda N., Keck G., 2007.** Evaluation de l'activite cicatrisante d'un onguent traditionnel de la region de constantine sur les plaies d'excision chez le rat. *Sciences et Technologie*. Pp.83-87.
- **Beretz A., Cazenave J.P., 1991.** Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. *Planta Med*. Pp68-72.
- **Bérubé-Gagnon J., 2006.** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.
- **Bhaskar A., Vidhya V.G., Ramya M., 2008.** Hypoglycemic effect of *Mucuna pruriens* seed extract on normal and streptozotocin-diabetic rats. *Fitoterapia*. Pp539-543
- **Bindseil K.U., Jakupovic J., Wolf D., 2001.** Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discov. Today*. Pp 840-847.

- **Blache D., Prost M., 1992.** Free radical attack: Biological test for human resistance capability. In Proceedings of the IX College Park Colloquium on Chemical Evolution. A Lunar-Based Chemical Analysis Laboratory. Pp. 82-98.
- **Bondet V., Williams W.B., Berset C., 1997.** Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Journal of Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. Pp 609-615.
- **Bopanna K.N., Kannan J., Gadgil S., Balaraman E.R., Rathore S.P., 1997.** Antidiabetic and antihyperglycaemic effects of neem seed kernel powder on alloxan diabetic rabbits. Indian Journal of Pharmacology. Pp162-167.
- **Boudechiche L., 2012.** Valorisation du figuier de barbarie en alimentation animale. Renc. Rech. Ruminants. Pp218.
- **Bougandoura N., Bendimerad N., 2013.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta* (L.) Briq. Journal of Nature and Technologie. Pp14 à 19.
- **Brantner A., Males Z., Pepeljnjak S., Antolic A., 1996.** Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* Mill (Christ's thorn). J. Ethnopharmacol. Pp119-122
- **Bravo L., 1998.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews. Pp317-333.
- **Bruneton j., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition. France : Tech & Doc – Lavoisier.
- **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. France : Tech & Doc – Lavoisier.
- **Bulbul Bandyopadhyay, Archana S., 2000.** The use of multivariate analysis of karyotypes to determine relationships between species of *Opuntia* (Cactaceae). Caryologia. Pp 121-126.

C

- **Cavin A., 1999.** Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires, *Tinospora crispa* (Menispermaceae) ; *Merremia emarginata* (convolvulaceae) et *Orphea enneandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat. Lausanne. P243.
- **Ćetković G.S., Čanadanović-Brunet J., Djilas S.M., Tumbas V.T., Markov S.L., Cetković D.D., 2007.** Atioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial

Activities of *Satureja Montana* L. subsp. *Kitaibelii* Extracts. International Journal of Molecular Sciences. Pp1013-1027.

- **Chavez-Santoscoy R.A., Gutierrez-Uribe J.A., Serna-Saldívar S.O., 2009.** Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. Plant Foods Hum Nutr. Pp146-52.
- **Choi H.G., Oh Y.K., Kim C.K., 1998.** In-situ gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen: enhanced bioavailability. Int J Pharm. Pp165-169
- **Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Z., Park S.H., Kim S.K., 2002.** Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plant and flavonoids by assayguided comparison. Plant Sci. Pp1161-1168.
- **Chougui N., Sahi Y., Belkacemi M., 2013.** Comparative study between the different compartments of *Opuntia ficus-indica* L. InsideFood Symposium, Leuven, Belgium.
- **Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F., Chou S.T., 2002.** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Pp 2454–2458.
- **Ciulei I., 1982.** Methodology for analysis of vegetable drugs. Parnaris edition. Bucharest. P67.
- **Cortazar V. G., Nobel P. S., 1992.** Biomass and fruit production for the prickly pear cactus *Opuntia ficus indica*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. Pp 558-562.
- **Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., 1994.** Inflammation and repair. In Robbins Pathologic Basis of Disease. 5th edition. Philadelphia. Pp85–91.
- **Coskuner Y., Tekin A., 2003.** Seed composition of prickly pear fruits. Journal of the Science of Food and Agriculture. Pp 846-849.
- **Couderc J., 1997.** Docteur nopal le médecin du bon dieu. Aloe Plantes et Beauté. Paris. France.
- **Cowan M.M., 1999.** Plants products as antimicrobial activity. Clinical Microbiology Reviews. Pp 564-582.
- **Cunha W.R., Arantes G.M., Ferreira D.S., Lucarini R., Silva M.L.A., Furtado N.A.J.C., Da Silva F., Crotti A.E.M., Araújo A.R.B., 2008.** Hypoglycemic effect of *Leandra lacunosain* normal and alloxan induced diabetic rats. Fitoterapia. Pp356–360.

D

- **Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Edition Yves Dacosta. Paris. P317.
- **Daglia, M., 2012.** Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology. Pp174-181.
- **De Pooter H.L., Schamp N., 1986.** Comparaison of the volatils composition of some Calamintha satureja species. In : Progress in essential oil research. Edition E-J. Brunk, Walter De Gruyter. Berlin. Pp139-150.
- **Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont- Rousselot D., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Pp1-23.
- **Derenzini M., 2000:** The AgNORs. Journal of Micron. Pp117-120.
- **Diallo A., 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de Syzygium guineese Willd (Myrataceae). Thèse de doctorat. Bamako. P99.
- **Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K., Maiza A., 2004.** Etude des constituants des feuilles de Ziziphus mauritiana Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. C.R.Chimie. Pp1073-1080.
- **Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci. PP 337-53.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J. F., Stocker P., 2007.** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. Eur. Food Res. Technol. Pp 801-809.
- **Dohou N., YamniK, Gmiran, Idrissi Hassani L.M., 2003.** Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine, Thymelaea lychroides. Acta Botanica Malacitana. Pp233-239.
- **Donald J., Pinkava, Malcolm G., McLeod, 1971.** Chromosome Numbers in Some Cacti of Western North America. Brittonia. Pp 171-176.
- **Dongmo A.B., Nguenefack T.B., Lacaille-Dubois M.A., 2005.** Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* wild (Mimosaceae). J. Ethnopharmacol. Pp201- 206.
- **Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S., Kukic J., 2007.** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil .J Ethnopharmacol. Pp458 -463.

