



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
Centre d'Etudes Doctorales
"Sciences et Technologies"

**Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et
Développement Durable**

Discipline : Biologie

Spécialité : Biotechnologie et Chimie Médicinale

**Laboratoire : Neuroendocrinologie, Environnement Nutritionnel et
Climatique**

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

B O U K H I R A S m a h a n e

**Vers d'innovants conservateurs naturels pour la cosmétique :
Applications du challenge test et évaluation de leurs activités biologiques**

Soutenue le 14/12/2017 devant le jury composé de :

Pr. EL KHANCHOUFI Abdessalam	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès	Président
Pr. EL OUEZZANI TAYBI Seloua	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès	Rapporteur
Pr. EL JAOUDI Rachid	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V - Rabat	Rapporteur
Pr. ZAIR Touria	Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail - Meknès	Rapporteur
Pr. FIKRI BENBRAHIM Kawtar	Faculté des Sciences et Techniques - Fès	Examinatrice
Pr. BARI Amina	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès	Examinatrice
Pr. ACHOUR Sanae	Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès	Examinatrice
Pr. BOUSTA Dalila	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès	Directrice de thèse

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

1. **Smahane Boukhira**, Mounyr Balouiri, Latifa El Mansouri, Amal El Hamsas El Youbi, Mouna Bouarfa, Siham Lebtar, Ahmed Ouhammou, Dalila Boust. Development of natural preservative from *Silene vulgaris* extract in topical formulation under a challenge test and its stability study. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2017; 7(04): 142-148.
2. **Smahane Boukhira**, Latifa El Mansouri, Mouna Bouarfa, Ahmed Ouhammou, Sanae Achour, Maroua Khadhr and Dalila Boust. Phytochemical screening, anti-inflammatory and analgesic activities of formulation cream of *Silene vulgaris*. Research journal of medicinal plant, 2016, 10 (2): 150-158.
3. **Smahane Boukhira**, Mounyr Balouiri, Faisl Boust, Stephane Moularat, Mohammed Sghir Taleb, Dalila Boust. Antimicrobial activities of essential oil of five plant species from morocco against some microbial strains. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016; 8(11); 1901-1906.
4. **Smahane Boukhira**, Dalila Boust, Latifa El Mansouri, Aicha Nordine, Amal Hamsas El Youbi, Abdeljalil Daoudi. Phytochemical studies, antioxidant activity and protective effect on dna damage and deoxyribose of *Silene vulgaris* extract from morocco. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 2015, 7(6); 1172-1178.
5. **Smahane Boukhira**, Latifa EL Mansouri, Dalila Boust. Ethnobotanical studies of some medicinal and cosmetic plants used in the province of Sefrou, Middle Atlas of Morocco. The Journal of Ethnobiology and Traditional Medicine Photon 2013; 120, 661-670.
6. **Smahane Boukhira**, Faisl Boust, Stephane Moularat, Abdelfattah Abdellaoui, Zineb Benziane Ouaritini, Dalila Boust. Preservative efficacy of *Origanum elongatum* essential oil in topically applied formulation under a challenge test. Phytoterapie, 2017 (accepté).
7. **Smahane Boukhira**, Faisl Boust, Stephane Moularat, Mounyr Balouiri, Aicha Nordine, Dalila Boust. Antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus broussonetii* boiss. essential oil and its efficacy as a preservative in cream formulation. Article soumis au "Advanced Pharmaceutical Bulletin" 2017.
8. **Smahane Boukhira**, Dalila Boust, Amal El Youbi-El Hamsas, Fatiha Sounni, Sanae Achour, Mohammed Merzouki, Mohamed Benlemlih. Chemical composition,

toxicological studies, human skin and eye irritation of cream formulation containing extract of *Silene vulgaris*. Article soumis au "American Journal of Therapeutics" 2017.

**PUBLICATIONS INTERNATIONALES EN COLLABORATION AVEC L'EQUIPE
DE RECHERCHE LPAMSN et LANENC**

1. Dalila Bousta, **Smahane Boukhira**, Abderrahman Aafi, Mohamed Ghanmi, Latifa el Mansouri. Ethnopharmacological Study of anti-diabetic medicinal plants used in the Middle-Atlas region of Morocco (Sefrou region), International Journal of Pharma Research and Health Sciences, 2014; 2 (1): 75-79.
2. Mouna Bouarfa, **Smahane Boukhira**, Khalid Bekkouche, Abdessalam El Khanchoufi, Farah Abdellah, Dalila Bousta; Botanical, chemical and microscopical comparative study of two chemotypes of cannabis sativa growing in Morocco (province of Taounate). International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 2015, 7(6); 1153-1159.
3. Hassane Akdime, **Smahane Boukhira**, Latifa El Mansouri, Amal Hamsas El Youbi, Dalila Bousta. Ethnobotanical study and traditional knowledge of Medicinal Plants in Ain Leuh Region (Middle-Atlas of Morocco). American Journal of Advanced Drug Delivery, 2015; 3(3): 248-263.
4. Amal EL Hamsas EL Youbi, Latifa EL Mansouri, **Smahane Boukhira**, Abdeljlil Daoudi, and Dalila Bousta. *In vivo* anti-inflammatory and Analgesic Effects of aqueous extract of *Cistus ladanifer* L. from Morocco. American Journal of Therapeutics, 2016; 23(6): e1554–e1559.
5. Latifa El Mansouri, Dalila Bousta, **Smahane Boukhira**, Mounyr Balouiri, Abdessalam El Khanchoufi, Hassane Akdime, Bahia Bennani, Sanae Achour. Phytochemical screening and anti-inflammatory property of one recipe from moroccan traditional medicine. International Journal of Phytopharmacology, 2014; 5(2): 76-84.
6. Latifa EL Mansouri, Dalila Bousta, Amal EL Hamsas EL Youbi, **Smahane Boukhira**, Hassane Akdime. Phytochemical screening, Antidepressant and Analgesic effects of aqueous extract of *Anethum graveolens* L. from southeast of Morocco. American Journal of Therapeutic. 2016; 23(6): e1695–e1699.
7. Ez Zoubi Yassine, Bousta Dalila, El Mansouri Latifa, **Boukhira Smahane**, Siham Lebtar, Achour Sanae, Farah Abdellah: Phytochemical screening, anti-inflammatory activity and acute toxicity of hydro-ethanolic, flavonoid, tannin and mucilage extracts of *Lavandula*

stoechas. from Morocco" International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research, 2016, 7(6); 31-37.

8. Khadhr Maroua, Boustia Dalila, Hanane El Hajaji, El Mansouri Latifa, **Boukhira Smahane**, Lachkar Mohammed, Jamoussi Bassem, Boukhchina Sadok. HPLC and GC-MS analysis of Tunisian *Peganum harmala* seeds oil and evaluation of some biological activities. Less American Journal of Therapeutics. Post Author Corrections: April 07, 2016. (in press)
9. Zineb Benziane Ouaritini, Marwa Chraibi, Kawtar Fikri Benbrahim, Rabab Ez-zriouli, **Smahane Boukhira**, Najoua Darkaoui, and El Houssine Derwich. Phytochemical and antibacterial activity of the essential oil of *Artemisia herba-alba* from Morocco. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 2016; 11(6): 40-45.

COMMUNICATIONS DANS DES MANIFESTATIONS INTERNATIONALES

Smahane Boukhira, El Mansouri Latifa, El Hamsas El Youbi Amal, Bouarfa Mouna, Lebtar Siham, AMRATI Fatima ez-zahra, Bousta Dalila. Caractérisation phytochimique et profil anti-inflammatoire et antinociceptif de la crème formulée à base de *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. 2ème Edition du Congrès International Substances Naturelles et Développement Durable, du 19 au 21 Mai 2016 à Faculté des Sciences, Rabat. CO.I.2, page 21.

Smahane Boukhira, Latifa El Mansouri, Dalila Bousta. Evaluation de l'activité antioxydante de *Silene vulgaris*. 6^{èmes} Journées Scientifiques du CeDoc SVS et les 3^{èmes} journées d'AMADOC, Du 4 au 7 mars 2015, à la faculté de médecine et de pharmace Rabat, Maroc. Numéro CA 118 page185.

Smahane Boukhira, Dalila Bousta, Latifa El Mansouri. Etude ethnobotanique et ethnopharmacologique de certaines plantes médicinales et cosmétiques utilisées dans la province de Sefrou, Moyen Atlas du Maroc. Rencontre Internationale des Jeunes Chercheurs sur les Plantes Aromatiques et Médicinales, du 29 au 31 Octobre 2014, Faculté des sciences, Meknès, Maroc. CA 14, page 95.

Smahane Boukhira, Dalila Bousta. Antioxidant activity and protective effect on DNA damage and deoxyribose of *Silene vulgaris* extract from Morocco. Rencontre Internationale des Jeunes Chercheurs sur les Plantes Aromatiques et Médicinales, du 29 au 31 Octobre 2014 à la faculté des sciences, Meknès, Maroc. CA 22, page 120.

Reda Lagzizir, **Smahane Boukhira**, Lebtar Siham, Latifa El Mansouri, El Hamsas El Youbi Amal, Dalila Bousta, Amina Bari. Etudes phyto-chimiques et evaluation du pouvoir hemolytique des gommés des Acacias spontanées du Maroc. 1^{er} congrès Internationale : Maladies chroniques et qualité de vie, 15 et 16 Décembre 2016, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Fès. CO 50, page 74.

Latifa El Mansouri, Dalila Bousta, **Smahane Boukhira**. Phytochemical screening, antioxidant and anti-inflammatory properties of the gum of *Acacia nilotica* from Southeast of Morocco. La 3^{ème} Edition des Journées Jeunes Chercheurs 2014 «Innovation thérapeutique: du fondamental à l'appliqué», 20-22 Novembre 2014, Faculté des Sciences de Rabat.

COMMUNICATIONS NATIONALES

Smahane Boukhira, Siham Lebtar, Mouna Bouarfa, Latifa El Mansouri, Dalila Bousta. Etude phytochimique et activités anti-inflammatoire et antinociceptive de la crème de *Silene vulgaris*. Première journée scientifique du doctorant en Biologie de l'USMBA, sous le thème : Pharmacologie et Agroalimentaire, le 13 octobre 2015 à la Faculté des sciences et Techniques, Fès, Maroc. CO 10, page 20.

Mouna Bouarfa, **Smahane Boukhira**, Khalid Bekkouche, Abdellah Farah, Dalila Bousta. Etude comparative botanique, microscopique et chimique de trois variétés de *Cannabis sativa* dans la province de Taounate. Première journée scientifique du doctorant en Biologie de l'USMBA, sous le thème : Pharmacologie et Agroalimentaire, le 13 octobre 2015 à la Faculté des sciences et Techniques, Fès, Maroc. CA 16, page 43.

Hassane Akdim, **Smahane Boukhira**, Latifa El Mansouri, Dalila Bousta. Etude ethnobotanique et ethnopharmacologique de quelques plantes médicinales et aromatiques de la région d'Ain Leuh. Première journée scientifique du doctorant en Biologie de l'USMBA, sous le thème : Pharmacologie et Agroalimentaire, le 13 octobre 2015 à la Faculté des sciences et Techniques, Fès, Maroc. CA 14, page 41.

PRIX DU FORUM DES DOCTORANTS

2^{ème} Prix de la meilleure présentation orale de travail de thèse organisé par le deuxième Forum du Pôle de Biotechnologie 2016-2017, le 20 décembre 2016 à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz. Fès, Maroc. Évaluation du profil anti-inflammatoire, antinociceptif et antioxydant de la crème formulée à base de *Silene vulgaris*. **Boukhira Smahane**, Lebtar Siham, Bouarfa Mouna, El Hamsas El Youbi Amal, El Mansouri Latifa, AMRATI Fatima Ez-zahra, Lagzizir Rida, Bousta Dalila.

Dédicaces

A mes chers parents, pour leur amour, leur soutien et tous leurs sacrifices qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts. Qu'ils trouvent dans ce travail une récompense des espoirs qu'ils ont su mettre en moi

A ma chère sœur

A mes chers frères

A tous ceux qui me sont chers

REMERCIEMENTS

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été effectués au sein du Laboratoire de Toxico-Pharmacologie à l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA), ainsi que au Laboratoire de Neuroendocrinologie et Environnement Nutritionnel et Climatique (LANENC) à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah-Fès, sous La direction du Professeur **Dalila BOUSTA**.

J'adresse ma profonde gratitude à ma Directrice de thèse, Pr **Dalila BOUSTA**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès, Laboratoire de Neuroendocrinologie et Environnement Nutritionnel et Climatique (LANENC) et qui était Directrice Adjointe Chargée de la Recherche, la Coopération et la Formation Continue et Responsable du Laboratoire de Toxico-Pharmacologie à l'INPMA-Taounate, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir fait l'honneur de diriger ces travaux de recherche durant lesquels elle m'a offert sa confiance, ses conseils qui m'ont été d'une aide précieuse et le soutien moral qu'elle a su m'apporter tout au long de ce parcours, tout en restant l'exemple absolu du travailleur infatigable, avec un sens aigu pour le détail, ce qui m'a toujours motivé pendant ce travail. Merci de m'avoir transmis de nouveaux principes scientifiques, de m'avoir été ici patiente avec moi et de m'avoir aidé dans les moments les plus difficiles. J'ai beaucoup apprécié son esprit ouvert aux nouvelles initiatives, ce qui traduit ainsi sa vision sur la formation d'un chercheur et sa capacité à devenir autonome. J'espère pouvoir poursuivre ce qu'elle m'a enseigné dans ma carrière professionnelle.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche.

Je tiens à remercier Monsieur **EL KHANCHOUFI Abdessalam**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect. En outre, je tiens à exprimer ma très vive reconnaissance à Monsieur **EL KHANCHOUFI**, Ex-Directeur de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA) de Taounate, pour m'avoir accueilli au sein de l'INPMA, me permettant ainsi d'effectuer ces travaux de recherche dans les meilleures conditions.

Mes remerciements vont aussi à Madame **EL OUEZZANI TAYBI Seloua**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, d'avoir ménagé son temps pour juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur **EL JAUDI Rachid**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour le temps qu'il a consacré en tant que rapporteur à l'examen de ce travail et également pour la peine qu'il s'est donnée pour son déplacement.

Je voudrais également remercier Madame **Zair Touria**, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteur et pour s'être déplacée pour ma soutenance.

Je tiens à remercier Madame **FIKRI BENBRAHIM Kawtar**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce modeste travail en tant qu'examinatrice.

Mes remerciements vont également à Madame **BARI Amina**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, c'est un honneur pour moi de la voir siéger parmi les membres de jury de ce travail.

Que Madame **ACHOUR Sanae**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être examinatrice et de participer au jury de ce travail.

Ce travail aurait été incomplet sans la mise en place de collaborations essentielles, permettant notamment d'approfondir la partie pharmacologique et microbiologique de cette étude.

Pour cela, j'adresse mes vifs remerciements au Professeur **Ahmed OUHAMMOU**, Laboratoire Ecologie & Environnement, de la Faculté des Sciences-Semlalia, de Marrakech, ainsi que Monsieur **Taleb Mohammed SGHIR**, Professeur à l'Institut Scientifique, Département de Botanique et Ecologie Végétale, Université Mohammed V Agdal de Rabat pour m'avoir identifié les espèces végétales étudiées.

Je remercie les Professeurs **Rivero-Pérez MD** et **Gonzalez-Sanjosé ML** et leur équipe, du Laboratoire de Biotechnologie Agro-alimentaire, Université de Burgos, Espagne, ainsi que **Latifa** et **Aicha** pour les analyses phytochimiques, l'activité antioxydante et les tests d'ADN *in vitro* de nos extraits.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur **BENLEMLIH Mohamed**, Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès et Professeur **MERZOUKI Mohammed**, Responsable du Laboratoire de Biotechnologie, ainsi que la doctorante **Fatiha**, qui m'ont aidé à réaliser les analyses chromatographiques HPLC.

Je remercie également Professeur **Khalid BEKKOUCHE**, Responsable du Laboratoire de Biotechnologie, Protection et Valorisation des Ressources Végétales, Equipe Phytochimie et Pharmacologie des Plantes Aromatiques et Médicinales, de la Faculté des Sciences-Semlalia, de Marrakech, ainsi que son équipe, qui m'ont aidé à effectuer les analyses chimiques et l'activité antioxydante.

Je remercie Madame **Sanae ACHOUR**, Médecin Toxicologue et Professeur au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Fès, ainsi que son équipe, qui m'ont aidé à effectuer les analyses biochimiques.

Je remercie Professeur **Abdellah FARAH**, Laboratoire Chimie Organique Appliquée à la FST de Fès et Responsable auparavant du laboratoire de Chimie à l'INPMA, pour les extractions effectuées au sein de son laboratoire.

Je remercie également le doctorant **Mounyr Balouiri** pour sa précieuse aide pour instaurer les bases du travail en microbiologie. Je remercie aussi tous les autres membres de l'INPMA pour leur sympathie et leur grande disponibilité.

Mes remerciements les plus chaleureux sont dédiés à tous (tes) mes amis (es) et plus précisément **Khadija, Sanae, Mouna, Siham, Fatima Ez-zahra, Rida, Amal, Leila, Amal, Meryem, et Iman**, ... et tous ceux que j'aurais pu oublier, pour leur présence, leur soutien, pour tous les moments partagés et ceux à venir. Merci de vos amitiés qui me sont chères.

Un grand Merci à toutes les personnes interviewées dans la région de Sefrou pour les informations fournies et qui ont servies comme base de travail et de réflexion de cette thèse.

Enfin, une pensée pour tous les animaux utilisés au cours de cette thèse : sans eux, ce travail n'aurait jamais vu le jour !!

Merci à toutes et tous!