- **Dreher D., Junod A. F., 1996.** Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. *European Journal of Cancer*. Pp30-38.
- **Dubeux J.R., Ferreira dos Santos M.V., de Andrade Lira M., Cordeiro dos Santos D., Farias I., Lima L.E., Ferreira R.L.C., 2006.** Productivity of *Opuntia ficus indica* under different N and P fertilization and plant population in north-east Brazil. *Journal of Arid Environment*. Pp357- 372.
- **Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., 1956.** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances *Analytical chemistry*. Pp 350-356.

E

- **Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A., 2007.** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*. Pp194 -203.
- **Ekoumou C., 2003.** Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse Pharmacie. Université de Bamako. Mali.
- **El Gharras H., 2009.** Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*. Pp 2512-2518.
- **Elisabetsky E., Tânia A.A., Albuquerque R.R., Nunes D.S., Cavalho A., 1995.** Analgesic activity of *Psychoria colorata* (wild). *J. Ethnopharmacol*. Pp77-83.
- **Ennouri M., Evelyne B., Laurence M., Hammadi A., 2005.** Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. *Food Chemistry*. Pp 431-437.
- **Ennouri M.A.D., Hamadi Fetoui B., Hammami M.C., Evelyne Bourret D., Hamadi Attia A., Najiba Zeghal B., 2007.** Effects of diet supplementation with cactus pear seeds and oil on serum and liver lipid parameters in rats. *Food Chemistry*. Pp248–253.
- **Erlund I., 2004.** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res*. Pp851-874.
- **Esmaeili M.A., Yazdanparas R., 2004.** Hypoglycemic effect of *Teucrium polium*: 265 studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology*. Pp 257–266.

F

- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biologies. Pp372-379.
- **Farnood Shokouhi S.J., Tajik H., Mojtaba H., 2012.** Efficacy of topical application of alcoholic extract of yarrow in the healing process of experimental burn wounds in rabbit. Comp Clin Pathol. Pp177-181.
- **Fazeli M.R., Amin G., Ahmadian-Attari M. M., Ashtiani H., Jamalifar H., Samadi N., 2007.** Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. Food Control. Pp646-649.
- **Fernandez M.L., Trejo A., McNamara D.J., 1990.** Pectin isolated from Prickly pear (*Opuntia* sp) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. J. Nutr. Pp 1283-1290.
- **Ferrari J., 2002.** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaires des Thymelaceae et investigation phytochimique de l'une d'elle: *Gnidia involucratend.* ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne. P242.
- **Fosting S., 2004.** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Maerua angoensis* (Capridaceae).Thèse de doctorat. Bamako. P149.
- **Frati A.C., Jiménez E., Ariza R.C., 1990.** Hypoglycemic effect of *Opuntia ficus indica* in non insulin-dependent diabetes mellitus patients. Phytotherapy Research. Pp195–197.

G

- **Galati E.M., Mondello M.R., Giuffrida D., Dugo G., Miceli N., Pergolizzi, Taviano M.F., 2003.** Chemical characterisation and biological effects of sillician *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. J. Agric. Food Chem. Pp4903-4908
- **Geneviève B., Caporalino-Djian C., 1994.** Ethnobotanique à Vanuatu et substances naturelles nématocides. Rapport final du programme: substances naturelles nématocides. ORSTOM. Nouméa.
- **Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S.A., 2007.** Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. Meat Science. Pp172-181.

- **Ghedira K., 2005.** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. Pp162-169.
- **Gibson A.C., Nobel P., 1986.** *The Cactus primer*. Harvard University Press Cambridge. USA. P286.
- **Gilani A.H., Jabeen Q., Ghayur M.N., Janbaz K.H., Akhtar M.S., 2005.** Studies on the Antihypertensive, Antispasmodic, Bronchodilator and Hepatoprotective activities of the *Carum copticum* seed extract. *Journal of Ethnopharmacology*. Pp127-135.
- **Godard M.P., Ewing B.A., Pischel I., Ziegler A., Benedek B., Feistel B., 2010.** Acute blood glucose lowering effects and long-term safety of *Opuntia* supplementation in pre-diabetic males and females. *J Ethnopharmacol*. Pp631-634
- **Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., 2006.** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Pp1220-1234.
- **Gorenflot R., Raicu P., 1980.** *Cytogénétique et évolution*. Masson. Paris. Pp 135-136
- **Guignard J.L., 1996.** *Biochimie végétale*. Masson, Paris. France.
- **Guo-Xiang Li, Zai-Qun Liu, 2008.** The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food Chem. Toxicol*. Pp 886-892.
- **Guzman U., Arias S., Dávila P., 2003.** In: **Reyes-Aguero J.A., Aguirre J.R., Valiente-Banuet A., 2006.** Reproductive biology of *Opuntia* : A review. *Journal of Arid Environments*. Pp549-589.

H

- **Habibi Y., 2004.** Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de Barbarie, les polysaccharides pariétaux : caractérisation et modifications chimiques. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier. Faculté Sciences et Géographie (Grenoble I) et Université Cadi Ayyad . Faculté des Sciences (Semlalia, Marrakech).
- **Hadj Sadok T., Aid F., Bellal M., Abdul Hussain M.S., 2008.** Composition chimique des jeunes cladodes d'*Opuntia ficus indica* et possibilités de valorisation alimentaire. *Agricultural practice and science journal*. Pp 39-48.