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Situation géographique de la zone d'étude.....	11
Figure 2. Exemple de quelques conservateurs utilisés en cosmétique	20
Figure 3. Structure de la surface d'une cellule bactérienne	25
Figure 4. Cycle de croissance microbienne.....	26
Figure 5. Principaux composés naturels (ou synthétiques) possédant des propriétés antioxydantes.....	33
Figure 6. Formation et piégeage du radical $ABTS^{•+}$ par un antioxydant donneur de $H^•$	35
Figure 7. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH $^•$	36
Figure 8. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP	36
Figure 9. Initiation de l'inflammation	41
Figure 10. Médiateurs de l'inflammation	46
Figure 11. Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens	48
Figure 12. Exemples de structures d'anti-inflammatoires stéroïdiens de synthèses	49
Figure 13. Structures chimiques de quelques analgésiques.....	52
Figure 14. Situation des zones d'enquête sur la région de Sefrou	55
Figure 15. Courbe d'étalonnage de la Quercétine	63
Figure 16. Courbe d'étalonnage de l'acide oléanolique.....	64
Figure 17. Courbe d'étalonnage de Trolox en fonction de la réduction de l'ABTS	71
Figure 18. Courbe d'étalonnage de Trolox en fonction de la réduction de DPPH	72
Figure 19. Courbe d'étalonnage de $FeSO_4$	72
Figure 20. Plantar Test Ugo Basile.....	77
Figure 21. Parties utilisées des plantes.....	92
Figure 22. Fréquence d'utilisation des plantes par classes d'âge	92
Figure 23. Fréquence d'utilisation des plantes selon le niveau d'étude.....	92
Figure 24. Pourcentage des femmes et des hommes utilisant les plantes	93
Figure 25. Fréquence d'utilisation des plantes en médecine traditionnelle dans la région de Sefrou	94
Figure 26. Etude microscopique de la poudre de <i>Silene vulgaris</i>	98

Figure 27. Zones d'inhibition de certaines huiles essentielles	108
Figure 28. Essai de microdilution sur microplaque pour la détermination de la CMI	108
Figure 29. Crème contenant l'extrait de <i>S. vulgaris</i>	112
Figure 30. Réduction du Log CFU/g suite à l'incorporation de l'extrait de <i>S. vulgaris</i> dans la crème, mesurée lors du challenge test pour chacune des souches bactériennes et fongiques	117
Figure 31. Réduction du Log CFU/g, mesurée lors du challenge test pour chacune des souches microbiennes, suite à l'utilisation de l'HE d' <i>Origanum elongatum</i> comme conservateur	120
Figure 32. Illustration de quelques résultats obtenus pour le challenge test de l'HE vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	122
Figure 33. Réduction du Log CFU/g mesurée lors du challenge test pour chacune des souches microbiennes, suite à l'utilisation de l'HE de <i>Thymus broussonetii</i> comme conservateur	123
Figure 34. Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose d'ADN endommagé induite par Cu (II), acide ascorbique et effet de l'extrait <i>S. vulgaris</i>	130
Figure 35. Activité antioxydante des HE évaluées par la méthode DPPH.....	131
Figure 36. Activité antioxydante des HE évaluées par la méthode de FRAP	132
Figure 37. Activité antioxydante des HE évaluées par la méthode de β -carotène	133
Figure 38. Poids corporel des rats traités en application aiguë avec la crème de <i>S. vulgaris</i>	141
Figure 39. Poids corporel des rats traités en administration unique avec l'extrait hydroéthanolique de <i>S. vulgaris</i>	142
Figure 40. Poids corporel des rats traités en administration répétée pendant 28 jours avec la crème de <i>S. vulgaris</i>	146
Figure 41. Exemples du test OPI de l'irritation oculaire.....	149

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemples d'extraits aux propriétés conservatrices présents sur le marché de la cosmétique	23
Tableau 2. Quelques exemples de maladies inflammatoires et ses origines	47
Tableau 3. Exemples de plantes médicinales dotés d'activités anti-inflammatoires.....	51
Tableau 4. Gradient d'élution.....	65
Tableau 5. Composition de la crème formulée	66
Tableau 6. Critères d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne d'un produit cosmétique ...	70
Tableau 7. Liste de différents usages de plantes en médecine traditionnelle dans la région de Sefrou.....	83
Tableau 8. Rendements des composés bioactifs	99
Tableau 9. Criblage phytochimique de l'extrait hydro-éthanolique de <i>S. vulgaris</i>	100
Tableau 10. Teneurs en composés chimiques de l'extrait de <i>S. vulgaris</i>	101
Tableau 11. Analyse qualitative de l'extrait de <i>S. vulgaris</i> par HPLC.....	102
Tableau 12. Analyse des compositions chimiques par CPG/SM des huiles essentielles.....	104
Tableau 13. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentrations Minimales Microbicides (CMM) de l'extrait de <i>S. vulgaris</i>	106
Tableau 14. Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles vis-à-vis des souches microbiennes	107
Tableau 15. Détermination de la CMI des huiles essentielles étudiées	109
Tableau 16. Détermination de la CMB et CMF des huiles essentielles étudiées	110
Tableau 17. Composition et pH de la formulation étudiée par le biais du challenge test.....	111
Tableau 18. Charge microbienne de la crème à base de <i>S. vulgaris</i> à 20%	112
Tableau 19. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> de la crème formulée à partir de <i>S. vulgaris</i>	136
Tableau 20. Effet anti-inflammatoire subaiguë de la crème de <i>S. vulgaris</i> en utilisant le test du granulôme au pellet de coton.....	137
Tableau 21. Effet anti-inflammatoire subaiguë de la crème de <i>Silene vulgaris</i> sur le poids corporel et le poids du thymus	138
Tableau 22. Effet analgésique de la crème de <i>Silene vulgaris</i>	139
Tableau 23. Effet analgésique de la crème <i>S. vulgaris</i> dans le Plantar test.....	139

Tableau 24. Effet de la crème de <i>S. vulgaris</i> à 20% sur le poids relatif des organes	142
Tableau 25. Effet de l'extrait de <i>S. vulgaris</i> sur le poids relatif des organes	143
Tableau 26. Evaluation des paramètres biochimiques après l'application aiguë de la crème de <i>S. vulgaris</i>	144
Tableau 27. Evaluation des paramètres biochimiques après une administration orale de l'extrait de <i>S. vulgaris</i>	145
Tableau 28. Effet de la crème de <i>S. vulgaris</i> à 20% sur le poids relatif des organes.	147
Tableau 29. Evaluation des paramètres biochimiques après une application locale de la crème de <i>S. vulgaris</i> pendant 28 jours	148
Tableau 30. Incidence de l'irritation oculaire en OPI test après l'exposition de l'extrait de <i>S. vulgaris</i> à 20%	150
Tableau 31. Réaction cutanée après l'application de la crème <i>S. vulgaris</i> à 20% (Patch test)	151

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ABTS: Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylBenzoThiazolin-6-Sulfonique)

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AINS : Anti-inflammatoire Non-Stéroïdien

AIS : Anti-inflammatoire Stéroïdien

ALT : Alanine Amino Transférase

AST : Aspartate Amino Transférase

ATCC : American Type Culture Collection

A. brasiliensis : *Aspergillus brasiliensis*

BHT : 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène

C. albicans : *Candida albicans*

CFU: Unités Formant Colonies

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMM : Concentration Minimale Microbicide

CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CTFA: Cosmetic, Toiletry and Frangrance Association

DPPH: 2, 2-DiPhényl-1-PicryHydrazyl

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

FeCl₃: Chlorure Ferrique

FRAP: Pouvoir Antioxydant par Réduction Ferrique

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée

HE: Huile Essentielle.

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

ICDRG: International Contact Dermatitis Research Group

ICE: Isolated Chicken Eye

IL-1: Interleukine 1

LPS : Lipopolysaccharides

MDA : Malonaldehyde

MHA: Muller Hinton Agar

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

OECD: Organisation for Economic Cooperation and Development

OPI : Œil de Poulet Isolé

ORAC: Capacité d'Absorption des Radicaux Oxygénés

P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa

PA : Phosphatase Alcaline

PGE-2 : Prostaglandine

S. aureus : Staphylococcus aureus

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

SDB: Sabouraud Dextrose Bouillon

TBA: Acide Thio-Barbiturique

TEAC: Capacité Antioxydante Equivalente en Trolox

TNF: Tumor Necrosis Factor

Trolox : Acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthylchroman-2carboxylique

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

Sommaire

PUBLICATIONS	I
DÉDICACES	VI
REMERCIEMENTS	VII
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX	XII
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	XIV
INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
CHAPITRE I: UTILISATION TRADITIONNELLE DE CERTAINES PLANTES MEDICINALES ET COSMETIQUES DANS LA REGION DE SEFROU	5
Introduction	6
1. Diversité climatique et géographique du Maroc	7
2. Originalité de la flore marocaine.....	7
3. Place des plantes dans la thérapeutique.....	7
3.1. Phytothérapie.....	7
3.2. Phytocosmétique	8
3.2.1. Extraits végétaux phytocosmétiques	8
3.2.2. Excipients utilisés en phytocosmétologie	9
4. Présentation de la zone d'étude	9
4.1. Situation géographique.....	9
4.2. Province de Sefrou	9
4.2.1. Données générales.....	9
4.2.2. Biodiversité de la région de Sefrou	10
5. Etude ethnopharmacologique des plantes sélectionnées	11
5.1. Monographie des espèces sélectionnées.....	11
5.1.1. <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke.....	11
5.1.2. <i>Origanum elongatum</i> Emb. Et Maire.....	11
5.1.3. <i>Teucrium polium</i> L.	11
5.1.4. <i>Satureja hochreutineri</i> Briq	12
5.1.5. <i>Thymus satureioides</i> Coss.	12
5.1.6. <i>Thymus zygis</i> L.	12
5.1.7. <i>Thymus broussonetii</i> Boiss.....	12
5.2. Usage médicinal	13
5.2.1. <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke.....	13
5.2.2. <i>Origanum elongatum</i> Emb. Et Maire.....	13

5.2.3. <i>Teucrium polium</i> L.	13
5.2.4. <i>Satureja hochreutineri</i> Briq.	13
5.2.5. Quelques espèces de thym.....	14
CHAPITRE II : CONSERVATEURS NATURELS	15
Introduction	16
1. Conservateurs	16
1.1. Définition	16
1.2. Réglementation.....	17
1.3. Conservateurs de synthèse autorisés	17
1.3.1. Mécanisme d'action	18
1.4. Conservateurs naturels	18
1.4.1. Huiles essentielles	19
1.4.2. Extraits bruts	19
1.4.3. Mode d'action	20
2. Contaminations.....	20
3. Microorganismes	21
3.1. Bactéries	21
3.2. Champignons.....	22
3.2.1. Levures	22
3.2.2. Moisissures.....	22
3.3. Croissance microbienne	22
4. Analyse microbiologique du produit.....	23
5. Challenge test	24
6. Paramètres influençant la conservation des cosmétiques.....	24
CHAPITRE III : STRESS OXYDANT	26
Introduction	27
1. Stress oxydant	27
2. Radicaux libres	27
3. Espèces réactives de l'oxygène	28
4. Conséquences moléculaires du stress oxydatif	28
5. Maladies liées au stress oxydatif.....	28
6. Antioxydants	28
6.1. Définition	28
6.2. Mécanisme d'action	30
7. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante	30
7.1. Méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	30
7.2. Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrozyl).....	31

7.3. Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)	32
7.4. Méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	33
7.5. Méthode de blanchissement du β -carotène	33
7.6. Piégeage du radical hydroxyle (HRSA)	34
CHAPITRE IV : INFLAMMATION ET NOCICEPTION	35
Introduction	36
1. Processus inflammatoire	36
1.1. Définition	36
2. Types d'inflammation	36
2.1. Inflammation aiguë	37
2.1.1. Phases de l'inflammation	37
2.2. Inflammation chronique	38
3. Cellules de l'inflammation	39
4. Médiateurs de l'inflammation	40
5. Pathologies inflammatoires	41
6. Anti-inflammatoires	42
6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens	42
6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens	43
6.3. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires	44
6.4. Effets indésirables des anti-inflammatoires	45
7. Plantes à activité anti-inflammatoire	45
8. Douleur.....	46
8.1. Types de douleur	46
8.1.1. Douleur aiguë	46
8.1.2. Douleur chronique.....	46
8.2. Traitement pharmacologique de la douleur.....	47
8.3. Mécanisme d'action des analgésiques.....	47
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	49
1. Enquête ethnopharmacologique	50
1.1. Zones d'étude	50
1.2. Fiche questionnaire	50
2. Matériel végétal.....	51
2.1. Sélection des plantes	51
2.1.1. <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke.....	51
2.1.2. <i>Teucrium Polium</i> L.....	51
2.1.3. <i>Satureja hochreutineri</i> Briq	51
2.1.4. <i>Origanum elongatum</i> Emb. Et Maire.....	51

2.1.5. <i>Thymus broussonetii</i> Boiss.....	51
2.1.6. <i>Thymus satureioidess</i> Coss.....	52
2.1.7. <i>Thymus zygis</i> L.....	52
2.2. Étude microscopique	52
3. Études phytochimiques	52
3.1. Extractions.....	52
3.1.1. Extraction par Ultrasons ou Sonication.....	52
3.1.2. Extraction des Huiles essentielles	53
3.2. Caractérisation des molécules actives	53
3.2.1. Révélation des flavonoïdes.....	54
3.2.2. Leucoanthocyanes	54
3.2.3. Révélation des tanins.....	54
3.2.4. Révélation des saponosides	55
3.2.5. Révélation des coumarines	56
3.2.6. Révélation des quinones libres	56
3.2.7. Révélation des anthraquinones libres	56
3.2.8. Révélation des anthracéniques combinés	56
3.2.9. Révélation des glycosides cardiaques	57
3.2.10. Révélation des oses et holosides	57
3.2.11. Révélation des mucilages	57
3.3. Dosage des composés phénoliques	57
3.3.1. Dosage des polyphénols totaux	57
3.3.2. Dosages des flavonoides	57
3.3.3. Dosages des tanins totaux	58
3.3.4. Dosage des catéchines	58
3.3.5. Dosage des O-diphénols.....	58
3.3.6. Dosage des saponines.....	58
3.4. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	59
3.5. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC/MS).....	60
4. Formulation de la crème.....	60
5. Analyses microbiologiques	61
5.1. Souches, préparation des cultures	61
5.1.1. Souches de référence	61
5.1.2. Préparation de l'inoculum	61
5.2. Méthode de diffusion sur disque	62
5.3. Méthode de puits	62
5.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	62

5.5. Détermination de la Concentration Minimale Microbicide (CMM).....	63
6. Test de Stabilité.....	63
6.1. Contrôle physico-chimique et organoleptique	63
6.2. Contrôle microbiologique	63
7. Challenge test	64
8. Etude de l'activité antioxydante.....	65
8.1. Activité antioxydante de l'extrait de <i>S. vulgaris</i>	65
8.1.1. Méthode de Piégeage des radicaux ABTS ⁺⁺	65
8.1.2. Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrozyl).....	66
8.1.3. Test de pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	67
8.1.4. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles (HRSA).....	68
8.1.5. Inhibition des dommages à l'ADN.....	68
8.2. Activité antioxydante des HE.....	69
8.2.1. Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrozyl).....	69
8.2.2. Test de pouvoir réducteur de fer (FRAP).....	69
8.2.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	70
9. Activité anti-inflammatoire	70
9.1. Les animaux	70
9.2. Méthode de l'œdème induite par la carragénine	70
9.3. Granulôme au pellet de coton.....	71
10. Activité analgésique	71
10.1. Méthode périphérique de l'acide acétique	72
10.2. Test plantaire ou méthode de Hargreaves	72
11. Étude Toxicologique	73
11.1. Toxicité aiguë et DL50.....	73
11.2. Toxicité cutanée subaiguë : Étude sur une durée de 28 jours	73
11.3. Poids Relatif des Organes (ROW)	74
11.4. Analyse des paramètres biochimiques	74
11.5. Méthode d'essai sur œil de poulet isolé (OPI).....	74
11.6. Innocuité cutanée (Patch test).....	75
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	76
CHAPITRE I: ÉTUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DE CERTAINES PLANTES MÉDICINALES RÉPUTES ANTISEPTIQUES DANS LA REGION DE SEFROU.....	77
Introduction	78
1. Enquête ethnopharmacologique	78
1.1. Aspects ethnopharmacologiques	86
1.1.1. Parties utilisées.....	86

1.1.2. Usage des plantes médicinales selon le profil des enquêtés.....	87
1.1.3. Mode de préparation et d'administration	88
1.1.4. Fréquence d'utilisation des plantes	88
1.1.5. Domaines d'indications thérapeutiques	89
1.1.6. Choix des plantes retenues	89
CHAPITRE II: ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE ET DEVELOPPEMENT DE CONSERVATEURS NATURELS COMME INGREDIENTS COSMETIQUES	91
Introduction	92
1. Étude microscopique	92
2. Rendement des extractions.....	93
3. Analyses phytochimiques.....	94
3.1. Caractérisation des molécules actives	94
3.2. Dosage des composés phénoliques	95
3.3. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)	96
3.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC/MS).....	97
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des plantes étudiées	99
4.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait <i>S. vulgaris</i>	99
4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE	101
4.2.1. Méthodes de diffusion	101
4.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Microbicide (CMM)	102
5. Formulation cosmétique et étude de stabilité.....	105
5.1. Formulation cosmétique	105
5.2. Test de Stabilité.....	105
5.2.1. Stabilité physico-chimique et organoleptique	105
5.2.2. Stabilité microbiologique	106
6. Analyse des challenges test	107
6.1. Effet conservateur de l'extrait de <i>S. vulgaris</i> incorporé dans la crème formulée	107
6.2. Pouvoir conservateur des HE incorporées dans la crème formulée	111
6.2.1. Huile essentielle d' <i>Origanum elongatum</i>	112
6.2.2. Huile essentielle de <i>Thymus broussonetii</i>	115
Conclusion.....	118
CHAPITRE III : ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'EXTRAIT DE <i>SILENE VULGARIS</i> ET DES HUILES ESSENTIELLES	120
Introduction	121
1. Étude de l'activité antioxydante de l'extrait de <i>S. vulgaris</i>	121
1.1. Activité piègeur du radical cation ABTS ^{•+}	121
1.2. Piégeage du radical libre DPPH	122

1.3. Pouvoir réducteur du fer FRAP	122
1.4. Piégeage du radical hydroxyle (HRSA)	123
2. Inhibition des dommages à l'ADN.....	123
3. Activité antioxydante des huiles essentielles	124
3.1. Piégeage du radical libre DPPH	125
3.2. Pouvoir réducteur du fer FRAP	126
3.3. Méthode de décoloration du β -carotène	126
Conclusion.....	127
CHAPITRE IV : ACTIVITES ANTI-INFLAMMATOIRE, ANALGESIQUE ET ETUDES TOXICOLOGIQUES DE LA CREME DE <i>SILENE VULGARIS</i>	128
Introduction	129
1. Activité anti-inflammatoire	129
1.1. Méthode de l'œdème induite par la carragénine	129
1.2. Méthode de Granulôme au pellet de coton.....	130
2. Activité analgésique	132
2.1. Méthode périphérique de l'acide acétique.....	132
2.2. Plantar test	133
3. Étude Toxicologique	134
3.1. Étude de la toxicité aiguë et DL50	135
3.1.1. Evolution du poids	135
3.1.2. Poids Relatifs des Organes	136
3.1.3. Analyse des paramètres biochimiques	137
3.2. Étude de la toxicité subaiguë.....	139
3.2.1. Toxicité cutanée à doses répétées : 28 jours (OCDE 410).....	139
3.2.1.1. Evolution du poids	139
3.2.1.2. Poids Relatifs des Organes.....	140
3.2.1.3. Analyse des paramètres biochimiques	140
3.3. Méthode OPI	142
4. Innocuité cutanée (Patch test)	143
Conclusion.....	145
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	146
BIBLIOGRAPHIE	150
ANNEXES	184

INTRODUCTION GENERALE

Les agents conservateurs, définis par le règlement Européen CE N° 1223/2009 et la circulaire Marocaine N° 48 DMP/20, sont utilisés dans les produits cosmétiques essentiellement pour inhiber le développement de microorganismes, pour prolonger la date d'expiration du produit et également, pour protéger le consommateur contre les infections qui peuvent être causé par cette classe de produits. La notion de conservation n'est pas récente et pour ne citer que quelques exemples, l'homme utilise depuis des siècles le salage et le fumage pour empêcher la viande et le poisson de se dégrader; et le sulfate de cuivre était déjà utilisé en Egypte antique afin de conserver les fards à paupières (Mussard, 2006).

La liste des conservateurs autorisés présentée dans le document réglementaire de la directive cosmétique européenne 76/768/CEE, comporte parmi les 57 groupes de conservateurs citées, les méthyl, éthyl, propyl et butyl parabènes et leurs sels. L'utilisation de ces quatre molécules dotées d'une activité et d'une efficacité bien connues est aujourd'hui fortement controversée. En effet, les conservateurs chimiques n'ont pas tous le même spectre d'action ce qui justifie la liste des 57 conservateurs antimicrobiens recensés en Annexe V de la directive cosmétique européenne (Pittet et Boyce, 2001).