- **Hadj Sadok T., Aid F., Doumandji A. et Bellal M., 2014.** Effet du jus de cladodes d'*Opuntia ficus indica* sur la fermentation du lait et la croissance des bactéries lactiques et probiotiques. *Nature et Technologie*. Pp 17-29.
- **Halliwell B., 1990.** How to characterize a biological antioxidant free radical. *Res.Comm.* Pp1-32.
- **Hamdi-Pacha Y., Belkhiri A., Benazzouz M., Benhamza L., Bensegueni L., 2002.** Evaluation de l'activité cicatrisante suite à des brûlures expérimentales de quelques plantes algériennes. *Méd. Pharm.Afri.* Pp1-7.
- **Hanson J.R., 2003.** Natural Products : The secondary metabolites. Royal Society of Chemistry.
- **Harrisson D., Griendling K.K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H., 2003.** Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. Pp7-11.
- **Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T., 2005.** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. Pp2047-2055.
- **Havsteen B.H., 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap.* Pp67- 202.
- **Hegde K., Joshia A.B., 2009.** Hepatoprotective effect of *Carissa carandas* root extract against CCl₄ and paracetamol induced hepatic oxidative stress. *India J Exp Biol.* Pp660–667.
- **Hennebelle T., 2006.** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la famille productrice d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse de doctorat. France. P304.
- **Henri A., Marie-Dominique M., Coralie B., Jean-Pierre M., Laure, C., Françoise C., Cristhine B., Daniel P., 2003.** L'intoxication volontaire par l'ingestion de *Datura stramonium*. *Ann. Med. Interne.* Pp46-50.
- **Hirose K., Jyoama H., Kojima Y., Eigyi M., Hatakeyama H., 1984.** Pharmacological properties of a new anti-inflammatory agent drug. *Neurosci. Res.* Pp280-286.
- **Hodge H.C., Sterner J.H., 1943** in **Ilboudo S., Ouedraogo M., Some N., Guissou P.I., 2009.** Criblage phytochimique et évaluation de la toxicité aiguë de *pisolithus tinctorius* (Basidiomycète). *J. Sci. Pharm. Biol.* Pp.6-13

- **Hodek P., Trefil P., Stiborova M., 2002.** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes. *Chem. Biol. Interact.* Pp1-21.
- **Howell W.M., Black D.A., 1980:** Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer. A 1-step method. *Experientia.* Pp 1014-1015
- **Hu S.G., Li L., He X.W., 2005.** Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A.* Pp31-37.
- **Hyun-II Jun, Mi-Na Cha, Eun-In Yang, Dong Geun Choi, Young-Soo Kim, 2013.** Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Korean Cactus (*Opuntia humifusa*) Cladodes. *Hort. Environ. Biotechnol.* Pp288-295.

I

- **Iocono J.A., Ehrlich H.P., Gottrup F., Leaper D.J., 1998.** The biology of healing. In *Wounds: Biology and Management.* Edited by Leaper DJ, Harding KG. Hong Kong. Pp10-22.

J

- **Jahier J., 1992:** Techniques de cytogénétiques végétales. Edition INRA. France.
- **Je Kwan Jang, Ok Sang Lee, Tae Jin Kang, and Sung Cil Lim, 2013.** Wound Healing Effect of Cuttlebone Extract in Burn Injury of Rat. *Food Sci. Biotechnol.* Pp 99-105.

K

- **Karumi Y., Onyeyili P.A., Oyugbuaja V.O., 2004.** Identification of active principals of *M.Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med.Sci.* Pp179-182.
- **Kaplan M., 2007.** Understanding Liver Function Tests. *OCW: Gastrointestinal Pathophysiology.* Pp 1-19.
- **Kang J., Li Z., Wu T., Jensen G.S., Schauss A. G., Wu X., 2010.** Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry.* Pp 610-617.
- **Khafagy E., Morishita M., Onuki Y., Takayama K., 2007.** Current challenges in noninvasive insulin delivery systems: A comparative review. *Adv Drug Deliv Rev.* Pp1521–1546.

- **Khanna K., Rizvi F., Chander R., 2002.** Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. Pp19- 22.
- **Koehn F.E., Carter G.T., 2005.** The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. Pp 206-220.
- **Ko F.N., Cheng Z.J., Lin C.N., Teng C.m., 1998.** Scavenger and antioxydant properties pf prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Free Radical Biology and Medecine*. Pp160-168.
- **Koffi N., Beugré K., Guédé N.Z., Dossahoua T., Laurent A., 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences et Nature*. Pp 1-15.
- **Kouri G., Tsimogiannis D., Bardouki H., Oreopoulou V., 2007.** Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Pp155-162.
- **Krishna K.L., Mruthunjaya K., Patel A., 2010.** Antioxidant and hepatoprotective potential of stem methanolic extract of *Justicia gendarussa* Burm. *Int J Pharmacol*. Pp72–80.
- **Kritchevsky D., 1978.** Fiber, lipids and atherosclerosis. *American Journal of Clinical Nutrition*. Pp65-74.
- **Kruse M., Strandberg M., Strandberg B., 2000.** Ecological Effects of Allelopathic Plants: a Review. NERI Technical Report No. 315. National Environmental Research Institute. Denmark. P66.

L

- **Lahsasni S., Kouhila M., Mahrouz M., Jaouhari J.T., 2004.** Drying kinetics of prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica*). *Journal of Food Engineering*. Pp 173-179.
- **Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., Hseini S., 2009.** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de zaër (maroc occidental). *Revue de botanique*.Pp1-30.
- **Laurent E., 1991.** Eléments minéraux in: Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Edition Lavoisier. Paris, Pp78-98.
- **Lawson-Evi P., Ekl-Gadegbeku K., Aklikokou K., Akpagana K., Koumaglo, Gbeassor M., 1997.** Activité hypoglycémiante de quelques plantes médicinales. *Pharm. Méd. Trad. Afr*. Pp 60-69.

- **Le Bars D., Gozarium M., Cadden S.W., 2001.** Evaluation de la douleur aiguë chez l'animal d'expérience. Ed. Sci Med. Elsevier. Pp347-365.
- **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y., 2003.** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. J. Agric. Food Chem. Pp7292-7295.
- **Leinmüller E., Steingass H., Menke K.H., 1991.** Tannins in Ruminant feed stuff. Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany).
- **Le Houérou H.N., 2002.** Cacti (*Opuntia* spp.) as a fodder crop for marginal land in the Mediterranean Basin. Acta Horticulturae. Pp 21-46.
- **Le Houérou H.N., 1996.** The role of cacti (*Opuntia* spp.) in erosion control, land reclamation, rehabilitation and agricultural development in the Mediterranean Basin. Journal of Arid Environments. Pp135-159.
- **Leaper D.J., Gottrup F., 1998.** Wounds: biology and management. Oxford University Press. Pp23-40.
- **Leopoldini M., Russo N., Toscano M., 2011.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. Food Chemistry. Pp288-306.
- **Levan A., Freda K., Scandberg A., 1964:** Secondary association between genetically equivalent bivalents. Hereditas. Pp 201-220.
- **Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., chen F., Tian Y., 2007.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. Food Chimestry. Pp771-776.
- **Li H.B., Wong C.C., Cheng K.W., Feng C., 2008.** Antioxidant properties *in vitro* and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. Lebensmittel-Wissenschaft and Technology. Pp 385–390.
- **Li W.L., Zheng H.C., Bukuru J., De Kimpeb N., 2004.** Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. J Ethnopharmacol. Pp1-21.
- **Locatelli M., Travaglia F., Coisson J.D., Martelli A., Stevigny C., Arlorio M., 2010.** Total antioxidant activity of hazelnut skin (*Nocciola Piemonte PGI*) : Impact of different roasting conditions. Food Chemistry. Pp1647-1655.
- **Louacini B.k., Abdelkader D., Miloud H., Kheira G., 2012.** Effect of Incorporation of the Spineless *Opuntia ficus Indica* in Diets on Biochemical Parameters and its Impact on the Average Weight of Ewes during the Maintenance. Global Veterinaria. Pp 352-359.

- **Louis S., 2004.** Diversité structural et d'activité biologique des Albumines sentomotoxiques de type 1b des légumineuses. Thèse de doctorat. Lyon, France. P259.

M

- **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires Romandes. Suisse.
- **Macias F.A., Galindo J.C.G., Molinillo J.M., Cutler H.G., 1999.** Recent advances in allelopathy. A science for the future. Universidad de Cadiz. P514.
- **Majester-Savornin B., Elias R., Diaz-Lanza A.M., Balansard G., Gasquet M., 1991.** Saponines of the ivy plant. *Hedera helix* and their leishmanicidal activity. *Planta Med.* Pp260-262.
- **Majure L.C., Judd W.S., Soltis P.S., Soltis D.E., 2012.** Cytogeography of the Humifusa clade of *Opuntia* Mill. (Cactaceae, Opuntioideae, Opuntieae): correlations with pleistocene refugia and morphological traits in a polyploid complex. *Comp Cytogenet.* Pp53–77.
- **Malainine M.E., Dufresne A., Dupeyre D., Mahrouz M., Vuong R., Vignon M.R., 2001.** Structure et morphologie des raquettes et des épines du figuier de barbarie. *Phys. Chem. News.* Pp126-130.
- **Mandouri T., 2000.** Hydromasse et biomasse des *Opuntia*. Cactus: (Opuntia à fruits comestibles). Actes de la journée nationale sur la culture du cactus. El Kelaa des Sraghna. Maroc.
- **Manpreet K., Amandeep K., Ramica S., 2102.** Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* Pp15-18.
- **Mariod A.A., Ibrahim R.M., Ismail M., Ismail N., 2009.** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry.* Pp306-312.
- **Markham K.R., 1982.** Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press.
- **Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C., 2005.** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry.* Pp577-586.

- **Mates J.M., Pérez-Gomez C., De Castro I.N., 1999.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. Pp595-603.
- **Mena S., Ortega A., Estrela J.M., 2009.** Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Pp36-44.
- **McCall M.R., Frei B., 1999.** Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. Pp1034-1053.
- **Miller et Tainter, 1944.** In **Nene BI S. A., Traore F., Zahoui O.S., Soro T.Y., 2008.** Composition chimique d'un extrait aqueux de *bridelia ferruginea* benth. (euphorbiaceae) et études de ses effets toxicologique et pharmacologique chez les mammifères. *Afrique Science*. Pp287-305.
- **Mi-Na Cha, Hyun-II Jun, Won-Jae Lee, Min-Ji Kim, Myung-Kon Kim, Young-Soo Kim, 2013.** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Korean Cactus (*Opuntia humifusa*) Fruit. *Food Sci. Biotechnol.* Pp523-529.
- **Miraldi E., Masti A., Ferri S., Barni C.I., 2001.** Distribution of hyosciamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*. Pp 644-648.
- **Modolo L.V., Reichert A.I., Dixon R.A., 2009.** Introduction to the Different Classes of Biosynthetic Enzymes. *Plant-derived Natural Products; Synthesis, Function, and Application*. London New York. Pp143-150.
- **Mohammedi Z., 2012.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat. Univ. De Tlemcen.
- **Molan P.C., 1999.** The role of honey in the management of wounds. *J Wound Care*. Pp415-418.
- **Monjauze A., Le Houérou H.N., 1965.** Le rôle des *Opuntia* dans l'économie agricole nord-africaine. *Bull. Eco. Nat. Sup. Agr. de Tunis*. Pp 8-9.
- **Moure A., Cruz J.M., Franco D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Carlos Parajo J., 2001.** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. Pp145-171.
- **Mulas M., Mulas G., 2004.** Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Short and Medium-Term Priority Environmental Action Programme (SMAP). Université des études de SASSAR. P112.

- **Muthu C., Ayyanar M., Raja N., Ignacimuthu S., 2006.** Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. Pp1-10.

N

- **Narayan D., Indrajit Karma kar RB S.K., Biswa kanth K., Asis B., Pallab Kanti H., 2010.** Free radical scavenging activity of *Castanopsis indicain* mediating hepatoprotective activity of carbon tetrachloride intoxicated rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Pp242-251.
- **Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C., Perumal G., 2005.** Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*. Pp123-126.
- **Neffar S., 2012.** Etude de l'effet de l'âge des plantations de figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica* L. Miller) sur la variation des ressources naturelles (sol et végétation) des steppes algériennes de l'Est. Cas de Souk- ahras et Tébessa. Thèse de doctorat. Université de badji mokhtar. Annaba.
- **Nefzaoui A., Ben Salem H., 2000.** *Opuntia*: A strategic fodder and efficient tool to combat desertification in the Wana region. *Cactusnet FZAO International Cooperation Network on Cactus Pear News Letter*, pp 2-24.
- **Nefzaoui A., Ben Salem H., 1998.** Spineless cactus: a strategic fodder for West Asia and North Africa arid zones. *International Symposium Proceedings: Cactus pear and nopalitos processing and uses*. Santiago-Chile. P104.
- **Nefzaoui A., Ben Salem H., Ben Salem L., 1995.** Ewe-lambs feeding with cactus based diets. Effect of the type of nitrogen supplement. *IV International Symposium on the nutrition of Herbivores-Satellite: Ruminant use of fodder resources in warm climate countries*. Montpellier-France. 1995.
- **Nerd A., Mizrahi Y., 1994.** Effect of nitrogen fertilization and organ removal on rebudding in *Opuntia ficus indica* (L.). *Scientia Horticulturae*. Pp115-122.
- **Nerd A., 1991.** In: **Habibi Y., 2004.** Contribution à l'étude morphologique, ultra-structurale et chimique de la figue de Barbarie, les polysaccharides pariétaux : caractérisation et modifications chimiques. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier. Faculté Sciences et Géographie (Grenoble I) et Université Cadi Ayyad . Faculté des Sciences (Semlalia, Marrakech).