Quant au Maroc, la circulaire N° 48 DMP/20 du Ministère de la Santé interdit la mise sur le marché des produits cosmétiques contenant des agents conservateurs énumérés dans l'annexe V, au-delà des limites et en dehors des conditions indiquées dans ce dernier. En effet, la liste des conservateurs énumérés dans cette Annexe fait également état des concentrations maximales autorisées et des restrictions d'usage dans les produits cosmétiques et les produits d'hygiène (www.sante.gov.ma, consulté 2 Mars, 2016).

La sécurité des conservateurs chimiques est un sujet d'actualité dans le domaine de la recherche et attire l'attention d'une grande partie de consommateurs. Les conservateurs chimiques tels que les parabènes, remplissent leur rôle avec succès depuis de nombreuses années. Cependant, une polémique mettant en cause leurs innocuités ainsi qu'une récente révision de la réglementation cosmétique obligent les scientifiques et industriels à chercher des alternatives. Des travaux antérieurs ont relevé l'importante quantité des conservateurs chimiques présents dans les produits cosmétiques, en l'occurrence les produits d'hygiène intimes qui dépasse 70% (Travassos et al., 2011; Goossens, 2011). D'ailleurs, cette quantité très élevée provoque un certain nombre d'effets indésirables graves dont la perturbation endocrinienne, cancer etc... (Goossens, 2011; Hamilton and De Gannes, 2011).

Ces dernières années, nous avons assisté au développement de formulations cosmétiques sans agents conservateurs, dans d'autres termes des formulations auto-conservées. Dans ce type de formules, les conservateurs chimiques sont remplacés par des ingrédients cosmétiques aux propriétés antimicrobiennes qui ne sont pas classifiés comme conservateurs selon l'Annexe V de la Directive 76/768/EEC. Parmi ces antimicrobiens naturels, nous pouvons citer les huiles essentielles et les extraits dérivés de plantes. Ces extraits sont utilisés non seulement pour leurs effets bénéfiques mais aussi pour leur pouvoir conservateur. Dans cette optique et après une sélection rigoureuse de ces ingrédients, il est possible de substituer l'utilisation des agents chimiques classiques par ces derniers dans la conservation des produits cosmétiques avec des propriétés dermocosmétiques améliorées.

Les huiles essentielles et les extraits végétaux offrent un large éventail de mécanismes de défense contre toute contamination microbiologique. En effet, les végétaux ont la capacité de s'adapter à leur environnement en développant des systèmes de défense pour résister à une quantité d'attaques microbiennes. D'ailleurs, Il y a un certain nombre de dérivés de plantes, d'huiles essentielles et d'extraits, qui possèdent une excellente activité antimicrobienne et ont été utilisés seuls ou en combinaison avec des agents conservateurs chimiques pour la conservation des produits cosmétiques (Ostrosky et al., 2011; Kunicka-Styczyńska et al., 2011; Nostro et al., 2004a, 2002b; Maccioni et al., 2002; Seo et al., 2002).

De plus, les produits cosmétiques tout comme les médicaments, peuvent entraîner des effets indésirables et des réactions cutanées. Afin de répondre aux problèmes de santé inhérents à l'utilisation de ces produits, nous avons mis l'accent sur l'optimisation et développement de conservateurs naturels dotés d'éventuelles propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante. Dans cette optique, nous avons évalué les activités antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique d'une formulation élaborée à partir de l'extrait hydroéthanolique de *Silene vulgaris* (Moench) Garcke.

L'objectif principal de notre travail est d'apporter des alternatives naturelles à l'utilisation des conservateurs chimiques dans les produits cosmétiques par le développement de conservateurs naturels dénués de tout effet indésirable.

Pour atteindre cet objectif, plusieurs objectifs spécifiques devaient être réalisés :

- ✓ Mener une enquête ethnopharmacologique dans l'objectif de sélectionner les plantes médicinales candidates réputées antiseptiques dans la région de Sefrou;

- ✓ Optimiser des extraits et des HE à pouvoir conservateur pour la cosmétique à base de *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, *Thymus broussonetii* Boiss. et *Origanum elongatum* Emb. Et Maire par le biais du Challenge Test;
- ✓ Développer des conservateurs naturels pilotes, jouant un rôle dans la conservation des cosmétiques et dénués de toxicité;
- ✓ Évaluer d'autres activités biologiques à visée thérapeutique.

Afin de bien situer le contexte dans lequel ce travail de recherche s'inscrit, nous présentons, dans cette première partie de cette thèse une synthèse bibliographique. Dans un premier chapitre, nous avons réalisé une enquête ethnopharmacologique dans la région de Sefrou (Moyen Atlas), dans le but de relever les plantes réputées antiseptiques dans l'usage traditionnelles de cette région. Quant au deuxième chapitre, il traite des généralités sur les agents antimicrobiens communément utilisés et autorisés en Europe et au Maroc. Ainsi que l'utilisation de substances naturelles aux propriétés antimicrobiennes en usage cosmétique. Finalement, les troisième et quatrième chapitres de cette première partie décrivent des généralités sur le stress oxydant, l'inflammation et la douleur.

La deuxième partie de ce manuscrit développe les différentes approches méthodologiques utilisées *in vivo* et également *in vitro*. La dernière partie décrit les résultats obtenus et leur discussion dans le cadre de l'optimisation et développement de conservateurs naturels dotés de propriétés antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

UTILISATION TRADITIONNELLE DE CERTAINES PLANTES MÉDICINALES ET COSMÉTIQUES DANS LA RÉGION DE SEFROU

Introduction

Le Maroc est un pays riche en plantes médicinales et aromatiques susceptibles d'être utilisées dans différents domaines agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et parfumerie pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes. De part sa position biogéographique, le Maroc offre une très grande diversité écologique et floristique. Il est l'un des pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel important à base des plantes médicinales (Scherrer et al., 2005). La richesse de la flore marocaine et sa diversité, soit 4500 taxons avec 920 genres et 130 familles (Fennane, 2004), peut présenter une réserve importante d'espèces végétales intéressantes qui peuvent être employés dans plusieurs domaines.

En effet, une grande importance est accordée aux plantes aromatiques dans la pratique culinaire marocaine, telles que le thym et l'origan qui sont largement utilisés dans l'aromatisation et la conservation des aliments (Bellakhdar, 1997).

Devant ce savoir ancestral, plusieurs volontés concourent à le préserver et à le mettre en valeur. Par ailleurs, des enquêtes ethnopharmacologiques contribuent, de leurs parts, à rassembler et constituer une source d'informations très précieuses, prête à être exploitée sur le plan scientifique.

L'ethnopharmacologie est une discipline qui s'intéresse aux remèdes et aux médecines traditionnelles constituant les pharmacopées traditionnelles. Elle a comme objectif de recenser les plantes médicinales et produits naturels utilisés dans les pharmacopées traditionnelles, notamment là où la tradition est orale, car la transmission de la connaissance est entravée à la fois par la perte d'intérêt du métier de guérisseur, par la perte des connaissances botaniques, culturelles et historiques, par changement du mode de vie et détachement de la nature et par la non reconnaissance du métier (Fleurentin, 2012).

Les remèdes naturels à base des plantes médicinales ont été pendant longtemps le principal, voire l'unique recours de la tradition orale pour soigner les pathologies [3]. La médecine moderne a fait son succès grâce à la médecine traditionnelle dont l'efficacité est tirée des plantes médicinales. En effet, le développement de la médecine moderne s'est accompagné par la détermination de substances actives, par l'isolement de la morphine à partir du *Papaver somniferum*, suivi par l'isolement de la cocaïne, la codéine, la digitoxine, l'artémisinine et la quinine dont certains d'entre eux sont utilisés jusqu'à présent.

1. Diversité climatique et géographique du Maroc

La région méditerranéenne au Maroc s'individualise par de nombreuses originalités physiques et écologiques qui confèrent à sa biodiversité une valeur patrimoniale mondiale (Daki, 2004). La situation géographique du pays, situé entre deux mers et un désert et traversé par trois chaînes montagneuses, lui confèrent une grande variété bioclimatique et une importante diversité biologique. Cette diversité de bioclimats favorise une flore riche et variée à endémisme très marqué. En effet, on distingue six étages bioclimatiques que sont les étages: Saharien, Aride, Semi-aride, de Haute montagne, Subhumide et Humide.

L'étage saharien couvre toutes les régions situées au sud d'une ligne allant du Figuig à la vallée du Draa, L'étage aride s'étend sur tout le Maroc oriental, les piémonts sud des chaînes de l'Atlas et, aussi, dans le Haouz. L'étage semi-aride couvre la plus grande partie des plaines atlantiques. Quand aux étages subhumide et l'humide, situés au niveau des zones montagneuses. Le Bioclimat de Hautes montagnes, froid ou très froid, occupe les sommets des hautes montagnes, surtout atlasiques, avec des xérophytes, des thuyas et des Genévriers rouge et thurifère (Benabid, 2000).

2. Originalité de la flore marocaine

La richesse et la diversité de la flore marocaine, constitue un véritable réservoir phytogénétique avec un taux d'endémisme végétal assez élevé à l'échelle de la région méditerranéenne (Bellakhdar, 2006). La flore marocaine est estimée à 4500 taxons avec 920 genres et 130 familles, les taxons endémiques stricts sont estimés à 951 (Fennane, 2004). L'originalité de la flore marocaine provient de la composition générique de la flore marocaine. La composition de cette flore d'après Emberger (1971), est à dominance méditerranéenne (30% des genres) avec un nombre élevé de genres cosmopolites (30%), de genres nordiques (22%), une teinte africaine (5%) et un endémisme de souche méditerranéenne relativement important (5% des genres) (Zenasni, 2014).

3. Place des plantes dans la thérapeutique

3.1. Phytothérapie

La phytothérapie a été utilisée depuis des siècles pour traiter les affections. Au Maroc, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe musulmane. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique

actuelle. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle (Bousta et al., 2013a, 2011b; El H. El Youbi et al., 2012; El Mansouri et al., 2011). Une plante peut être qualifiée de médicinale lorsqu'elle contient, au niveau de ses organes, un ou plusieurs principes actifs utilisables à des fins thérapeutiques.

3.2. Phytocosmétique

La phytocosmétologie thérapeutique est un art qui recouvre les trois domaines qu'elle évoque: la réparation (thérapie) avec des extraits de plantes (phyto), la modification de la peau et ses annexes qui ne constituent pas une maladie de la peau mais dont le traitement en améliore l'état au niveau de l'esthétique (Goetz et Busser, 2007). Les plantes sont utilisées dans les produits cosmétiques depuis ses longtemps sous différentes formes. Dans certains cas, la cosmétique et la médecine se rencontrent. Il en va ainsi du Khôl, cet ensemble minéral et végétal qui en plus de souligner le regard, servait jadis à prévenir les infections des paupières.

La phytocosmétique restaure des modifications situées soit dans l'épithélium, soit dans le derme, soit au niveau des phanères, et utilise des principes actifs divers. Les plantes et leurs extraits, devant le progrès de la synthèse chimique, ont perdu avec le temps, leur place primordiale. On s'aperçoit aujourd'hui que cette industrie ne peut se passer des extraits des végétaux qui, comme nous le savons en phytothérapie, ont de nombreuses actions biologiques qui peuvent corriger de nombreux phénomènes cutanés.

3.2.1. Extraits végétaux phytocosmétiques

La cosmétologie thérapeutique est devenue une science s'appuyant sur les connaissances acquises en biologie et en chimie. Plusieurs plantes sont utilisées dans les produits cosmétiques et on peut les regrouper en fonction de leurs propriétés hydratantes, astringentes, cicatrisantes, antiseptiques et antioxydantes. Elles sont nombreuses à être de plus en plus utilisées pour leurs actifs naturels (Le Bolzer, 2004).

Les substances actives se réclamant de la phytocosmétique sont le plus souvent :

- Huiles essentielles;
- Extraits végétaux secs, huileux, alcoolique mous ou fluides;
- Huiles dur support, pures ou émulsionnées;
- Extraits intégraux de plantes fraîches.

3.2.2. Excipients utilisés en phytocosmétologie

L'excipient a pour rôle de véhiculer les principes actifs (PA) vers la zone à traiter (plus ou moins profonde). Son choix se fait en fonction :

- des PA et de leur nature physico-chimique,
- du niveau de difficulté de réalisation de la préparation,
- de la durée de traitement,
- de la tolérance cutanée.

L'excipient ne doit en rien altérer ni la structure de la peau avec ses différents composants, ni ses constantes physico-chimiques, ni ses rôles. Il doit être d'une parfaite innocuité et même jouer le rôle d'adjuvant thérapeutique pour protéger et mieux faire pénétrer les PA, et potentialiser leur effet thérapeutique (hydratant, anti-inflammatoire).

4. Présentation de la zone d'étude

4.1. Situation géographique

Le Moyen Atlas est un massif montagneux allongé sur quelques 350 km, du sud-ouest au nord-est du Maroc, situé entre le Rif et le Haut Atlas, et couvrant une superficie totale de 2,3 millions d'hectares, soit 18% du domaine altimontain de ce pays. Il intéresse principalement les provinces de Khénifra, Ifrane, Boulmane, Sefrou, El Hajeb, ainsi qu'une partie des provinces de Taza et de Beni Mellal que l'on désigne sous le nom de porte du Moyen Atlas. Cette chaîne appartient au massif de l'Atlas, et plus précisément, à l'un des trois éléments de l'Atlas marocain, les deux autres étant le Haut Atlas et l'Anti-Atlas.

4.2. Province de Sefrou

4.2.1. Données générales

La Région de Fès-Meknès regroupe sur le plan administratif deux préfectures : la Préfecture de Fès et la Préfecture de Meknès et les sept provinces de Boulemane, El Hajeb, Ifrane, Moulay Yaâcoub, Sefrou, Taounate et Taza. La province de Sefrou est une division du Maroc de la région de Fès-Meknès (Figure 1). Elle s'étend sur un territoire de 4008 Km² et chevauche entre la plaine de Saïs et le Moyen Atlas. Elle est limitée au Nord par la préfecture de Fès et la province de Moulay Yacoub, à l'Ouest par la province d'El Hajeb, au Sud par les

provinces de Boulemane et d'Ifrane, à l'Est par la province de Taza et au Nord-Est par la province de Taounate.



Figure 1. Situation géographique de la zone d'étude

4.2.2. Biodiversité de la région de Sefrou

La province de Sefrou dispose d'une diversité des potentialités naturelles et d'un riche patrimoine historique. La Province de Sefrou contient des sites naturels de grande attraction (lacs, sources, forêts, gorges, grottes, vues panoramiques), susceptibles de contribuer au développement du tourisme rural. Parmi ses atouts il y a lieu de citer l'existence de quatre sites d'intérêt biologique et écologique (forêt de Takaltount, Dayet Iffer, forêt de Taffert et le massif de Bouiablane), d'un circuit de plans d'eau naturels (Dayet Afourgagh, Dayet d'Iffer...) et artificiels (Barrage Allal El Fassi...), des sources (Aïn Sebou, Aïn Timdrine, Aïn Soltane, Aïn Regrag, Aïn Chiffa, Aïn Jerrah, Aïn Reggada, Aïn Laz,...) et des sites naturels importants (grottes, falaises, gorges, forêts,...) (Zerhouni, 2005).

La situation géographique de la province de Sefrou privilégiée par sa proximité de la ville de Fès sur le versant Nord Ouest du Moyen Atlas et sa richesse en sites multiples, la prédispose à devenir une importante station climatique. Le couvert forestier couvre plus de 36% de la superficie totale de la province. Il est dominé par le chêne vert qui occupe plus de 60% de la superficie de la forêt.

5. Etude ethnopharmacologique des plantes sélectionnées

Le nombre important des études ethnobotaniques réalisés par les scientifiques et les chercheurs marocains, montre l'importance accordée à l'utilisation des plantes médicinales dans le système de santé traditionnelle au Maroc.

5.1. Monographie des espèces sélectionnées

5.1.1. *Silene vulgaris* (Moench) Garcke

Silene vulgaris (Moench) Garcke, Silène enflé, Silène commune, Bladder campion ou Claquet, est une plante herbacée vivace de la famille des Caryophyllacées. Elle est connue sous son nom vernaculaire Amazigh «tghighacht», aux feuilles opposées, ovales, celles inférieures sont pétiolées, et les supérieures sont sessiles. La floraison commence de la fin du printemps à l'été, en fausse ombelle, calice renflé, glabre, comportant 20 nervures parallèles, et les pétales sont divisés à 1/3 environ. Les fleurs parfumées, nectarifères s'ouvrant le soir secrètent un abondant nectar très apprécié par les papillons de nuit qui assurent leur fécondation. Elle contient de la saponine, les jeunes feuilles sont comestibles, consommées crues en salades ou cuites, elles ont une saveur rappelant celles des petits pois.

5.1.2. *Origanum elongatum* Emb. Et Maire.

Au Maroc, le genre *Origanum* comporte cinq espèces dont trois endémiques (Benabid, 2000). Nous nous sommes intéressés dans ce travail à *Origanum elongatum*. Cette espèce a des feuilles glabrescentes, plus ou moins glauques, une panicule simple d'épis denses, de 40 mm de long environ et de 3 mm de large. *Origanum elongatum* est une espèce endémique qui se rencontre à des altitudes supérieures à 1000m au niveau du méso-méditerranéen et du supra-méditerranéen, sur substrats siliceux de préférence, absent sur la dorsale calcaire du Rif, rare à très rare sur les calcaires du Moyen Atlas oriental. Elle est connue sous le nom vernaculaire zaâtar rifi.

5.1.3. *Teucrium polium* L.

Le genre *Teucrium* comprend plus de 300 espèces généralement aromatiques poussant à l'état spontané dans diverses régions du globe. Il est largement présent dans le bassin méditerranéen et plus particulièrement en Algérie et en Corse où sont recensées respectivement 21 et sept espèces (Jeanmonod et al., 2007; Quezel et al., 1963). Elle est connue sous le nom de Germandrée tomenteuse en français ou Lkhayata et Djâida en arabe. C'est une petite plante

blanchâtre, cotonneuse, assez commune dans l'espace méditerranéensaharien, très polymorphe, elle croit dans les lieux rocaillieux et secs. Cette espèce est représentée par de nombreuses sous-espèces dont la détermination reste assez délicate (Quezel et al., 1963).

5.1.4. *Satureja hochreutineri* Briq

Le genre *Satureja* est principalement retrouvé dans la région méditerranéenne. La Sarriette, est un genre de plantes vivaces aromatiques de la famille des Lamiacées, que l'on trouve notamment sur les bords des chemins méditerranéens. Elle est aussi connue sous les noms de savourée, de sadrée et d'herbe de Saint Julien. La sarriette est une plante annuelle à racine un peu chevelue. Les tiges, de 20 à 40 cm, sont vert rougeâtre, rameuses, diffuses. Les feuilles, opposées, courtement pétiolées, petites, étroites, sont de couleur vert terne. Les fleurs, ponctuées de rouge, quelquefois blanches, petites, groupées par deux ou trois à la base des feuilles, apparaissent de Juillet à Octobre. Le fruit est arrondi, entouré d'un calice.

5.1.5. *Thymus satureioides* Coss.