- **Ncibi S., Ben Othman M., Akacha A., Naceur Krifi M., Zourgui L., 2008.** *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. Food and Chemical Toxicology. Pp797–802.
- **Ndiaye M., Diatta W., Yg Y., Falla D., Faye B., Bassen E., 2008.** Activité antihyperglycémiant de l'extrait éthanolique de feuilles d'*Icacina Sengalensis* Juss (Icacinaceae). Médecine d'Afrique noir. Pp 441- 445.
- **Nizar Y., Cherif J.K., Trabelsi Ayadi M., 2014.** Comparative Study of Antioxidant Power, Polyphenols, Flavonoids and Betacyanins of Peel and Pulp of Three Tunisian *Opuntia* Forms. Pakistan Journal of Biological Sciences. Pp 650-658.
- **Nobel P.S., Russel C.E., Felker P., Medina J.G., Acuna E., 1987.** Nutrient relations and productivity of prickly cacti. Agro. J. Pp 550-555.

O

- **Oguogho A., Yannis E., Jorgos I., Jorgos S., Hossein A., Peter S., Dietmar S., Helmut S., 2009.** Prickly pear changes indium–LDL and indium–HDL platelet binding Correlating to improvement of platelet function in hypercholesterolemia, J. PACD. Pp67-79.
- **OMS 2004 in Bapio V.E.J 2007.** Contribution à l'évaluation de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme et de distribution de gène Kdr au Burkina Faso. Thèse de doctorat.en biologie appliquée et modélisation des systèmes biologique.
- **Ong K.C., Khoo H.E., 1997.** Biological effects of myricetin. Gen Pharmacol. Pp 121-126.
- **Ong K.C., Khoo HE., 2000.** Links Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. Life Sci. Pp 1695-1705.
- **Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., Simons A., 2009.** Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0
- **Osorio-Esquivel O., Ortiz-Moreno A., Garduño-Siciliano L., Valente B.A., Hernández-Navarro M.D., 2012.** Antihyperlipidemic Effect of Methanolic Extract from *Opuntia joconostle* Seeds in Mice Fed a Hypercholesterolemic Diet. Plant Foods Hum Nutr. Pp 365–370.
- **Oussou K.R., coffi K., Nathalie G., Seriyolou, gerard K., Mireille D., Yao T.N., Gilles F., Jean-claude C.H., 2004.** Activité antibacteriennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de cote-ivoire. Comptes rendus de chimie. Pp1081-1086.

P

- **Packer L., Kraemer K., Rimbach G., 2001.** Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. Pp 888-895.
- **Paola S., Mauro B., Manfredi B., Panerai A.E., 1997.** Effects of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in mice. *Pain*. Pp325-330.
- **Pandey K.B., Rizvi S.I., 2009.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Pp 270-278.
- **Patrick-Iwuanyawu K.C., Wegwu M.O., Ayalogu E.O., 2007.** Prevention of CCl₄-induced liver damage by ginger, garlic and vitamin E. *Pak J Biol Sci*. Pp 617-621.
- **Park E.H., Chun M.J., 2001.** Wound healing activity of *Opuntia ficus indica*. *Fitoterapia*. Pp 165-167.
- **Pastre J., Priymenko N., 2007.** Intérêt des antioxydants de l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Med. Vet.* Pp 180-189.
- **Peynet J., Beaudoux J., Legrand A., 2005.** Stress oxydant et athérosclérose. In: **Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont- Rousselot D., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Pp 45-86.
- **Pimienta-Barrios E., 1993.** Vegetable cactus (*Opuntia*). In *Underutilized Crops: Pulses and Vegetables*. Ed J. Williams. London.UK. Pp 177-191.
- **Ponce A.G., Fritz R., DEL Valle C., Roura S.I., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittelwissenschaft und technology*. Pp500-508.
- **Potterat O., 1997.** Antioxydant and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*. Pp415-440.
- **Prieto P., Pineda M., Aguilar M., 1999.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. Pp 337-341.
- **Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Pp4290-4302.
- **Puri D., 2001.** The insulinotropic activity of a Nepalese medicinal plant, *Biophytum sensitivum*: Preliminary experimental study, *Journal of Ethnopharmacology*. Pp89-93.

R

- **Rabhi A., Falleh H., Limam F., Ksouri R., Abdelly C., Raies A., 2013.** Upshot of the ripening time on biological activities, phenol content and fatty acid composition of Tunisian *Opuntia ficus-indica* fruit. African Journal of Biotechnology. Pp5875-5885.
- **Ragunathan V., Sulochana N., 1994.** A new flavonol bioside form the Flowers of *Hibiscus vitifolius* Linn. and its hypoglycaemic activity. J. Ind. Chem. Societ. Pp 705-706.
- **Ramadan F., Morsel J., 2003.** Oil cactus pear (*Opuntia ficus indica* L.). Food Chemistry. Pp 339-345.
- **Rasekh H.R., Nazari P., Kamli-Nejad M., Hosseinzadeh L., 2008.** Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. Journal of Ethnopharmacology. Pp 21-26.
- **Rsaissi N., Bouhache M., Bencharki B., 2013.** Potentiel allélopathique du figuier de barbarie « *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill » sur la germination et la croissance du jujubier « *Ziziphus lotus* (L.) Desf.» International Journal of Innovation and Applied Studies. Pp. 205-214.
- **Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A., Rezaei M.B., 2008.** Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. International Journal of Food Microbiology. Pp135-139.
- **Reed et Muench H.A., 1938.** Simple method of estimating fifty per cent points. Am. J. Hyg. P27.
- **Redoyal L.M., Beltram M., Saucho R., Olmedo D.A., 2005.** Bioorganic and medicinal chemistry Letters. Fitoterapa. Pp4447-4450.
- **Retsky K.L., Chen K., Zeind J., Frei B., 1999.** Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. Free Radical Biology and Medicine. Pp90-98.
- **Reyes-Aguero J.A., Aguirre J.R., Valiente-Banuet A., 2006.** Reproductive biology of *Opuntia*: A review. Journal of Arid Environments. Pp549-585.
- **Rizk A.M., 1982.** Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterrapia. Pp 35-42.
- **Russel C.E., 1986.** Cactus, ecology and range management during drought. Proceeding of the symposium on livestock and wild life management during drought. CaesarKleberg wildlife researches Institute. Univ. Kingsville. Texas. Pp 59-69.

- **Russel C.E., Felker P., 1987.** The prickly pears (*Opuntia* spp, Cactaceae): A source of Human and Animal food in semiarid regions. *Economic botany*. Pp 433-445.

S

- **Saenz C., Sepulveda E., Matsuhira B., 2004.** *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*. Pp 275-290.
- **Sánchez-Moreno C., 2002.** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int*. Pp121-137.
- **Sangare M.M., Sina H., Bayala B., Baba-Moussa L.S., Ategbo J.M., Senou M., Dramane K.L., 2014.** Évaluation de la dose efficace de l'extrait aqueux de *Gomphrena celosioides* face à une hépatopathie induite par le tétrachlorure de carbone. *Ethnopharmacologie. Phytothérapie*. Pp1-6.
- **Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumon C., Bougoudougou F., 2006.** Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Medical*. Pp18-24.
- **Sarkhail P., Rahmanipour S., Fadyevatan S., Mohammadirad A., Dehghan G., Amin G., Shafiee A., Abdollahi M., 2007.** Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta* : Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacological Research*. Pp261-266.
- **Sartori-Thiel A., 2003.** Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. *Science et Agronomie ED 380 Doctorat*: 177.
- **Segura S., Scheinvar L., Olalde G., Leblanc O., Filardo S., Muratalla A., Gallegos C., Flores C., 2007.** Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tournefort) Mill. *Genet Resour Crop Evol*. Pp1033-1041.
- **Seon Hwa L., Oe T., Blair I. A., 2001.** Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*. Pp2083-2086.
- **Sepulveda E., Saenz C., Aliaga E., Aceituno C., 2007.** Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*. Pp534- 545.
- **Schauenberg P., Paris F., 2005.** Guide des plantes médicinales. Analyse, description et utilisation de 400 plantes. Ed. Delachaux et Niestlé.
- **Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P.E., Williams R.J., Cadenas E., Rice-Evans C., 2002.** MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging*. Pp861-880.

- **Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H., 2007.** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*. Pp112-119.
- **Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M., 2012.** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. Pp1-26.
- **Sharma S.B., Nasir A., Prabhu K.M., Murthy P.S., 2006.** Antihyperglycemic effect of 300 the fruit pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*. Pp367 – 373.
- **Shipra G., Sharma S.B., Kumar Bansalb S., Prabhua K.M., 2009.** Antihyperglycemic and hypolipidemic activity of aqueous extract of *Cassia auriculata* L. leaves in experimental diabetes, *J. Ethnopharmacol.* Pp2-19.
- **Siddhuraju P., Becker K., 2007.** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*. Pp10-19.
- **Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., CoulaudV. Stoian J., Brown SC., Zoldos V., Jelenic S., Papes D., 2002:** Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theor Appl Genet*. Pp505–512
- **Skadhauge B., GruberM.Y., Thomsen K.K., Von Wettstein D., 1997.** Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissue. *Am. J. Bot.* Pp494-503.
- **Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., Hagen T.M., 2004.** Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. Pp1135-1146.
- **Somaie S., Kariminik A., Hasanabadi Z., 2013.** Antimicrobial activity of methanol extract of *Opuntia stricta* F. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. Pp907-910
- **Srivastava P., Durgaprasad S., 2008.** Burn wound healing properties of *Cocos nucifera* –An appraisal. *Indian J Pharmacol*. Pp144-146.
- **Stalikas C.D., 2007.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *J. Sep. Sci.* Pp3268-3295.
- **Stebbins GL., 1971.** *Chromosomal Evolution in Higher Plants* .Edward Arnold Publisher.

- **Stintzing F.C., Carle R., 2004.** In: **Mohammer M., Stintzing F., Carle R., 2006.** Evaluation of different methods for production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Pp 275-287.
- **Sudha G., Sangeetha Priya M., Indhu Shree R., Vadivukkarasi S., 2011.** *In vitro* free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*Solanum Muricatum* Aiton). *Int J Curr Pharm Res*. Pp137-140.
- **Sumaya Martinez M.T., 2004.** Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation. *Microbiologie Doctorat*: 188.
- **Sumner A.T., 1994:** Chromosome Banding and Identification. *Methods in Molecular Biology*. Pp1-29.
- **Sy G.Y., Fall A.D., Diatta W., Gueye M., Badji Bassène E., Faye B., 2009.** Analgesic and anti-inflammatory activity of aqueous root extract of *Cassia sieberiana* D. C. (Caesalpinaceae) *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* Pp651-653.

I

- **Tamer E., Moussa-Ayoub, Salah El-Samahy, Sascha Rohn, Lothar W., Kroh, 2011.** Flavonols, betacyanins content and antioxydant of cactus *Opuntia macrorhiza* fruits. *Food research international*. Pp2160-2174.
- **Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El- Elimat T., 2007.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* Pp1372 – 1378.
- **Testud F., 2005.** *Pathologie toxique professionnelle et environnementale.* Éditions Aska. Paris. Pp. 252–255.
- **Tohda M., Marikami Y., Mastsumoto K., Watanabe H., 2004.** Antioxydant and free radical-scavenging activity of choto-san and its related constituents. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. Pp38-46.
- **Trease E.G., Evans W.C., 1978.** *Pharmacognosy.* 11th Edition, Balliere Tindall. London, Pp115-222.
- **Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F., Polat G., 2007.** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. Pp 484-496.

- **Turk M.A., Tawaha A.M., 2003.** Allelopathic effect of black mustard (*Brassica nigra* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.). Crop protection. Pp 673-677.
- **Türkan K., Kasim T., Bircan Ç., Murat K., 2014.** DNA damage protecting activity and in vitro antioxidant potential of the methanol extract of Cherry (*Prunus avium* L). Pp. 715-726.