Thymus satureioides Coss. est une espèce endémique du Maroc (Benabid, 2000; Bellakhdar, 1997). Elle est connue sous les noms vernaculaires suivants: en Tamazight « Azukni », « izukni », « tazuknit »; en arabe « Zaitra » et en Français « Thym-sarriette du Maroc ». Cette plante est un arbrisseau érigé, pouvant atteindre 60 cm, très rameux, aux feuilles spatulées, inflorescences en glomérules lâches, à la corolle rose ou rose très pâle. Il peuple les Haut-Atlas et Anti-Atlas (EL Rhaffari, 2008; Benabid, 2000). Il est rencontré dans les clairières des forêts, broussailles, matorrals des basses et moyennes montagnes jusqu'à vers 2200m (Benabid, 2000).

5.1.6. *Thymus zygis* L.

Thymus zygis L. est une espèce endémique du Maroc (Bellakhdar, 1997). Il est caractérisé par une inflorescence courte ou allongée à verticilles très interrompus et distants, les bractées et les bractéoles sont réduites, la corolle peut dépasser ou non le calice. La période de floraison s'étend du printemps à l'été (Fennane et al., 2007). Il est rencontré dans les clairières des forêts et dans les pâturages pierreux des basses et moyennes montagnes, principalement dans le Haut Atlas, le Moyen Atlas, le Maroc Atlantique moyen, le Maroc Atlantique Nord et le Littoral de la méditerranée; dans les bioclimats semi-aride froid, subhumide et humide (Fennane et al., 2007).

5.1.7. *Thymus broussonetii* Boiss.

Thymus broussonetii Boiss. est une espèce endémique du Haut Atlas et du Maroc Atlantique moyen (Fennane et Ibn Tattou, 1998). Le régime d'exploitation sévère auquel est exposée cette espèce peut conduire à sa raréfaction et/ou disparition (Mehdioui et al., 2007). Le thym de Broussonet (*Thymus broussonetii*) est connu sous le nom vernaculaire Azoukni (Zaâtar).

5.2. Usage médicinal

5.2.1. *Silene vulgaris* (Moench) Garcke

La décoction des feuilles et des racines de *Silene vulgaris* (= *Silene inflata*), est utilisée pour expulser les gaz des intestins et en usage externe pour soigner les plaies, la gale, le prurit et diverses affections de la peau (Bellakhdar et al., 1997). A faible dose, les racines sont utilisées comme vomitif et antidote général dans les empoisonnements (Bammi et Douira, 2002; Bellakhdar et al., 1991). Dans la littérature, il a été rapporté que certaines espèces de *Silene* ont été utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les inflammations, la bronchite, le rhume et les infections ou comme diurétique, antipyrétique, analgésique et émétique (Sobiecki et al., 2008; Golovko et al., 2007; Hirst et al., 2005; Ali et al., 1999; Ballero et al., 1993).

5.2.2. *Origanum elongatum* Emb. Et Maire.

Origanum elongatum, *Origanum compactum* et *Origanum grosii*, sont trois espèces endémiques du Maroc (Atbib, 1985). Elles sont largement utilisées par les populations locales comme antiseptique intestinal, buccal et pulmonaire, spasmolytique et comme conservateur alimentaire. Au Maroc, les origans sont généralement jugés plus actifs que les thyms et, pour cette raison, leur sont préférés (Fleutentin et al., 1990). De nombreuses études ont montré l'intérêt des origans en raison de leur effet antimicrobien (Sözmen et al., 2012; Gómez-Sánchez et al., 2011), cytotoxique (El Babili et al., 2011), antioxydant (El Babili et al., 2011; Nakiboglu et al., 2007; Ozkan et al., 2007; Gortzi et al., 2007; Tepe et al., 2004; Gouladis et al., 2003), hypoglycémiant (Lemhadri et al., 2004) et insecticide (Traboulsi et al., 2002).

5.2.3. *Teucrium polium* L.

Teucrium polium, plante connue pour ses vertus thérapeutiques, entres autres, anti-inflammatoire, astringente, cicatrisante, fébrifuge, hypoglycémiant. La décoction des feuilles, associées au marrube blanc (*Marrubium vulgare*) et aux feuilles d'olivier, en gargarisme, est employée contre la candidose buccale (Altundaga et Ozturk, 2011).

5.2.4. *Satureja hochreutineri* Briq.

Le genre *satureja* est largement utilisé au Maroc comme antiseptique, digestives, stimulantes, vermifuges et antiputrides. La tige feuillée est utilisée en infusion dans du thé contre la fièvre, la grippe, les douleurs gastriques et comme rafraîchissant (Lahsissene et al., 2009).

5.2.5. Quelques espèces de thym

Le thym est une épice importante dans les industries alimentaires et de l'arôme. Le thym de Broussonet (*Thymus broussonetii* Boiss.) est utilisée contre les maladies de l'appareil digestif, de l'appareil respiratoire et de la peau, ce qui explique la pression particulière exercée sur cette plante (Mehdioui et al., 2007). Les feuilles et les fleurs de *Thymus zygis* sont employées en infusion contre les gastralgies, et en inhalation, elles sont conseillées en cas des rhumes. *Thymus satureioides* Coss. s'emploie en décoction contre la coqueluche, la bronchite et le rhumatisme (Bellakhdar et al., 1991). Il est aussi utilisé comme condiment et pour la conservation du smen. Le miel butiné sur ce thym (spécialité de la région de Marrakech) est très recherché par les Marocains car il est réputé de posséder de puissantes vertus thérapeutiques (Bellakhdar, 1997).

Le thym possède de nombreuses activités biologiques tels que antimicrobiennes, antioxydantes, antiplaquettaires, analgésiques, anti-inflammatoires et antispasmodiques (El Bouzidi et al., 2013; Jamali et al., 2012; Dandlen et al., 2010; Grosso et al., 2010; Hazzit et al., 2009; Elhabazi et al., 2008; Dob et al., 2006; Tepe et al., 2005; Ismaili et al., 2004; Faleiro et al., 2003; Okazaki et al., 2002; Miura et al., 2002; Ismaili et al., 2002).

CHAPITRE II : CONSERVATEURS NATURELS

Introduction

Il est indispensable de protéger tout produit des contaminations microbiennes afin d'assurer une durée de vie suffisante mais également une sécurité d'utilisation au consommateur. Pour cela des conservateurs antimicrobiens sont introduits au sein des formules et permettent de protéger les produits des contaminations provenant notamment du contact avec le consommateur lors du prélèvement. L'objectif pour les industriels est donc de proposer un produit dont le système de conservation protège de toute prolifération microbienne avant et pendant son utilisation. L'interdiction de l'utilisation de certains parabènes (9 avril 2014) par la réglementation cosmétique, oblige les industriels du secteur cosmétique à trouver des substituts à ces molécules.

Ce chapitre bibliographique est consacré à l'étude de la conservation des formulations cosmétiques. Il y sera abordé les notions fondamentales concernant les micro-organismes, les agents antimicrobiens, les facteurs influençant l'activité antimicrobienne d'un conservateur et les contraintes réglementaires de la conservation cosmétique puis d'indiquer les alternatives naturelles aux conservateurs classiques permettant de protéger plus ou moins efficacement ces produits.

1. Conservateurs

1.1. Définition

Les agents conservateurs sont définis par la réglementation cosmétique ((CE) n°1223/2009) entant que «substances qui sont principalement destinées à empêcher le développement de micro-organismes dans le produit cosmétique». Cette définition n'inclut donc pas les actions contre la dégradation chimique apportées par les antioxydants par exemple.

Les conservateurs permettent la protection des produits cosmétiques des contaminations pouvant être apportées lors de leur production par les matières premières, les articles de conditionnement, l'atmosphère des locaux ou le personnel. D'ailleurs, les contaminations génèrent la dégradation anticipée du produit cosmétique, le rendant inapte à l'utilisation, voire dangereux pour le consommateur.

1.2. Réglementation

En Europe, les conservateurs antimicrobiens pouvant être utilisés dans les produits cosmétiques sont inscrits sur une liste appelée « positive » de l'annexe V-Directive

cosmétique européenne. Cette réglementation fixe également leurs concentrations, leurs limites et conditions d'utilisation. Cette liste est en constante évolution en fonction des connaissances toxicologiques relatives aux divers ingrédients cosmétiques et aux utilisations qui en sont faites. Les antioxydants n'en font pas partie.

1.3. Conservateurs de synthèse autorisés

Les conservateurs autorisés sont tous d'origine synthétique (Figure 2). Ils présentent des modes d'action et des propriétés physico-chimiques très variables. Les parabènes sont des conservateurs à large spectre antimicrobien. Ils sont utilisés depuis 1920 pour de nombreux produits que nous consommons quotidiennement: aliments, produits cosmétiques, médicaments (Kerdudo, 2014; Darbre, 2008).

Les parabènes existent également à l'état naturel dans de nombreux aliments comme les fruits rouges, l'oignon ou encore la carotte (Kang et al., 2008; Gorinstein et al., 2008; Odriozola-Serrano et al., 2008; Sircar et al., 2007; Ng et al., 2000). Les concentrations et types de parabènes utilisés diffèrent selon les produits. En cosmétique, ils sont autorisés aux concentrations de 0.4 % pour les esters et 0.5 % pour les mélanges d'esters mais sont employés à très faibles concentrations. Les plus utilisés, sous leur forme sodée ou non sodée, sont les Méthyl-, Ethyl-, Propyl- et Butyl parabène.

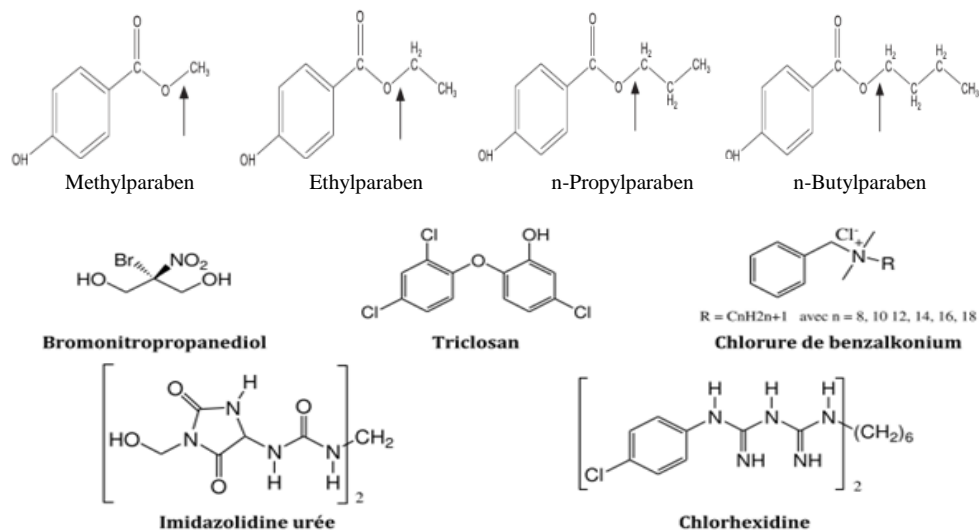


Figure 2. Exemple de quelques conservateurs utilisés en cosmétique (Kerdudo, 2014)

Le choix du conservateur (ou mélange de conservateurs) utilisés pour protéger un produit cosmétique se fait selon les critères suivants (Fourniat et al., 2006; Shimamoto et al., 1979) :

- Spectre d'activité
- Compatibilité avec le procédé de fabrication
- Solubilité dans l'eau
- pH de la formulation
- Coefficient de partage huile/eau
- Compatibilité avec les autres ingrédients
- Compatibilité avec les matériaux de conditionnement

1.3.1. Mécanisme d'action

Le mode d'action du conservateur est souvent complexe et peut être localisé au niveau des parois bactériennes, des membranes, au niveau ribosomal sur la synthèse des protéines, ou au niveau des acides nucléiques et des enzymes associées (Nicklin et al., 2000). Le microorganisme sera plus ou moins sensible aux agents antimicrobiens en fonction de la nature de la paroi microbienne et de la lipophilie des conservateurs (Kabara, 1996). Par conséquent, chaque agent antimicrobien a un spectre d'activité qui lui est propre. Par exemple, le formaldéhyde et ses dérivés agissent en formant des ponts méthylènes entre les acides aminés constitutifs des protéines membranaires, ce qui déstabilise de manière irréversible les membranes et mène à la mort cellulaire (Basset, 1996). Quant au chlorure de benzalkonium ainsi qu'aux alcools, ils altèrent la membrane des microorganismes en solubilisant les lipides membranaires (Willey, 2008). Les acides organiques quant à eux déséquilibrent le gradient osmotique à travers la membrane cytoplasmique (Dunn et Lutz, 2003). Les parabènes agissent contre un grand nombre de microorganismes au niveau de voies métaboliques clés. En effet, il est supposé que les parabènes inhibent la synthèse de l'ADN et de l'ARN ou de certaines enzymes clés des microorganismes ou encore qu'ils perturbent les processus de transport membranaire au sein de ces cellules vivantes (Uyen et al., 2005). Comme chaque conservateur possède un mécanisme d'action ciblé qui lui est propre, des mélanges de conservateurs sont souvent utilisés afin d'élargir le spectre d'activités. Les mélanges de conservateurs présentent de nombreux avantages comme la possibilité de diminuer la concentration de chaque agent antimicrobien et les éventuels effets secondaires reliés, et augmenter l'efficacité par synergie (Siegert, 2006; Woodruff, 1999).

1.4. Conservateurs naturels

Parmi les extraits naturels possédant un potentiel antimicrobien, on peut distinguer les huiles essentielles et les extraits bruts de plantes.

1.4.1. Huiles essentielles

Les propriétés antimicrobiennes et antifongiques des huiles essentielles ont été le centre d'intérêt d'un grand nombre d'études (Fernandez et al., 2012). Aujourd'hui, l'industrie cosmétique utilise les huiles essentielles pour substituer les conservateurs chimiques. Ces propriétés multiples sont liées à la grande complexité des huiles essentielles, puisqu'elles peuvent être constituées de plusieurs composés (Garnero et al., 1996). Les molécules responsables de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sont principalement des hydrocarbures (terpènes), des alcools, particulièrement des phénols, des esters, des acides, des aldéhydes ou encore des cétones. Plus particulièrement, les phénols: thymol, carvacrol, eugénol font partie des composés ayant montré un excellent potentiel antibactérien ainsi qu'un large spectre d'activité. De tels composés sont par exemple présents dans l'huile essentielle de thym (Fernandez et al., 2012; Murphy Cowan, 1999).

1.4.2. Extraits bruts

Les extraits naturels présentent une grande complexité chimique; leur composition chimique n'est souvent pas bien connue. Un certain nombre d'extraits végétaux ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes et sont aujourd'hui présents sur le marché de la cosmétique, tels que l'extrait de pépins de pamplemousse ou l'extrait de lichen (Karagöz et al., 2009; Bolzinger et al., 2006).

Tableau 1. Exemples d'extraits aux propriétés conservatrices présents sur le marché de la cosmétique (Kerdudo, 2014)

Extraits	Noms commerciaux	Actifs	Activité
Extrait de lichen (Barbe de Jupiter)	Lichen Herbasol	Acides usnique et vulpinique	Antimicrobienne
<i>Citrus grandis</i> (extrait de pépins)	INCI : <i>citrus grandis</i> seed extract	Flavonoïdes polyphénoliques	Antimicrobienne Antifongique
<i>Viola tricolor</i> – Extrait de pensées sauvage	INCI : <i>viola tricolor</i> extract	Flavonoïdes, saponines, acide salicylique, vitamine E	Antimicrobienne
<i>Pimpinella anisum</i> - Extrait d'anis	INCI : <i>pimpinella anisum</i> extract	Acide p-anisique	Antimicrobienne

*INCI: Nomenclature Internationale des Ingrédients Cosmétiques.

1.4.3. Mode d'action

Les huiles essentielles peuvent agir selon deux modes en fonction des microorganismes concernés et du type de molécules qu'elles contiennent. Elles peuvent soit inhiber la multiplication cellulaire microbienne et ainsi avoir un effet microbiostatique; soit entraîner la mort des microorganismes et ainsi avoir un effet microbicide. Le mode d'action précis des huiles essentielles reste inconnu, mais il semblerait que, dans le cas des bactéries, les molécules actives tels que les composés phénoliques attaquent la paroi cellulaire, provoquant une perte du matériel cellulaire par augmentation de la perméabilité. Par conséquent l'intérieur de la cellule serait alors acidifié, entraînant la perte d'ions et la réduction du potentiel membranaire, puis la mort de la cellule suite à la destruction du matériel génétique (Fernandez et al., 2012; Liang et al., 2011; Oyedemi et al., 2009; Oussalah et al., 2006; Souza et al., 2006; Chami, 2005; Sikkema et al., 1995).

Smith-Palmer et al., (2001) ont montré que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'effet des huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif qui se caractérisent par une membrane externe imperméable. L'imperméabilité des bactéries à Gram négatif est due à la richesse de cette membrane en lipo-polysaccharides la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (Cristiani et al., 2007). Le mode d'action des extraits naturels reste très peu décrit, mais leur activité peut être corrélée avec la présence de certains composés phénoliques.

2. Contaminations

Il existe différents types de contaminations: les contaminations primaires qui peuvent survenir lors de la fabrication et les contaminations secondaires qui surviennent après. Les contaminations primaires peuvent être la conséquence des matières premières utilisées, des locaux, du matériel ou encore du personnel chargé de la fabrication. Les contaminations secondaires résultent quant à elles de l'utilisation du produit par le consommateur. Afin d'éviter tout contact entre le consommateur et les microorganismes potentiellement pathogènes, chaque produit mis sur le marché comporte sur son récipient et son emballage la mention d'une date de durabilité minimale. La DLUO (Date Limite d'Utilisation Optimale), ou la PAO (Période après ouverture), indiquent la date jusqu'à laquelle le produit peut être utilisé ou consommé sans dommage pour le consommateur.

3. Microorganismes

Le terme microorganisme fait référence à un organisme de taille microscopique comme les bactéries ou les champignons (moisissures et levures). Les microorganismes sont classés en fonction de leur structure cellulaire et il est possible de distinguer les procaryotes (Bactérie) des eucaryotes. Les bactéries font partie des procaryotes; alors que les champignons sont des eucaryotes (Nicklin et al., 2000). Les procaryotes possèdent un matériel génétique situé directement dans le cytoplasme de la cellule alors qu'au contraire pour les eucaryotes il est contenu dans un noyau (Willey, 2008).

3.1. Bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes de petites tailles appartenant à un groupe appelé procaryote. Leur structure cellulaire est simple et il y a manque notamment de nombreux organites et des structures internes que l'on trouve dans les cellules eucaryotes (Nicklin et al., 2000). Malgré cette simplicité structurelle, il existe une grande diversité dans la forme des cellules lorsqu'elles sont observées au microscope. Deux formes cellulaires prédominent : sphérique (*coccus*) et en bâtonnet (*bacillus*), mais il existe d'autres formes tels que en spirale (*spirillum*) ou encore en virgule (*vibrio*) par exemple (Nauciel et Vildé, 2005).

Le cytoplasme de la majorité des bactéries est entouré par une membrane plasmique externe revêtue d'une paroi cellulaire rigide constituée de sucres et d'acides aminées, appelée peptidoglycane (Backer et al., 2007). Les bactéries Gram positives (Gram +) ont une membrane plasmique entourée par une couche épaisse de peptidoglycane (20-80nm). Les bactéries Gram négatives (Gram -) possèdent une fine couche de peptidoglycane (1-3nm) mais elle est entourée d'une membrane externe supplémentaire constituée de lipopolysaccharides agissant comme une barrière (figure 3) (Nicklin et al., 2000).

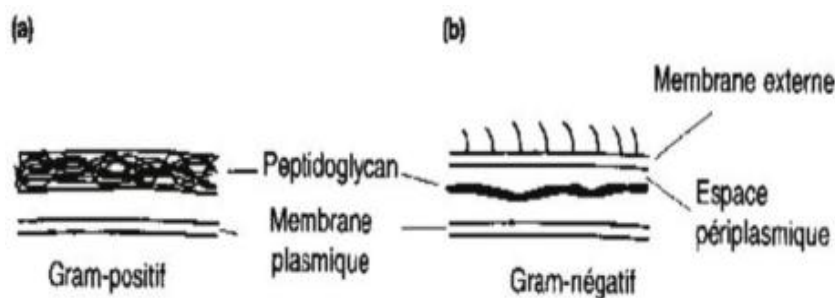


Figure 3. Structure de la surface d'une cellule bactérienne:
a. Gram positif ; b. Gram négatif (Nicklin et al., 2000)

3.2. Champignons

Les champignons microscopiques se divisent en deux groupes :

- les champignons unicellulaires ou levures
- les champignons pluricellulaires ou moisissures

3.2.1. Levures

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires. Elles possèdent un seul noyau et se reproduisent soit de façon asexuée par bourgeonnement ou scissiparité, soit par reproduction sexuée par formation de spores (Backer et al., 2007). La structure de la cellule est constituée de trois couches: une membrane plasmique, un espace périplasmique et une membrane externe (Klis, 1994). La forme végétative des levures peut être caractérisée par les termes sphérique, globuleuse, allongée ou encore cylindrique.

3.2.2. Moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques, susceptibles de coloniser des substrats très différents tels que les produits alimentaires, les cosmétiques, etc. Les hyphes se multiplient au niveau de leurs extrémités, formant ainsi une masse emmêlée appelée mycélium. Chaque hyphe est composée d'une paroi cellulaire externe et d'un espace interne délimitant la membrane plasmique (Nicklin et al., 2000).

3.3. Croissance microbienne

La croissance microbienne est divisée en plusieurs phases, adaptées à partir de Panikov, 1995 (figure 4).

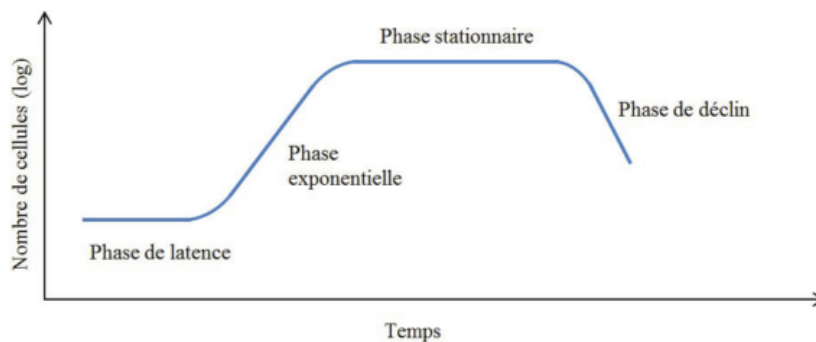


Figure 4. Cycle de croissance microbienne (Panikov, 1995)

- **La phase de latence**

La phase de latence suit l'introduction des microorganismes dans le milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise les éléments nécessaires afin de métaboliser les substrats présents dans le milieu lui permettant de se développer.

- **La phase exponentielle**

Lorsque la phase d'adaptation précédente est terminée, la reproduction cellulaire commence et ce de manière très rapide de par une abondance des ressources nutritives.

- **La phase stationnaire**

Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets après la phase exponentielle. Il y a un début d'auto-destruction des micro-organismes.

- **La phase de déclin**

La dernière étape est une phase de décroissance pour laquelle toutes les ressources nutritives sont épuisées.

4. Analyse microbiologique du produit

Dans le but de déterminer la nécessité d'une analyse microbiologique des produits, en vue d'une détection de microorganismes spécifiés et non spécifiés, il est conseillé aux industriels d'effectuer une analyse du risque microbiologique selon la norme NF EN ISO 29621 de Juin 2011. En effet, les produits présentant un faible risque microbiologique ne nécessitent pas la mise en œuvre des normes internationales de microbiologie relatives aux produits cosmétiques. Une attention particulière doit être accordée aux produits cosmétiques utilisés sur le contour des yeux, sur les muqueuses en général, sur une peau lésée, chez les enfants de moins de trois ans, chez les personnes âgées et chez les personnes à système immunitaire fragilisé. Ces produits sont dits de catégorie 1, les autres étant dits de catégorie 2. Ces produits doivent répondre aux contraintes suivantes :

- **Catégorie 1:** le nombre total de microorganismes mésophiles aérobies (microorganismes pouvant se développer à des températures entre 20 et 45°C, en présence d'oxygène atmosphérique (Brannan et al., 2006)) acceptable, ne doit pas excéder 10^2 CFU/g (Unité Formant Colonie).
- **Catégorie 2 :** le nombre total de microorganismes mésophiles aérobies acceptable ne doit pas excéder 10^3 CFU/g (Porracchia et al., 2006).

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* sont les microorganismes pathogènes à risque dans les produits cosmétiques car elles peuvent engendrer des infections cutanées ou ophtalmologiques. Elles ne doivent donc pas être détectées dans 0,5 g ou mL de produits de catégorie 1, ni dans 0,1 g ou mL de produits de catégorie 2. La détection d'autres sortes de microorganismes (par exemple des indicateurs de contamination fécale tels qu'*Escherichia coli*) peut aussi s'avérer nécessaire car leur présence laisse penser à une défaillance de l'hygiène au cours du processus de fabrication. Ainsi, la qualité microbiologique des produits fabriqués doit être évaluée tout au long de la chaîne de fabrication, de la matière première au produit fini, en passant par l'environnement de production.

5. Challenge test

Le challenge test est un test réglementé permettant d'évaluer l'efficacité du système conservateur présent dans les produits cosmétiques. Il existe différentes normes définissent un test d'efficacité de la conservation antimicrobienne ou challenge test :

- Pharmacopée Européenne 7.0 EP 5.1.3 : Efficacité de la conservation antimicrobienne;
- Pharmacopée US - USP 51: Preservative Challenge Testing by Antimicrobial Test;
- NF T 75 611:2007: Cosmétiques – Microbiologie – Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique.

Le challenge test permet de tester le comportement d'une formulation cosmétique face à une contamination volontaire et artificielle par des microorganismes de référence afin que les produits mis à disposition du consommateur ne présentent pas de risque particulier. Les microorganismes de test sont inoculés en quantité déterminée puis l'évolution de la population viable est suivie par dénombrement des micro-organismes dans des échantillons prélevés à différents intervalles de temps (J2, J7, J14 et J28). La température et la durée des essais sont contrôlées. Les challenges tests utilisent comme micro-organismes de test les souches pathogènes pour l'être humain à savoir: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger/brasiliensis*. Selon la norme utilisée et les résultats du test, il existe différents critères d'acceptation. Le profil A représente l'efficacité antimicrobienne recommandés tandis que pour le profil B des éléments supplémentaires justifiant un niveau de maîtrise du risque microbiologique doivent être démontrés (conditionnement, pH, activité de l'eau,...).

6. Paramètres influençant la conservation des cosmétiques

De la bactérie à l'humain, tout organisme vivant requiert des conditions spécifiques pour se développer. L'élément essentiel à la croissance de toute cellule est l'eau. Cet élément est donc l'un des critères déterminant pour le développement des micro-organismes. Chaque micro-organisme possède également un domaine de pH dans lequel la prolifération est optimale. De plus, la présence de nutriments, de minéraux et d'oxygène est nécessaire (Kabara, 1996). Les facteurs favorisant le développement et la croissance des micro-organismes étant connus, il est donc possible de trouver des solutions de formulation pour limiter, voire empêcher ce phénomène (Geis, 2006). La réduction de l'activité de l'eau peut aider à lutter contre les développements microbiens dans les produits cosmétiques.

CHAPITRE III : STRESS OXYDANT

Introduction

Les substances naturelles souvent à haute valeur ajoutée, sont synthétisées dans les différents organes des plantes. Lorsque la production de radicaux libres dépasse les capacités de défense de l'organisme, ils accélèrent le vieillissement des cellules et augmentent le risque de développement de certaines maladies dégénératives (stress oxydatif). Les antioxydants ont la capacité de neutraliser les radicaux libres et de prévenir ce stress oxydatif. Dans le domaine cosmétique, les études menées au niveau mondial montrent que l'utilisation des extraits riches en antioxydants permet de combattre aussi le vieillissement de la peau en éliminant les radicaux libres dont la formation est activée par les conditions environnementales de la vie moderne (rayon UV, tabagisme, chauffage,...). La substitution des antioxydants synthétiques par des antioxydants naturels n'est pas seulement bénéfique pour la santé mais montre une meilleure solubilité de ces derniers dans l'eau et dans les huiles, qui facilite la formation des émulsions alimentaires ou cosmétiques.

1. Stress oxydant

L'organisme est pourvu de plusieurs moyens de défense dont les molécules antioxydantes de faibles poids moléculaires. Ces molécules réductrices consomment directement les radicaux libres formés au cours de réactions d'oxydoréduction. Un déséquilibre entre la production excessive de molécules oxydantes et/ou une diminution du taux d'antioxydants dans l'organisme est défini par le terme de stress oxydant (Boyd et al., 2003).

2. Radicaux libres

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié (Jacques et al., 2004). Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995). Les radicaux libres sont produits au cours de nombreuses réactions engagées dans les mécanismes physiologiques (respiration mitochondriale), dans les mécanismes pathologiques (inflammation, infection, toute pathologie dégénérative et vieillissement accéléré) et au cours de la pollution.

3. Espèces réactives de l'oxygène

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

4. Conséquences moléculaires du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques comme l'oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003).

5. Maladies liées au stress oxydatif

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

6. Antioxydants

6.1. Définition

Les antioxydants en cosmétique sont des réducteurs ayant la capacité d'interrompre la réaction de peroxydation et ainsi d'empêcher la formation d'hydroperoxydes et de peroxydes, courante pour les huiles insaturées. Ils sont utilisés dans toutes les formules contenant des corps gras insaturés, mais peuvent également être incorporés à des phases aqueuses contenant des extraits végétaux riches en oxydases, enzymes catalysant la réduction de l'oxygène en eau ou en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'oxydation générant bien souvent un phénomène de rancissement à proscrire en cosmétique, il est donc important de connaître la sensibilité des matières premières et produits finis cosmétiques à ce phénomène ainsi que les facteurs qui en sont responsables.

Les tocophérols, naturellement présents dans les huiles végétales, notamment l' α -tocophérol, sont fréquemment formulés en cosmétique, tout comme les antioxydants phénoliques très présents dans les extraits végétaux (Garrison et al., 2011). On peut également recourir aux antioxydants sous forme de complexe ou en association avec un chélateur de métaux. L'acide ascorbique, hydrosoluble, et son dérivé lipophile, le palmitate d'ascorbyle, sont souvent employés comme antioxydants synergistes. L'acide citrique ou l'EDTA sont utilisés comme chélateurs de métaux (Choe et al., 2009).

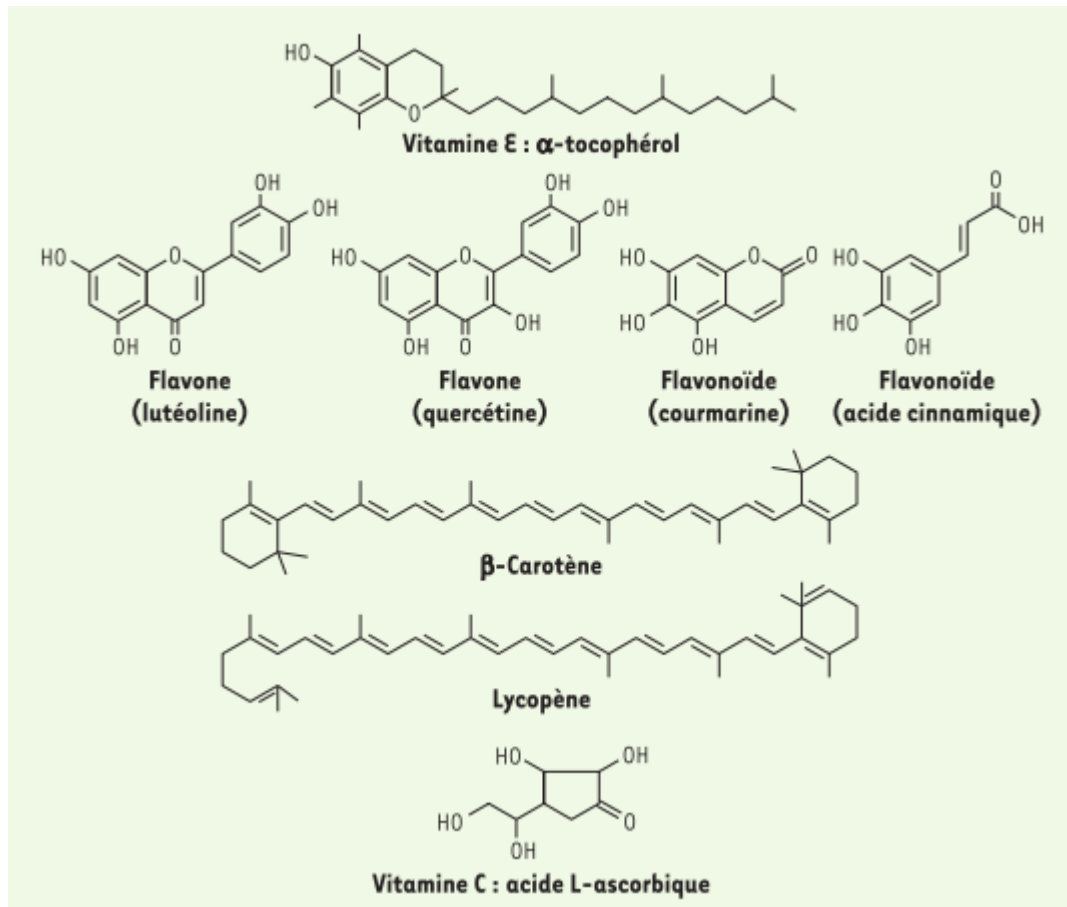


Figure 5. Principaux composés naturels (ou synthétiques) possédant des propriétés antioxydantes (Marc et al., 2004)

L'association de l'acide citrique avec du tocophérol, ou encore du β -carotène et de l' α -tocophérol, sont de bons exemples de complexes antioxydants synergiques ayant montré leur efficacité (Choe et al., 2009; Choe et Min, 2006). L'efficacité des antioxydants dans les systèmes lipidiques dépend de trois paramètres : leur solubilité, leur volatilité et leur stabilité. En effet, les antioxydants doivent être liposolubles afin de pouvoir réagir avec les radicaux libres issus de l'oxydation des huiles. Par ailleurs, ils ne doivent pas être trop volatils au risque d'être perdus lors du processus de fabrication du produit fini. Ils doivent également être

stables à la température mise en œuvre lors de la production. Il est nécessaire que les antioxydants soient ajoutés avant que les réactions d'oxydation n'interviennent car, s'ils préviennent ce phénomène, ils n'ont aucune action sur les produits de l'oxydation.

6.2. Mécanisme d'action

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques tel est le cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait soit des agents de prévention, qui bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs ou en réagissant avec l'oxygène; soit des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres et qui agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres agissent en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (Berset et Cervelier, 1996).

7. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Plusieurs méthodes s'intéressent à l'analyse des étapes distinctes du processus d'oxydation comme par exemple la mesure de l'affaiblissement du substrat, et /ou la consommation de l'oxygène au cours de l'oxydation; la formation des produits d'oxydation et la capacité à piéger les radicaux libres en différentes phases.

7.1. Méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Cette méthode a été décrite pour la première fois par Miller et Rice-Evans (1993) puis améliorée en 1999 par ces auteurs. En fait, elle consiste en la réduction du radical-cation coloré (2,2'-azobis 3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide) plus connu sous le nom de ABTS^{•+}. Le développement de sa concentration est suivi à 734 nm au cours de sa réaction avec les antioxydants (Figure 6). La capacité antioxydante est mesurée comme la concentration (mM) de Trolox (un analogue soluble de la vitamine E) produisant le même effet que l'échantillon d'essai sur la réduction d'ABTS (Miquel-Becker et al., 2004). La

littérature fournit le TEAC de certains antioxydants (Vitamine C = 0,99 mM, β -carotène = 1,9 mM).

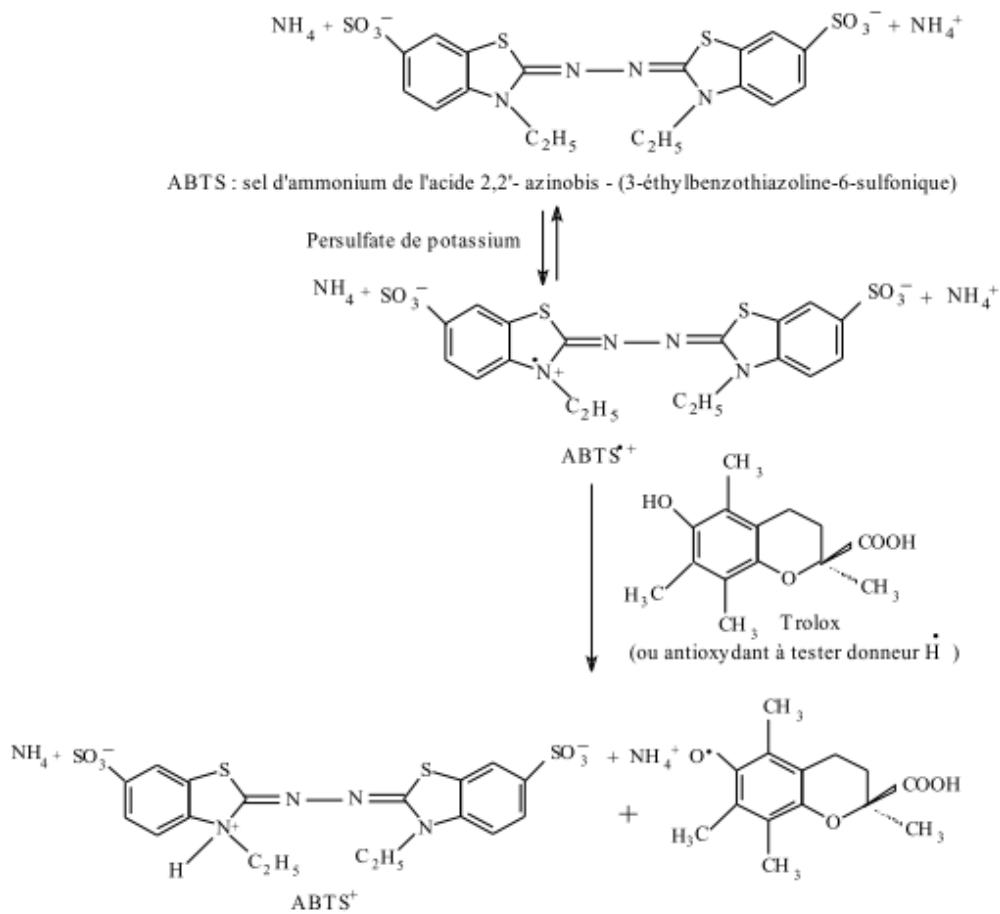


Figure 6. Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•] (Lien et al., 1999)

7.2. Test DPPH (1, 1-Diphényl-2-picrylhydrozyl)

La capacité antioxydante peut aussi être mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette. Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du radical DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale. L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie à 517 nm.

une solution aqueuse de sulfate de fer heptahydraté ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) entre 100 et 1000 μM . A partir des valeurs d'absorbance lues à 593 nm et mesurées à $t = 0$ min puis à $t = 4$ min après le mélange, les résultats peuvent être exprimés en valeur FRAP suivant la formule:

$$\text{FRAP} = \frac{A(\text{échantillon})_{t=4 \text{ min}} - A(\text{échantillon})_{t=0 \text{ min}}}{A(\text{standard})_{t=4 \text{ min}} - A(\text{standard})_{t=0 \text{ min}}} \times [\text{standard}] (\mu\text{M})$$

- $A_{\text{échantillon}}$ correspond à l'absorbance de l'échantillon à $t = 0$ ou $t = 4$ min
- A_{standard} correspond à l'absorbance de la solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à $t = 0$ ou $t = 4$ min
- $[\text{standard}]$ correspond à la concentration en $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Plus la couleur bleue est intense, plus l'échantillon peut être considéré comme un bon réducteur.