U

- **Uremis I., Arslan M., Uludag A., 2005.** Allelopathic effects of some brassica species on germination and growth of cutleaf ground-cherry (*Physalis angulata* L.) seeds. Journal of Biological Sciences. Pp 661-665.

V

- **Valko M., Rhodes C.J.b., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions. Pp1-40.
- **Van Acker S., van Balen G.P., van den Berg D.J., Van der Vijgh W.J.F., 1996.** Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. Biochem. Pharmacol. Pp935– 943.
- **Vaz Z.R., Cechinel V., Yunes R.A., Calixto J.B., 1996.** Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethyl Benzofuran, a novel xanthoxylone derivative of chemical and thermal models of nociception in mice. J. Pharmacol, ExP. Pp 304-312.
- **Venkatanarayana D., Kumar A.S., Lakshmi S.M., 2010.** Review on natural wound healing agents. Int. J. Phytopharm. Res. Pp1-4.
- **Vermerris et Nicholson, 2006.** Phenolic compound biochemistry.springer. Pp7-15.
- **Vogel G.H. et Vogel W.H., 1997.** Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities in: during discovery and evaluation pharmacological assay. Springer. Pp 360-418.
- **Vuorela S., 2005.** Analysis, isolation and bioactivities of rapeseed phenolics. Ed.University of Helsinki. Helsinki. Pp 76.

W

- **Waltner-Law ME., Wang X.L., Law B.K., Hall R.K., Nawano M., Granner D.K., 2002.** Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucoseproduction. J Biol Chem. Pp34933-34940.

- **Wajeman H., Lantz B., Girot R., 1992.** Les maladies du globule rouge. Paris. INSERM.
- **Weirong Cai, Xiaohong Gu, Jian Ta N.G., 2010.** Extraction, Purification, and Characterisation of the Flavonoids from *Opuntia milpa* alta Skin. Czech J. Food Sci. Pp108–116.
- **Wollgast J., Anklam E.,2000.** Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International. Pp423-447.

Y

- **Yamini K., Anto Shering M., Praveen Kumar Reddy S., Lakshmi Narasimha Reddy N., 2011.** Pharmacognostical and Preliminary Phytochemical Screening on Leaves of *Trianthema decandra* Linn. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. Pp960-962.
- **Yan-Yun L., Jie-Ping Y., Zhao-Hong S., Wang L., 2004.** Ginkgo biloba extract reverses CCl₄-included liver fibrosis in rats. World J Gastroenterol. Pp1037-1042.
- **Yéwègnon A.E.I.N., Cokou P.A., Alain Y.K., Comlan A.D., Martin P.A., Daouda M., Dominique C.K.S., 2013.** Evaluation of the *Opuntia dillenii* as Natural Coagulant in Water Clarification: Case of Treatment of Highly Turbid Surface Water. Journal of Water Resource and Protection. Pp1242-1246.
- **Yildirim A., Mavi A. et Kara A., 2001.** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Pp411-420.
- **Yoshida H., Kajimoto G., Emura S., 1993.** Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. Journal of the American Oil Chemists' Society. Pp989-995.
- **Yost R.W., Ettre L.S., Conlon R.D., 1980.** Practical liquid chromatography. An introduction. Perkin-Elmer. U.S.A. P 255.

Résumés

Résumé

Le figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica*), cactus appartenant au genre *Opuntia*, qui recèle de multiples propriétés médicinales.

Dans le but d'étudier l'organisation du génome de cette espèce, on a eu recours à des méthodes de cytogénétique classique par la coloration au carmin acétique et la coloration aux nitrates d'argent (AgNO_3). L'espèce est octoploïde à $2n=88$ avec un nombre de base $x=11$. L'établissement du caryotype a mis en évidence la présence de trois types chromosomiques. La coloration aux nitrates d'argent a révélé un nombre de nucléoles variant de 1 à 4 avec une majorité de 1 nucléole par cellule ce qui indique qu'il y a un site actif.

Notre travail a porté aussi sur l'étude des extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica*. L'analyse de ces extraits par l'HPLC et les tests colorimétriques ont révélé la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols totaux) susceptibles d'exprimer les activités recherchées. Les activités antiradicalaires ont été évaluées à travers des tests chimiques tels que les tests de piégeage de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle OH, DPPH, FRAP et par la méthode de phosphomolybdate. Les résultats obtenus montrent une activité réductrice élevée de certains extraits. Le pouvoir antibactérien des extraits a été évalué par la méthode de diffusion en milieu solide et la CMI a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats montrent que l'EAc possède le plus fort pouvoir sur la souche *Staphylococcus aureus*.

Les résultats des tests toxicologiques réalisés *in vitro* et *in vivo*, sur des érythrocytes isolés du sang, sur des larves, des rats et lapins indiquent que cette plante est très faiblement toxique.

Les différents tests pharmacologiques réalisés *in vivo* de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* montrent qu'il possède des propriétés importantes : hypoglycémiant, activité analgésique très significative ; utilisant les modèles de douleurs induites par des stimuli chimiques et thermiques, une meilleure contraction des plaies pendant la réaction inflammatoire et la phase proliférative, et aussi il provoque une nette amélioration du statut antioxydant hépatique chez des rats y ont une toxicité hépatique induite par le CCL4.

Les composés allélopathiques détectés dans les raquettes du figuier de barbarie sont des composés phénoliques qui ont un effet inhibiteur sur la germination et la croissance de la plante cible.

Mots clés : *Opuntia ficus indica*, cytogénétique, HPLC, Activité antiradicalaire, Pouvoir antimicrobien, Toxicité, Pharmacologie, Potentiel allélopathique.

Abstract

The prickly pear (*Opuntia ficus indica*), it's cactus of the genus *Opuntia*, which contains a many medicinal properties.

The organization of the genome study of this species by using the conventional cytogenetics methods: acetic carmine and silver nitrate (AgNO_3) staining, indicates that this species is octoploid $2n = 88$ with a base number $x = 11$. The karyotype reveals the presence of three types of chromosome. The coloration with a silver nitrate indicates a number of nucleoli varies from 1 to 4 with a majority of one nucleolus per cell found that there is an active site.