7.4. Méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Elle consiste à mesurer la protection exercée par une substance ou molécule donnée contre l'oxydation de la fluorescéine par les dérivés radicalaires de la dégradation thermolytique du radical AAPH. Contrairement au test du DPPH, qui mesure une capacité de réduction, il s'agit donc de la mesure d'un pouvoir antiradicalaire. Les résultats sont exprimés par rapport à la protection exercée par un antioxydant de référence, le Trolox et ramenés par gramme de produit testé. Lorsque la fluorescéine est soumise à l'action oxydante d'un radical libre, l'AAPH, on observe que sa réponse en fluorescence diminue au cours du temps (environ 30mn). En présence d'une activité antiradicalaire (composé, produit naturel, etc.....) la fluorescéine est protégée du stress et la durée de sa fluorescence est prolongée. C'est cette augmentation qui permet de quantifier le pouvoir antiradicalaire via un étalonnage par le Trolox.

7.5. Méthode de blanchissement du β -carotène

Le test de blanchissement du β -carotène permet d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes, qui consiste à suivre la cinétique de décoloration du β -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique en présence d'un antioxydant. Le β -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation (Portes, 2008). Plus l'efficacité d'un antioxydant est grande, plus la décoloration de la couleur du β -carotène sera lente et vice versa (Hussain, 2009; Moon et Shibamoto, 2009).

7.6. Piégeage du radical hydroxyle (HRSA)

Le $\cdot\text{OH}$ est le radical libre extrêmement réactif formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de Haber Weiss (Castro et Freeman, 2001). Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé (2310 mV) lui permet de réagir avec les lipides, les protéines, les polypeptides et l'ADN particulièrement la thiamine et la guanine (Siddhuraju et Becker, 2007). *In vitro*, la capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton en mesurant la génération du radical $\cdot\text{OH}$ et son effet sur l'oxydation et la dégradation des molécules biologiques tels que le désoxyribose de l'ADN. Dans cette technique, le système implique l'autoxydation du complexe Fe^{2+} -EDTA dans un milieu aqueux pour former $\text{O}^{\cdot-}$, qui est rapidement dismuté en H_2O_2 à pH 7.4. Ensuite, ce dernier interagit avec Fe^{2+} pour former les radicaux $\cdot\text{OH}$ en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur (réaction de Fenton) :



La dégradation du désoxyribose par $\cdot\text{OH}$ dégage certains produits estimés en malonaldéhyde (MDA), d'un chromogène rose lors du chauffage avec l'acide thiobarbiturique et dans un milieu acide. La présence des antioxydants protège et diminue la production des MDA (Halliwell et al., 1987). Notant que, le rôle d'ascorbate est la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} ce qui provoque la réaction de Fenton :



CHAPITRE IV :

INFLAMMATION ET NOCICEPTION

Introduction

L'inflammation est le résultat de l'activation d'un ensemble complexe d'interactions entre des cellules et des médiateurs chimiques. Elle se développe dans tous les types tissulaires suite à un traumatisme physique (rayons UV, blessure), infectieux (bactéries, virus) ou chimique (toxiques). Cette réaction a pour but d'éliminer l'agent inflammatoire et de favoriser la cicatrisation du tissu atteint. Cependant lorsque la réponse inflammatoire est exacerbée à cause d'une altération excessive du tissu ou d'une cicatrisation anormale, les lésions tissulaires peuvent persister aboutissant à certaines maladies chroniques comme l'eczéma allergique de contact, polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose.

Le traitement de l'inflammation est souvent basé sur l'apport des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et des glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes, anti-inflammatoires stéroïdiens, ont tous une activité hormonale, concernant principalement la régulation métabolique, et exercent un effet freinateur sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Tous les AINS, quelles que soient leur voie d'administration, exposent aux risques de toxicité gastro-intestinale. Le risque est d'autant plus important que la posologie est élevée et que le traitement est prolongé.

1. Processus inflammatoire

1.1. Définition

L'inflammation se définit comme un ensemble des mécanismes réactionnels de défense de l'organisme contre une agression d'origine exogène ou endogène (Dupond, 2003). Elle peut être causée par des agressions physiques (comme le chaud, le froid, les radiations ionisantes) ou chimiques (composés acides ou basiques, des toxines bactériennes). Elle peut être la conséquence d'une infection due à la présence dans l'organisme vivant des pathogènes tels que bactéries, virus, parasites ou champignons (Jean, 2009).

2. Types d'inflammation

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire :

2.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë ou réaction inflammatoire est la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Charles et al., 2010). Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë sont toujours les mêmes quelque soient le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé.

2.1.1. Phases de l'inflammation

La réaction inflammatoire est divisée en trois grandes phases:

Phase vasculaire : La réponse vasculaire se caractérise par une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et se traduit par des signes suivants: chaleur-œdèmes-douleur. L'augmentation de la perméabilité entraîne aussi la diapédèse, la migration extravasculaire des leucocytes et une libération de facteurs tissulaires à savoir l'histamine, la sérotonine, les kinines, et les prostaglandines (Jean, 2009).

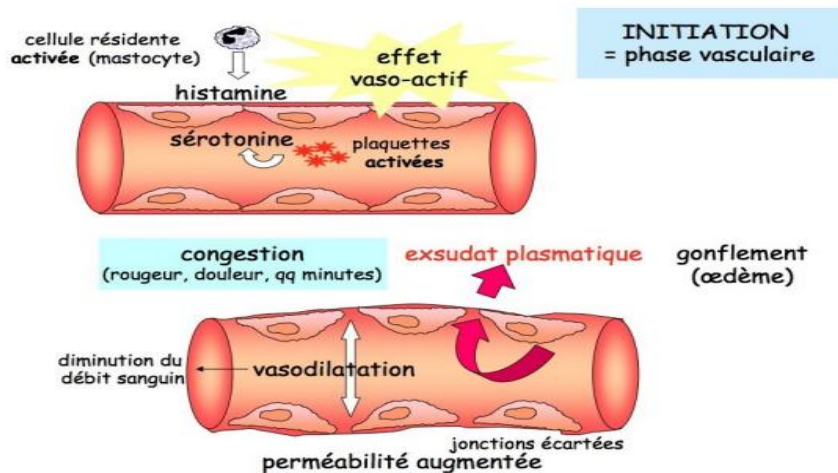


Figure 9. Initiation de l'inflammation (Lonjon, 2015)

Phase cellulaire: Les cellules de l'inflammation comprennent: les leucocytes, les lymphocytes, les cellules phagocytaires, les mastocytes et les polynucléaires basophiles, les fibroblastes. Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages neutralisent ou détruisent l'agent déclencheur de l'inflammation (Dupond, 2003).

Phase de résolution: C'est la phase de réparation qui se termine par une restitution complète ou presque des tissus lésés (cicatrisation). Si l'agression persiste, elle peut se poursuivre, par une inflammation chronique qui met en jeu les lymphocytes et l'immunité adaptative (cellulaire et humorale) (Dupond, 2003).

2.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est caractérisée par une infiltration de cellules mononucléaires comme les macrophages, lymphocytes et plasmocytes dans les tissus avec prolifération de vaisseaux sanguins et de tissu conjonctif (Anderson, 1994; Cotran et al., 1994). Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes. Elle est considérée comme étant causée par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise. Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires.

L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (Charles et al., 2010). En tout type de réponse inflammatoire, les différences entre les types de molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales détermineront le type de leucocytes qui migrent (Charles et al., 2010; Nourshargh et al., 2006).

L'inflammation chronique se caractérise par l'existence de certains phénomènes spécifiques:

- Les réponses vasculaires et cellulaires, au lieu de se succéder dans le temps comme c'est le cas pour l'inflammation aiguë, sont intriquées de telle sorte qu'on ne parle plus de phases mais de composantes vasculaires et cellulaires.
- L'afflux cellulaire dans le foyer inflammatoire s'organise peu à peu en infiltrat dense, comportant à la fois polynucléaires, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes, plasmocytes.
- L'altération durable de la structure des vaisseaux: hypertrophie des cellules endothéliales et des fibres musculaires lisses, infiltration leucocytaire.

- Les phénomènes de remaniement tissulaire sont toujours importants, comportant à la fois des phénomènes de destruction, des phénomènes d'angiogenèse et des phénomènes de réparation, de cicatrisation et de remplacement des tissus détruits. Mais le tissu fibreux cicatriciel ne saurait véritablement remplacer les tissus détruits, car il n'en a pas les propriétés anatomiques et fonctionnelles (Weill et Batteux, 2003).

3. Cellules de l'inflammation

Les différentes cellules impliquées dans une réaction inflammatoire sont :

- **Les kératinocytes**

Les kératinocytes sont des cellules cutanées épidermiques. Ils sont impliqués dans l'initiation et le développement des réactions inflammatoires et immunologiques (McKenzie et Sauder, 1990). Après stimulation, les kératinocytes sécrètent des cytokines inflammatoires (IL-1, TNF- α), des chimiokines (IL-8, IP-10), des facteurs de croissance (IL-6, GM-CSF, TGF- α) et des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) (Williams et Kupper, 1996).

- **Les fibroblastes**

Les fibroblastes sont la principale source de cytokine inflammatoire TNF- α suite à une stimulation telle qu'une irradiation aux rayons UV (De Kossodo et al., 1995). Ces données suggèrent que les fibroblastes jouent un rôle d'amplification important en réponse aux cytokines produites par les kératinocytes.

- **Les mastocytes**

Les mastocytes sont des cellules granuleuses présentes dans les tissus muqueux et cutanés. Les mastocytes sont capables de synthétiser de nombreuses cytokines (histamine, TNF- α) et des médiateurs lipidiques comme des prostaglandines, des leucotriènes et le PAF (platelet activating factor) qui participent à l'initiation et le maintien de l'inflammation en favorisant le recrutement de leucocytes au site de l'inflammation (Saint-Mezard et al., 2002; Williams et Kupper, 1996; Gordon et Galli, 1990).

- **Les macrophages**

Les macrophages résidant dans le derme dérivent de monocytes du sang. Les macrophages sont des acteurs essentiels des réactions inflammatoires où ils peuvent former des syncytia par fusions de leurs membranes, aboutissant à des cellules géantes multinucléées (Revillard,

2001). Par ailleurs, ils interviennent aussi dans les phénomènes de réparation et de cicatrisation.

- **Les cellules dendritiques dermiques (CDD)**

Les CD dermiques, appelées aussi dendrocytes dermiques, appartiennent à la lignée des cellules dendritiques qui constituent une population hétérogène. Les CDD cutanées ont la propriété de capturer l'antigène, de migrer jusqu'aux ganglions drainants et d'activer des LT.

- **Les cellules endothéliales vasculaires**

L'endothélium vasculaire forme une monocouche de cellules endothéliales, il constitue la barrière anatomique entre le sang et les tissus. Les cellules endothéliales permettent le passage de cellules par le phénomène de diapédèse (McEver et al., 1989). Les cellules endothéliales sécrètent aussi de nombreuses cytokines et chimiokines permettant ainsi le recrutement de plus de cellules immunitaires compétentes au site d'inflammation.

- **Les polynucléaires**

Les polynucléaires regroupent des cellules granuleuses qui sont les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Ils ont la capacité de migrer dans les tissus en réponse à un signal chimiotactique et de sécréter un grand nombre de cytokines inflammatoires (Bos, 2004). Les polynucléaires peuvent être recrutés au cours de l'activation de l'immunité innée et spécifique, alors que les LT sont uniquement présents dans la peau dans une réponse inflammatoire spécifique.

- **Les lymphocytes T**

Les LT sont issus de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse différenciés dans le thymus. Ils sont principalement présents dans les organes lymphoïdes: les ganglions lymphatiques et la rate. On distingue deux sous-populations se différenciant par l'expression des marqueurs CD4 ou CD8. Tous deux possèdent des récepteurs spécifiques d'antigène, le TCR (T cell receptor). La reconnaissance de l'antigène nécessite sa présentation par des molécules du CMH-I pour les LT CD8+ et CMH-II pour les LT CD4+.

4. Médiateurs de l'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation sont des acteurs importants dans le processus inflammatoire. Ils augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les leucocytes sur le lieu de

l'inflammation, favorisent leur adhésion à l'endothélium, augmentent l'agrégation des plaquettes (Male et al., 2007; Rankin, 2004). La Figure 10 montre les origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire.

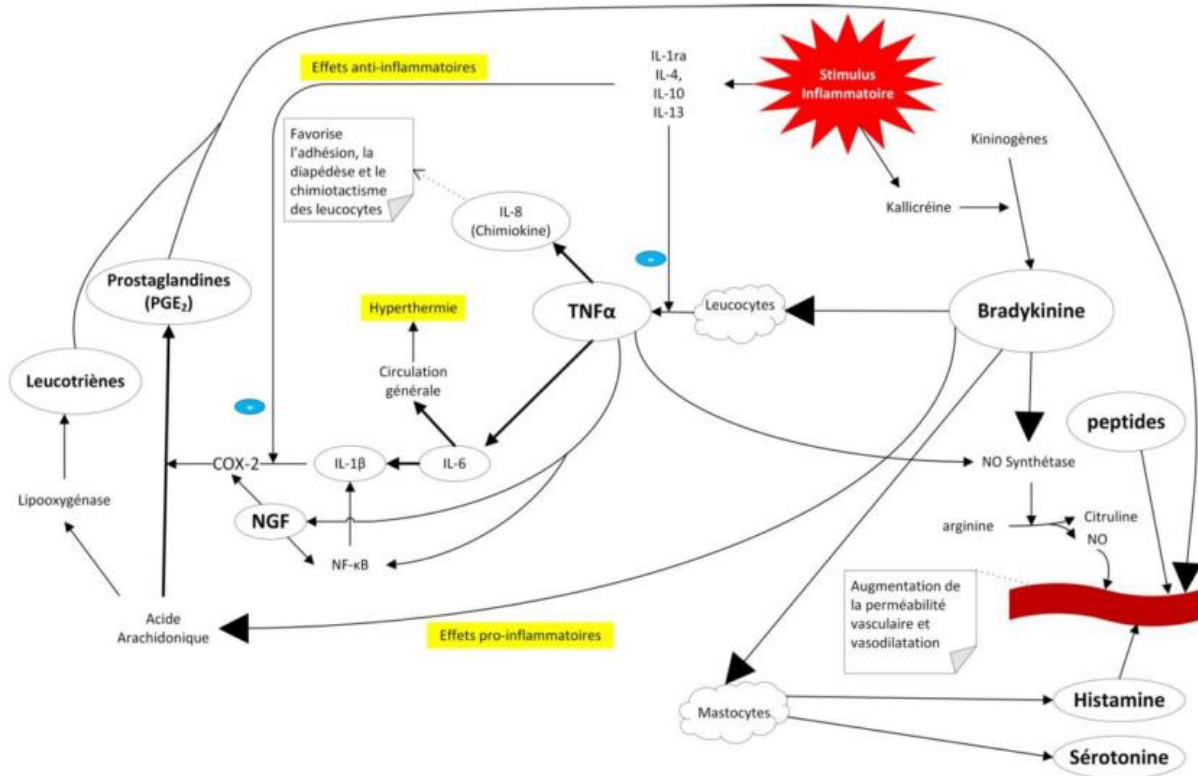


Figure 10. Médiateurs de l'inflammation (Le Bars et Willer, 2004)

5. Pathologies inflammatoires

Plusieurs maladies inflammatoires sont liées à des mécanismes considérés comme dysimmunitaires, à savoir les maladies auto-immunes systémiques et localisées, les maladies auto-inflammatoires, les affections inflammatoires (Charles et al., 2010). Quelques exemples sont rapportés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Quelques exemples de maladies inflammatoires et ses origines (Nathan, 2002)

Origines	Maladies inflammatoires
Désordres dans les quelles le rôle pathogénique principal revient à l'inflammation	Asthme Polyarthrite rhumatoïde Artériosclérose Arthrose Goutte Maladie d'Alzheimer Lupus érythémateux disséminé Eczéma Maladie de Crohn
Maladies d'origines infectieuses dans lesquelles l'inflammation contribue dans la pathologie	Hépatite C Tuberculose Dysenterie bactérienne
Maladies d'origines diverses dans lesquelles la fibrose poste inflammatoire est la cause principale de la pathologie	Fibrose pulmonaire idiopathique Cirrhose hépatique poste virale ou alcoolique

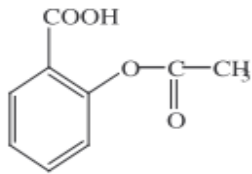
6. Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont une classe de médicaments subdivisée en deux catégories.

6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

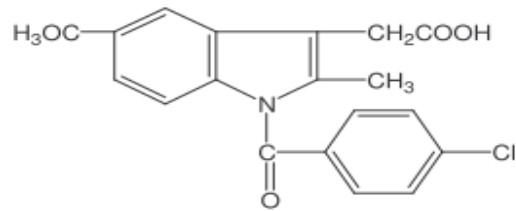
Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) forment un groupe de médicaments destinés à traiter la réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent tels que les manifestations rhumatismales, les stomatites, les inflammations génitourinaires. Une particularité de cette classe de médicaments est que tous les AINS possèdent à des degrés divers les propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. Dans le processus de la réaction inflammatoire, au cours de la phagocytose et de la synthèse des différents dérivés de l'acide arachidonique, il y a une libération de superoxydes à action pro-inflammatoire d'où l'inflammation. Les AINS inhibent par action sur la cyclooxygénase la synthèse des prostaglandines; et par action sur la lipooxygénase inhibent la formation de superoxydes. L'acide acétylsalicylique ou Aspirine constitue l'anti-inflammatoire non stéroïdien le plus usuel (Touitou, 1993). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS s'accompagne d'effets favorables et délétères (Blain et al., 2000).

Salicylé



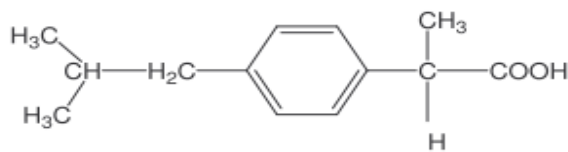
Acide acétyl salicylique

Indolique



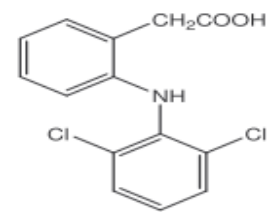
Indométacine

Propionique



Ibuprofen

- Acide fenamique



Diclofénac

Figure 11. Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Wallace et Staats, 2004)

6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) de référence sont représentés par la cortisone et l'hydrocortisone. Ces corticoïdes inhibent la réponse inflammatoire quelque soit l'agent phlogogène responsable entraînant une réduction de la vasodilatation et de l'œdème en diminuant le chimiotactisme et la migration leucocytaire vers le foyer inflammatoire. Cet effet est un phénomène qui nécessite de l'énergie. Cette énergie est apportée par la glycolyse aérobie. En diminuant l'entrée du glucose dans la cellule, la cortisone abaisse la réponse aux facteurs chimiotactiques. Le métabolisme oxydatif des mitochondries est diminué, il s'en suit une baisse de l'activité de phagocytose. Elle empêche la libération des enzymes protéolytiques et leur action inflammatoire par stabilisation des membranes lysosomiales (polynucléaires et macrophages). Par inhibition de la lipase, il en résulte une diminution de la biosynthèse des prostaglandines. Ces médicaments agissent sur la réaction inflammatoire sans en supprimer la cause.

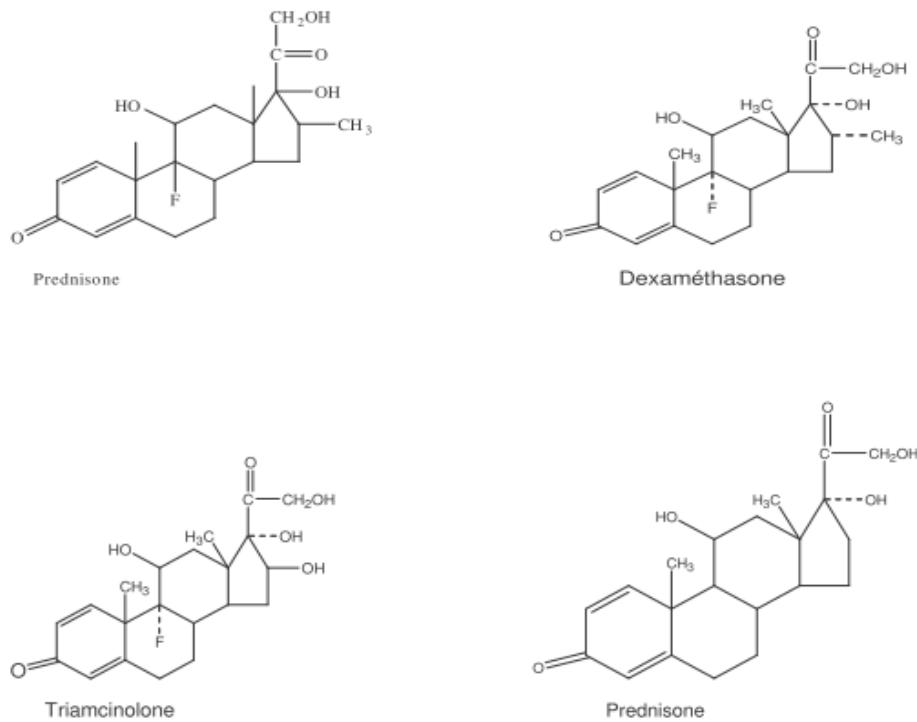


Figure 12. Exemples de structures d'anti-inflammatoires stéroïdiens de synthèses
(Henzen, 2003)

6.3. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires

En réponse à une perturbation physique ou chimique, il se produit une activation de la phospholipase A2 qui hydrolyse les liaisons esters des phospholipides membranaires et libère des dérivés de l'acide arachidonique, ce dernier à son tour est métabolisé selon deux voies, la voie de la lipooxygénase qui le transforme en leucotriène et la voie de la cyclooxygénase qui le transforme principalement en prostaglandine. Les leucotriènes augmentent la perméabilité capillaire et exercent une chimioattractivité sur les polynucléaires. Les prostaglandines produisent une vasodilatation locale, favorisent l'œdème et l'afflux leucocytaire, en outre, ils dépriment certains mécanismes immunitaires et potentialisent les effets algogènes de la bradykinine. Les thromboxanes stimulent les mécanismes de l'agrégation plaquettaire.

Les AINS ont une similitude dans leurs effets thérapeutiques liés à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines en bloquant la synthèse de la cyclo-oxygénase (COX) qui catalyse la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Fattorusso et al., 2001). Ils entraînent une diminution de la migration cellulaire et des actions des tissus conjonctifs (glycoprotéine, collagène) (Bourin et al., 1993).

Les glucocorticoïdes empêchent la formation de glycéro-phospholipides membranaires en acides arachidoniques par la production d'enzyme lipocortine. Ils diminuent la migration des polynucléaires, monocytes, macrophages vers le site de l'inflammation et la production de médiateurs comme la sérotonine, l'histamine et les cytokines (Bourin et al., 1993).

6.4. Effets indésirables des anti-inflammatoires

L'utilisation thérapeutique des AINS à long terme est souvent associée à des effets indésirables tels que les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale. Ces effets indésirables sont généralement liés à l'inhibition des isoenzymes cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2) par les AINS classiques. La COX-1 est constitutive et joue un rôle physiologique en maintenant l'intégrité des tissus, tandis que la COX-2 est inductible, sa synthèse est stimulée par le TNF α et l'interleukine IL-1. L'apparition des AINS sélectifs du COX-2 appelé coxibs vient réduire les effets secondaires gastro-intestinaux, mais ils induisent un risque cardiovasculaire (Ouedraogo et al., 2012).

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie. Divers troubles peuvent être observés. Ces troubles peuvent être aigus tel que l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'euphorie avec insomnie allant jusqu'à une psychose aiguë et l'apparition d'ulcères gastro-duodénaux. Des troubles chroniques peuvent aussi se manifester tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003).

7. Plantes à activité anti-inflammatoire

Le tableau 3 résume quelques plantes qui sont connus pour leur activité anti-inflammatoire.

Tableau 3. Exemples de plantes médicinales dotés d'activités anti-inflammatoires (Barnes, 1998)

Nom scientifique	Nom commun	Famille	Partie utilisée	Utilisation
Zingiber officinale	Gingembre	Zingiberaceae	Rhizome	arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
Urtica dioica	Ortie	Urticaceae	Feuilles, Racines	Rhinite allergique, eczéma goutte, douleurs rhumatismales
Curcuma longa	Curcuma	Zingiberaceae	Rhizome	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
Nerium oleander L.	Laurier rose	Apocynaceae	Fleurs	Douleurs, maux de tête
Oenothera biennis	Onagre bisannuelle	Onagraceae	Graines	Douleurs rhumatismales
Laurocerasus officinalis R.	Laurier	Rosaceae	Feuilles	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
Juglans regia L.	Noyer commun	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Douleurs rhumatismales, fièvre, eczéma. Malaria

8. Douleur

Le terme de douleur désigne un spectre de sensations dont les caractéristiques peuvent être très différentes et dont l'intensité peut aller du désagréable à l'insupportable (Lüllmann et al., 2006). La douleur assure une fonction de signal d'alarme en informant l'organisme de la présence d'un désordre susceptible de lui nuire. Il importe donc de contrôler la douleur tout en la considérant comme un élément de surveillance de la progression de la maladie.

8.1. Types de douleur

8.1.1. Douleur aiguë

La douleur aiguë est une douleur vive, immédiate, et généralement brève. Elle est causée par une stimulation nociceptive de l'organisme. La douleur a ici un rôle de signal d'alarme. Sa durée d'évolution est inférieure à trois mois (Boureau et Doubrère, 2016).

8.1.2. Douleur chronique

La douleur chronique est définie par une durée d'évolution supérieure à trois mois ou six mois selon les auteurs (Boureau et Doubrère, 2016). Par le fait même de sa persistance, une douleur qui était initialement un signal d'alarme peut se modifier et devenir un syndrome à part entière.

8.2. Traitement pharmacologique de la douleur

L'OMS a proposé dans le cadre des douleurs cancéreuses une échelle de décision thérapeutique comportant trois paliers d'analgésiques (Boureau et Doubrère, 2016).

- Le niveau I correspond aux analgésiques non narcotiques et aux anti-inflammatoires non stéroïdiens : paracétamol, aspirine, anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).
- Le niveau II correspond aux opioïdes mineurs et à leurs associations aux analgésiques non morphiniques : codéine, tramadol.
- Le niveau III correspond aux analgésiques opioïdes majeurs : morphine, fentanyl, buprénorphine, hydromorphone.

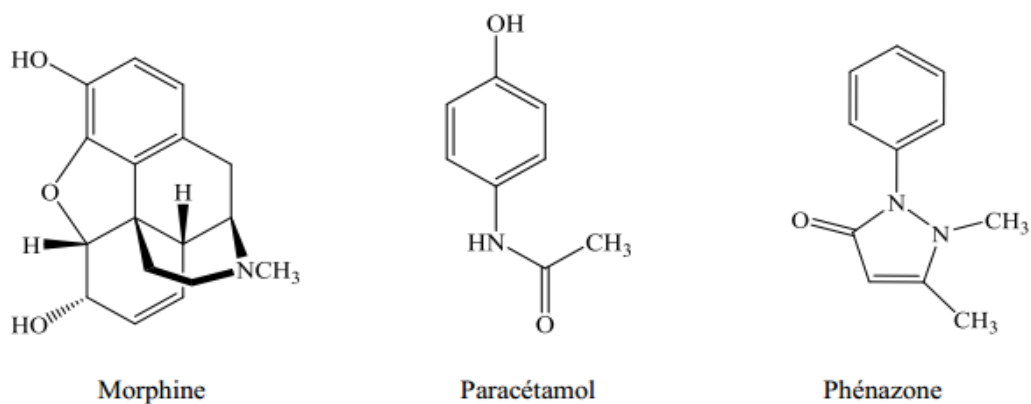


Figure 13. Structures chimiques de quelques analgésiques (Timbo, 2003)

8.3. Mécanisme d'action des analgésiques

• Paracétamol

Le paracétamol a une action inhibitrice sur la synthèse de prostaglandines mais exerce une faible activité anti-inflammatoire. L'inhibition des cyclooxygénases par le paracétamol se produit seulement dans le cerveau, ce qui explique le peu d'effets indésirables périphériques observés contrairement aux AINS (Graham et al., 2005).

• Les AINS

Ces médicaments ont un effet antalgique et antipyrétique associé à un effet anti-inflammatoire. Les effets des AINS résultent principalement de l'inhibition de la cyclooxygénase et ainsi de la synthèse des prostaglandines. Cette inhibition peut être irréversible, avec les salicylés, ou non, avec les autres AINS (Flipo et al., 1993).

- **Les opioïdes**

L'effet analgésique des opioïdes est lié à leur affinité pour des récepteurs destinés à fixer les opioïdes endogènes (enképhaline, β -endorphine, dynorphine). Les récepteurs des opioïdes sont présents à la surface des cellules nerveuses. Ils sont présents dans différentes zones du cerveau et dans la moelle épinière, mais aussi dans les plexus nerveux du tractus gastro-intestinal et de la vessie.

Il existe plusieurs types de récepteurs des opioïdes (μ , κ et δ) par l'intermédiaire desquels sont médiés des effets différents. Tous appartiennent aux récepteurs couplés à une protéine G. La majeure partie des cellules nerveuses réagit aux opioïdes par une hyperpolarisation. L'influx de calcium qui se produit dans la cellule nerveuse au cours d'une excitation est diminué, réduisant de ce fait la libération de neurotransmetteurs excitateurs et la transmission synaptique (Lüllmann et al., 2006).

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

1. Enquête ethnopharmacologique

Dans le but de sélectionner les plantes médicinales et cosmétiques utilisées traditionnellement par la population de la ville de Sefrou et particulièrement les plantes antiseptiques, une étude ethnopharmacologique a été réalisée dans cette région.

1.1. Zones d'étude

La province de Sefrou est une division du Maroc de la région de Fès-Meknès. Elle s'étend sur un territoire de 4008 Km² et chevauche entre la plaine de Saïs et le Moyen Atlas. Elle est limitée au Nord par la préfecture de Fès et la province de Moulay Yacoub, à l'Ouest par la province d'El Hajeb, au Sud par les provinces de Boulemane et d'Ifrane, à l'Est par la province de Taza et au Nord-Est par la province de Taounate. Cette enquête a été réalisée dans la région du Moyen Atlas de Maroc, auprès de la population locale, dans quatre communes rurales (Bhalil, Aghbalou Aqorar, Ait Taleb et douar Ain smar) situés dans la région de Sefrou (Figure 14).

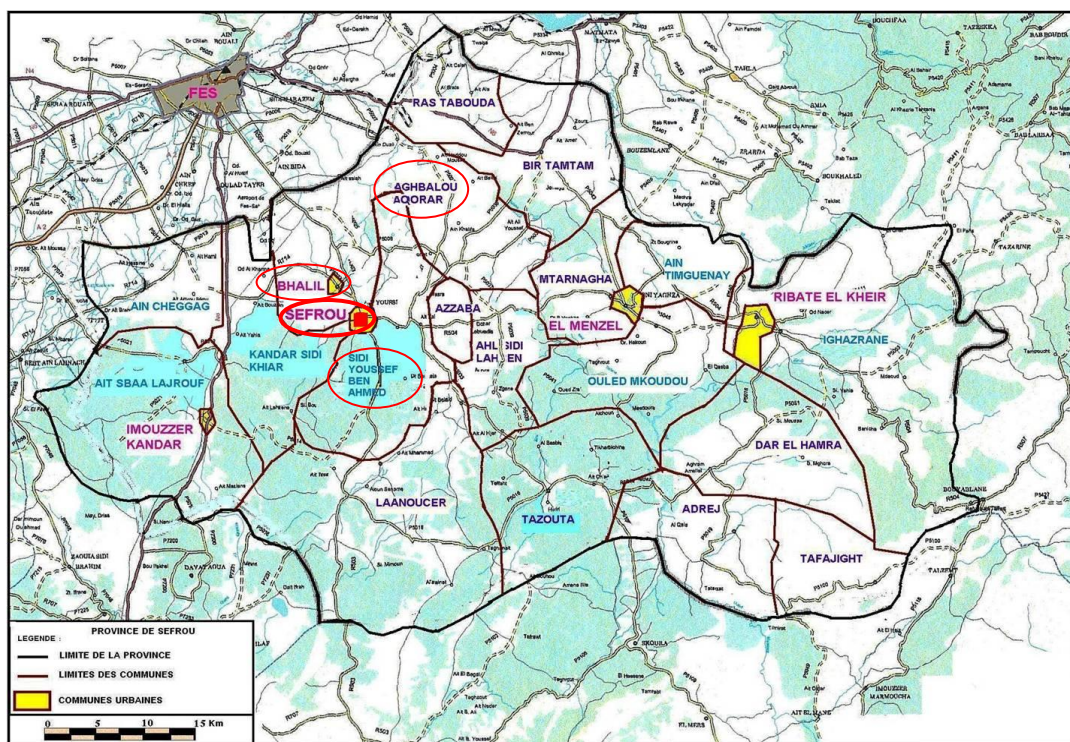


Figure 14. Situation des zones d'enquête sur la région de Sefrou

1.2. Fiche questionnaire

Dans le but de récolter des informations relatives à l'exploitation des plantes médicinales et cosmétiques, une série d'enquêtes ethnopharmacologiques a été réalisé à l'aide d'un

questionnaire dans la zone d'étude. Les questions ont porté sur les différents usages des plantes et surtout celles qui sont utilisées dans les affections dermatologiques dans la médecine traditionnelle, les parties utilisées, questions précises sur l'informateur, l'identité vernaculaire de la plante et les modes de préparation ainsi que leurs voies d'administration. Les différentes informations ont été collectées dans un questionnaire pré établi.

2. Matériel végétal

Les plantes choisies pour cette étude sont sélectionnées à la base de notre enquête ethnopharmacologique effectuée dans la région de Sefrou et d'autres enquêtes (Bellakhdar, 1997). Les monographies concernant ces plantes sont mentionnées dans la partie I bibliographique.

2.1. Sélection des plantes

2.1.1. *Silene vulgaris* (Moench) Garcke

Les feuilles de *S. vulgaris* ont été récoltées en printemps durant les années 2012, 2013 et 2014 dans la commune rurale Ait Taleb (région Sefrou). La plante est identifiée et herborisée à l'herbier de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA).

2.1.2. *Teucrium Polium* L.

Les parties aériennes de cette plante ont été récoltées dans le Barrage Allal Al Fassi de la région de Sefrou en Juin 2013. La plante est identifiée et herborisée à l'herbier de l'Institut Scientifique à Rabat.

2.1.3. *Satureja hochreutineri* Briq

Les parties aériennes de cette plante ont été récoltées dans la région de Sefrou en Juillet 2013. La plante est identifiée et herborisée à l'herbier de l'Institut Scientifique à Rabat.

2.1.4. *Origanum elongatum* Emb. Et Maire.

Les parties aériennes de cette plante ont été récoltées à l'INPMA dans la région de Taounate en Juin 2014. La plante est identifiée et herborisée à l'herbier de l'Institut Scientifique à Rabat.

2.1.5. *Thymus broussonetii* Boiss.

La partie aérienne de *Thymus broussonetii* a été récoltée dans le jardin expérimental de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA) dans la région de

Taounate en Mai 2014. La plante est identifiée et herborisée à l'herbier de l'INPMA. Dans cette étude nous avons travaillé sur deux génotypes de cette espèce Tb(7) de chémotype thymol et Tb(3) de chémotype carvacrol qui proviennent de la culture *in vitro* réalisée dans le laboratoire de Biotechnologie à l'INPMA par Nordine et al., 2014.

2.1.6. *Thymus satureioides* Coss.

La partie aérienne de cette plante a été récoltée dans le jardin expérimental de l'INPMA dans la région de Taounate en Mai 2014. La plante est identifiée et herborisée à l'herbier de l'INPMA. Cette plante provient de la culture *in vitro* selon une étude réalisée dans le laboratoire de Biotechnologie à l'INPMA par Nordine et al., 2013.

2.1.7. *Thymus zygis* L.

Les parties aériennes sauvages et cultivées de cette plante ont été récoltées respectivement dans la région de Sefrou et l'INPMA dans la région de Taounate en Mai - Juin 2014. La plante est identifiée et herborisée à l'herbier de l'Institut Scientifique à Rabat.

2.2. Étude microscopique

Pour l'évaluation microscopique de la poudre de *S.vulgaris* et afin d'étudier la présence ou l'absence de différents types de tissus ou structures dans la poudre étudiée, la plante séchée est transformée en poudre à l'aide d'un broyeur électrique, puis soumise à des études microscopiques en utilisant l'hydrate de chloral pour éclaircir l'observation microscopique.

3. Études phytochimiques

3.1. Extractions

3.1.1. Extraction par Ultrasons ou Sonication

L'extraction assistée par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Elle constitue une alternative verte aux techniques d'extraction conventionnelles. Par ailleurs, sa mise en œuvre courte préserve les composés les plus thermolabiles (acides gras polyinsaturés, caroténoïdes, polyphénols...) des réactions de dégradation.