Our work has focuses also on *Opuntia ficus indica* cladods extracts study. The analysis of these extracts by HPLC and colorimetric tests shows the presence of some chemical groups (total polyphenols) capable of expressing the desired activity. Theirs antiradical activities are evaluated through chemical tests such as hydrogen peroxide, hydroxyl radical, DPPH, FRAP scavenging tests and the phosphomolybdate method. The result shows a high reducing activity of certain extracts. The antibacterial activity of this extracts is evaluated by the solid medium diffusion and the MIC is determined by the liquid medium dilution methods. The results show that the EAc has the highest power on the *Staphylococcus aureus* strain.

The results of toxicology tests performed *in vitro* and *in vivo*, on erythrocytes blood isolates, larvae, rats and rabbits indicate that this plant has very low toxicity.

The various pharmacological tests perform *in vivo* of the aqueous extract of *Opuntia ficus indica* shows that it has important properties: hypoglycemic, very significant analgesic activity; using pain models induced by chemical and thermal stimuli, better wound contraction during the inflammatory response and the proliferative phase, and also it causes a significant improvement in hepatic antioxidant status in rats there were liver toxicity induced by CCL4.

Allelopathic compounds detected in the cladods of prickly pear are phenolic compounds that have an inhibitory effect on the germination and growth of the target plant.

Key-words

Opuntia ficus indica, Cytogenetic, HPLC, Radical scavenging activity, Antimicrobial power, Toxicity, Pharmacology, Allelopathic potential.

Annexe

Annexe 1 : Préparation des solutions utilisées**➤ Préparation de 8 hydroxy-quinoléine 0.002mol / litre**

- 0.03 g de la 8 hydroxy-quinoléine dans 100ml d'eau distillée.

➤ Préparation de l'éthanol acétique

- On prend 3 volumes d'éthanol pour un volume d'acide acétique

➤ Préparation de HCl 1 N

- Prendre HCl fumant, $PM = 36.46 \text{ g/l}$, $d = 1.18$, HCl : 37%
 $P / v = d \cdot v = p / d = 36.46 / 1.18 = 30.63 \text{ ml/l}$
Soit : $30.36 \times 100 / 37 = 82.78 \text{ ml}$ dans 1 litre

➤ Préparation du carmin Acétique (comme colorant des chromosomes) il faut 55 ml d'eau, 45 ml d'acide acétique et 0,5 g de poudre de carmin: faire bouillir le mélange eau + acide acétique, ajouter le carmin, maintenir l'ébullition 5 minutes, laisser refroidir puis filtrer. Le colorant obtenu se conserve au moins deux ans au frigo.**➤ Préparation de la Liqueur de Fehling****Solution A**

Dans un erlenmeyer de 250 ml : Dissoudre 7g de sulfate de cuivre pentahydraté dans 100 ml d'eau.

Solution B

Dans un erlenmeyer de 250 ml : Dissoudre 34,6 g de tartrate double de sodium et de potassium, 10 g d'hydroxyde de sodium dans 100 ml d'eau.

Annexe2 : Composition du Cicatryl

- Aqua ;
- Cetylalcohol;
- Petrolalum ;
- Isopropyl myristate ;
- Sorbitol;
- Glyceryl stearate;
- Hydroxypropyl starch phosphate;
- PEG 75-stearate;
- Chlorhexidinedigluconate;
- Tocopheryl acetate;
- Cteth-20;
- Stearath -20;
- Polyacrylamide;
- C13-14isoparaffin;
- Laureth7;
- Methylparaben;
- Propylparaben;
- Imidazolidinylurea.

Nom : **Halmi**

Prénom : **Sihem**

Doctorat en Science : Option Biotechnologie végétale

Titre : Etude botanique et phytochimique : Approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus indica*

Résumé

Le figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica*), cactus appartenant au genre *Opuntia*, qui recèle de multiples propriétés médicinales.

Dans le but d'étudier l'organisation du génome de cette espèce, on a eu recours à des méthodes de cytogénétique classique par la coloration au carmin acétique et la coloration aux nitrates d'argent (AgNO_3). L'espèce est octoploïde à $2n=88$ avec un nombre de base $x=11$. L'établissement du caryotype a mis en évidence la présence de trois types chromosomiques. La coloration aux nitrates d'argent a révélé un nombre de nucléoles variant de 1 à 4 avec une majorité de 1 nucléole par cellule ce qui indique qu'il y a un site actif.

Notre travail a porté aussi sur l'étude des extraits de raquettes d'*Opuntia ficus indica*. L'analyse de ces extraits par l'HPLC et les tests colorimétriques ont révélé la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols totaux) susceptibles d'exprimer les activités recherchées. Leurs activités antiradicalaires ont été évaluées à travers des tests chimiques tels que les tests de piégeage de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle OH, DPPH, FRAP et par la méthode de phosphomolybdate. Les résultats obtenus montrent une activité réductrice élevée de certains extraits. Le pouvoir antibactérien des extraits a été évalué par la méthode de diffusion en milieu solide et la CMI a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats montrent que l'EAc possède le plus fort pouvoir sur la souche *Staphylococcus aureus*.

Les résultats des tests toxicologiques réalisés *in vitro* et *in vivo*, sur des érythrocytes isolés du sang, sur des larves, des rats et lapins indiquent que cette plante est très faiblement toxique.

Les différents tests pharmacologiques réalisés *in vivo* de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica* montrent qu'il possède des propriétés importantes : hypoglycémiant, activité analgésique très significative ; utilisant les modèles de douleurs induites par des stimuli chimiques et thermiques, une meilleure contraction des plaies pendant la réaction inflammatoire et la phase proliférative, et aussi il provoque une nette amélioration du statut antioxydant hépatique chez des rats y ont une toxicité hépatique induite par le CCL4.

Les composés allélopathiques détectés dans les raquettes du figuier de barbarie sont des composés phénoliques qui ont un effet inhibiteur sur la germination et la croissance de la plante cible.

Mots clés : *Opuntia ficus indica*, cytogénétique, HPLC, Activité antiradicalaire, Pouvoir antimicrobien, Toxicité, Pharmacologie, Potentiel allélopathique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. Institut des sciences Vétérinaires. Université Constantine 1. Algérie

Directeur de Thèse : Prof HAMDY PACHA youcef