Dans un flacon de 500 ml, 20 gramme de la poudre de *S. vulgaris* mélangé à 200 ml d'hexane, a été mise dans un Sonicateur de marque "ELMA", à une fréquence de 35 kHz pendant 45 min, sous une température de 25°C. Après filtration et séchage du résidu obtenu, l'extrait a été

ré-extrait par une solution hydro-éthanolique (70%) pendant 45 min dans les mêmes conditions de la première extraction. L'extrait final a été récupéré après filtration et séché à sec dans un Rotavapeur à une température de 40 °C.

Calcul de rendement

Le rendement de l'extrait hydro-éthanolique a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = \frac{m_{\text{extrait}}}{m_s} \times 100$$

Avec :

- m_{extrait} (g): masse de l'extrait récupéré
- m_s (g) : masse végétale sèche

3.1.2. Extraction des Huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles de trois espèces de thym, *O. elongatum*, *T. polium* et *S. hochreutineri*, a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). Trois distillations ont été réalisées par ébullition, pendant 3h, en mélangeant 150 g de la partie aérienne des plantes étudiés fraîche avec 1 l d'eau dans un ballon de 2 l, surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. L'huile essentielle récupérée a été stockée à 4 °C à l'obscurité.

Calcul de rendement

Le rendement des huiles essentielles a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = \left(\frac{V}{M'} - (M' \times H) \right) \times 100$$

Avec :

- V : volume d'HE recueilli (ml)
- H % = Taux d'humidité exprimé en pourcentage
- H (%) = $\frac{m_{\text{fraic he}} - m_{\text{sèche}}}{m_{\text{fraic he}}} \times 100$
- M' : la matière végétale distillée (g)

3.2. Caractérisation des molécules actives

Un criblage phytochimique de l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* a été réalisé par le biais de techniques entreprises dans les travaux de (N'guessan et al., 2009; Yam et al., 2009; Diallo, 2005; Karumi et al., 2004; Dohou et al., 2003). Ces essais consistent à mettre en évidence la présence d'un certain nombre de groupes chimiques de l'extrait, qui peuvent être responsables de ses effets biologiques. Les réactions de caractérisation utilisées sont citées ci dessous :

3.2.1. Révélation des flavonoïdes

Dans un tube à essai, 5 ml de l'extrait de la plante à étudier est ajouté à 5 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95%, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volumes); en plus de quelques copeaux de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rose orangée indique la présence des flavones, rose violacée (flavonones) ou rouge (flavonols, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique. Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les auronnes, les catéchines et les isoflavones (Debete, 2005).

3.2.2. Leucoanthocyanes

Dans un tube à essai, 5 ml de l'extrait de la plante à étudier est ajouté à 5 ml d'alcool chlorhydrique et 1 ml d'alcool isoamylique. Le tout est chauffé pendant 15 mn au bain-marie. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée. Les catéchols donnent une teinte brune rouge.

3.2.3. Révélation des tanins

Dans un tube à essai contenant 1 ml de l'extrait de la plante à étudier, 1 ml d'une solution aqueuse diluée de FeCl₃ à 1% est ajoutée. En présence des tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre (Debete, 2005).

- **Tanins catéchiques**

Dans un tube à essai, 5 ml de l'extrait est ajouté à 1 ml d'alcool chlorhydrique concentré. Le tout est porté à ébullition pendant 15 minutes. En présence de tanins catéchiques, il y a formation d'un précipité rouge soluble dans l'alcool isoamylique (Debete, 2005).

- **Tanins galliques**

Dans un tube à essai, 30 ml de l'extrait est ajouté à 15 ml du réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40 %, 15 ml d'acide chlorhydrique concentré). L'ensemble est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes, puis le précipité est filtré et le filtrat est saturé de 5 g d'acétate de sodium pulvérisé. Ensuite, 1 ml d'une solution de FeCl₃ à 1 % est ajouté goutte à goutte.

L'obtention du précipité montre la présence de tanins galliques. Le tout est filtré encore une fois et 10 ml de filtrat est saturé d'acétate de sodium, puis quelques gouttes de FeCl₃ à 1 % sont ajoutées. Le développement d'une teinte bleue noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny (Debete, 2005).

3.2.4. Révélation des saponosides

- Test quantitatif

Par agitation, une mousse persistante dont la hauteur est mesurable apparait dans les extraits à saponines, la teneur en saponines est quantifiée par le calcul de l'indice de mousse. Deux grammes du matériel végétal à tester sec et broyé sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau, portée à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, le volume à 100 ml est réajusté. À partir de cette solution mère, 10 tubes des volumes successifs de 1, 2, ... 10 ml sont préparés, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, la hauteur de la mousse persistante en cm est relevée. L'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } x \text{e tube} \times 5 / 0,0x.$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (Dohou et al., 2003).

- Test qualitatif

▪ Révélation des stérols et terpènes

L'extrait à tester est obtenu à partir de 1 g de poudre et 20 ml d'éther, laissé en macération pendant 24 heures, filtré et complété à 20 ml par l'éther. L'ensemble est évaporé jusqu'à sec dans une capsule de 10 ml d'extrait, puis le résidu est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique puis dans 1 ml de chloroforme. L'ensemble est partagé dans deux tubes à essai, l'un servant de témoin, et dans le fond du second tube 1 à 2 ml de H₂SO₄ concentré sont placés. A la zone de contact des deux liquides, il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette, révèle la présence de stérols et triterpènes.

▪ Révélation des hétérosides stéroïdiques

Un volume de 10 ml de chloroforme anhydre est ajouté à 10 ml d'extrait évaporé, et mélangé avec 5 ml d'anhydride acétique. Ensuite, quelques gouttes de l'acide sulfurique sont ajoutées; le tout est agité puis le mélange est laissé reposer. Le développement d'une coloration violacée virant au vert indique la présence des hétérosides stéroïdiques.

▪ Révélation des tritérpènes hétérosides

A cinq ml d'extrait, 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique sont ajoutés. S'il y'a apparition d'une coloration rouge marron dans la couche d'interphase, ceci indique la présence des tritérpènes hétérosides.

3.2.5. Révélation des coumarines

- Test de détection

Deux gramme de matériel végétal en poudre sont mélangés à 10 ml de CHCl₃. Après un chauffage de quelques minutes et une filtration, les extraits chloroformiques sont soumis à une CCM, le solvant étant le mélange toluène/Acétate d'éthyle (93:10). La visualisation du chromatogramme, après migration, se fait à 365 nm en absence et en présence de NH₃.

- Test de confirmation

Un gramme de la poudre végétale est placé dans un tube, en présence de quelques gouttes d'eau. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV (Dohou et al., 2003).

3.2.6. Révélation des quinones libres

Un gramme de matériel végétal sec et broyé est placé dans un tube avec 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés et concentrés au rotavapor. La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

3.2.7. Révélation des anthraquinones libres

Un volume de 1 ml de KOH aqueux 10 % (v/v) est ajouté à 1 ml d'extrait. Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

3.2.8. Révélation des anthracéniques combinés

- **O-hétérosides:** Un hydrolysate est préparé à partir du résidu de la drogue épuisée par le chloroforme auquel il faut ajouter 10 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré puis le tube à essai est placé au bain marie bouillant pendant 15 minutes, 5 ml de l'hydrolysate sont agités avec 5 ml de chloroforme. A la phase organique, 1 ml de NH₄OH dilué est ajouté. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines O-hétérosides.

- **C-hétérosides:** La solution à analyser est la phase aqueuse obtenue avec la solution à analyser des O-hétérosides. A cette solution 10 ml d'eau et 1 ml de FeCl₃ sont ajoutés. L'ensemble est chauffé au bain-marie pendant 30 mn, et refroidit sous un courant d'eau. Ensuite, le tout est agité avec 5 ml de CHCl₃, et la phase chloroformique est soutirée, puis 1

ml de NH₄OH dilué est ajouté. L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides.

3.2.9. Révélation des glycosides cardiaques

Deux ml de chloroforme sont ajoutés à 1 ml de l'extrait, L'apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de H₂SO₄ indique la présence des glycosides cardiaques (Mun et al., 2009).

3.2.10. Révélation des oses et holosides

La présence de ces composés est révélée par la réaction à l'acide sulfurique. Après évaporation à sec de 5 ml de l'extrait hydroéthanolique, 2 à 3 gouttes de l'acide sulfurique concentré sont ajoutés. Après 5 minutes, 3 à 4 gouttes d'alcool saturé avec du thymol sont ajoutés. L'apparition d'une coloration rouge révèle la présence d'oses et holosides (Diallo, 2005).

3.2.11. Révélation des mucilages

Les mucilages sont détectés à la suite de la formation d'un précipité floconneux après l'ajout de 5 ml d'alcool absolu à 1 ml de l'extrait de la plante à étudier à 10% (Diallo, 2005).

3.3. Dosage des composés phénoliques

3.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux sont évaluées suivant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme standard (Singleton et al., 1965). Le résultat est exprimé en équivalents d'acide gallique par gramme de plante suivant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique dont l'équation est : $Y = 463.03x - 4.7419$; $R^2 = 0.9994$

3.3.2. Dosages des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes totaux sont quantifiés par dosage direct par le trichlorure d'aluminium (Lamaison et al., 1991). L'extrait est mélangé à volume égal avec une solution d'AlCl₃ à 2%. Après une incubation d'une heure à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 430 nm. Le résultat est exprimé en équivalent de quercétine par gramme d'extrait (Figure 15).

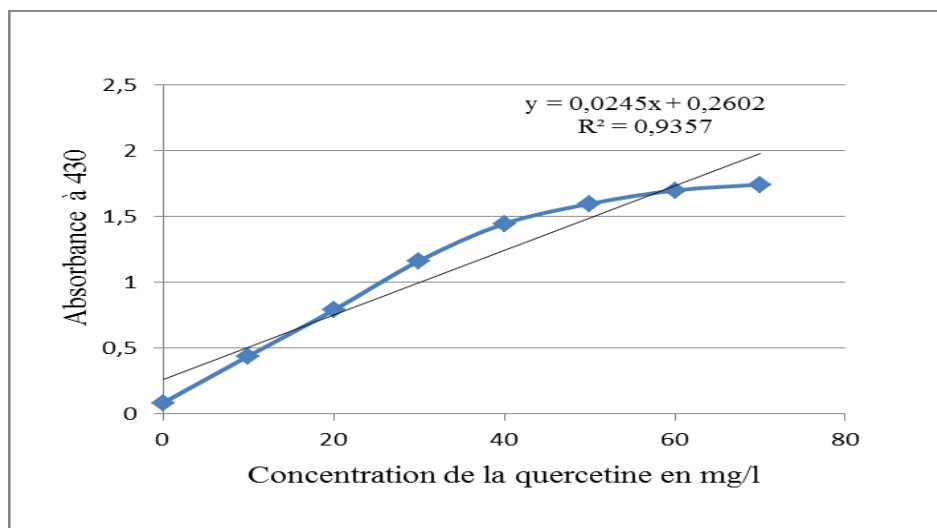


Figure 15. Courbe d'étalonnage de la Quercétine

3.3.3. Dosages des tanins totaux

La teneur en tanins totaux est déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode décrite par Sarneckis et al., (2006). Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide tanique par gramme de plante, selon la courbe d'étalonnage de l'acide tanique dont l'équation est :

$$Y = [Ac_{280} - Am_{280}] + 0,0065 / 0,0029$$

Avec : **Ac** : l'absorbance de contrôle.

Am : l'absorbance de mélange réactionnel.

3.3.4. Dosage des catéchines

La teneur en catéchines est déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode décrite par Swain et al., (1959), les résultats sont exprimés en équivalent de D-catéchines par gramme de plante suivant la courbe d'étalonnage de D-catéchine dont l'équation est :

$$Y = 340,72x - 50,56; R^2 = 0,998.$$

3.3.5. Dosage des O-diphénols

La teneur en O-diphénols est évaluée par la méthode décrite par Flanzly et Aubert (1969). Les résultats sont exprimés en équivalent de D-catéchine par gramme de plante.

3.3.6. Dosage des saponines

La teneur en saponines totaux est déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode décrite par Xiang et al., (2001). Les résultats sont exprimés en équivalent de l'acide oléanolique par gramme de la plante.

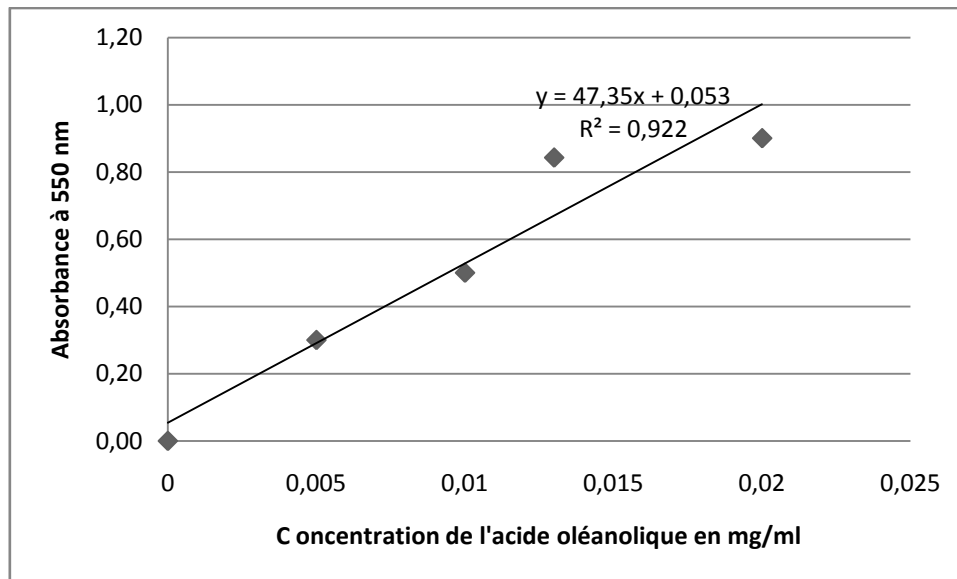


Figure 16. Courbe d'étalonnage de l'acide oléanolique

3.4. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'extrait de *S. vulgaris* est analysé par chromatographie liquide en phase inverse sur une chaîne HPLC SHIMADZU PROMINANCE, équipée d'un détecteur UV-visible, une pompe quaternaire de type LC A20 ainsi qu'un injecteur manuel de type RYODINE. Une colonne C18 de type Wakosil II (longueur = 150 mm; diamètre = 4.6 mm, 5 µm, 100Å) est utilisée. Le débit de la phase mobile est de 1 ml/min, en mode gradient ternaire composé de ACN-MeOH/eau acidifié à 0,2% d'orthophosphate. Le développement du gradient doit intervenir selon la combinaison indiquée dans le tableau 4. Un volume de 20 µl est injecté à température ambiante. Nous avons injecté les standards à des concentrations de 1 mg/ml, pour déterminer leur présence ou non dans l'extrait. Les préparations que ce soit l'extrait ou les standards (acide férulique, acide gallique, apéginine, épicatechine, épicatechine gallate, acide p-coumarique, quercétine, acide rosmarinique, rutine, vitamine C, acide caféique, lutéoline, acide tanique, acide syringique) sont filtrées par le biais du filtre seringue de 0,45 µm de porosité. Le détecteur UV est allumé au moins 1 heure avant l'analyse. La colonne chromatographique doit être conditionnée au moins 15 min avec le solvant d'élution de composition initiale (eau 0.2% H₃PO₄ (V/V) /méthanol/acétonitrile 96/2/2 (V/V/V)). Un premier essai chromatographique à "gradient vide" devrait toujours être réalisé au préalable (pour garantir l'absence de pics d'interférence de coélution), en injectant 20 µl de méthanol/eau 80/20 (V/V) dans le système HPLC.

Tableau 4. Gradient d'élution

Temps (min)	Flux (ml/min)	Solution A (%)	Solution B (%)	Solution C (%)
0	1.00	96	2	2
20	1.00	50	25	25
25	1.00	40	30	30
30	1.00	0	50	50
40	1.00	0	50	50
42	1.00	96	2	2
52	1.00	96	2	2

Le Gradient ternaire linéaire d'élution : eau 0.2 % H₃PO₄ (V/V) (A), Méthanol (B), acétonitril (C)

3.5. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC/MS)

Les analyses chromatographiques des huiles essentielles sont effectuées à la Cité d'Innovation de Fès, par le biais d'un chromatographe en phase gazeuse Trace GC ULTRA couplé à un spectromètre de masse Polaris Q MS. La colonne utilisée est une capillaire Varian (TR5-CPSIL- 5CB), de 50 m de longueur, d'un diamètre intérieur de 0,32 mm et d'une épaisseur de film de la phase stationnaire de 1,25 µm. Le gradient de température du four varie de 40 °C à 280 °C à raison de 5 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est de 1.5 ml/min. La gamme de balayage était comprise entre 40 et 650 uma et l'énergie d'ionisation d'électrons de 70 eV. La température de l'injecteur est 200 °C et du détecteur est de 260 °C. L'échantillon à analyser est solubilisé dans l'hexane et le volume d'injection est de 1 µl. L'analyse de chaque échantillon est répétée trois fois. La base des données utilisée NIST MS Search.

4. Formulation de la crème

Nous avons préparé une crème à base de la cire d'abeille et de l'huile d'amande au laboratoire de Toxicologie-Pharmacologie à l'INPMA. Pour avoir une meilleure consistance de la crème, nous avons mis en place plusieurs formules dans l'objectif d'arriver à une meilleure texture. La base de crème est constituée d'une phase huileuse et une phase aqueuse. La crème finale est préparée en solubilisant l'extrait ou l'HE dans la base de crème (Tableau 5).

Tableau 5. Composition de la crème formulée

	Base de crème	Composition (%)
Phase huileuse :	Cire d'abeille	22.0
	Huile d'amande	49.2
	Tween 80	0.80
Phase aqueuse :	Eau	qs 100
pH de la crème:	5.6	

5. Analyses microbiologiques

5.1. Souches, préparation des cultures

5.1.1. Souches de référence

L'activité antibactérienne, antifongique et l'efficacité de la conservation ont été évaluées sur les souches de référence suivantes (American Type Culture Collection (ATCC)) :

- Les bactéries à Gram-négatif sont *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
- Les bactéries à Gram-positif sont *Staphylococcus aureus* ATCC 29213;
- La levure *Candida albicans* ATCC 10231 et le champignon *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

5.1.2. Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes sont préparées à partir des pré-cultures de 24 heures sur gélose Mueller Hinton Agar (MHA) et Trypcase-soja Agar (TSA) à 37°C. A partir de la culture obtenue, une suspension bactérienne à 0,5 McFarland est préparée dans de l'eau physiologique. La densité bactérienne de la suspension obtenue est d'environ 10^8 UFC/ml. Les spores de la souche fongique (*Aspergillus brasiliensis*) sont récupérées à l'aide d'un écouvillon à la surface d'une culture de sept jours sur gélose de Sabouraud et mises en suspension dans du NaCl 0.9% stérile contenant 0,05% de polysorbate 80 pour une meilleure dispersion des spores pour le test de challenge test. Après passage au vortex, la suspension de spores est ajustée à la concentration désirée par dénombrement en utilisant la cellule de Malasez par microscopie optique. La suspension fongique de *Candida albicans*, est préparée dans 10 ml de solution de NaCl 0.9% stérile. La culture de 48 heures sur gélose de Sabouraud

incubée à 30°C est prélevée à l'anse. Le nombre de cellules de la suspension est ajusté à une valeur de 10⁸ UFC/ml.

5.2. Méthode de diffusion sur disque

La méthode de diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques consiste à utiliser des disques de papier (6 mm) imprégnés de différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose Mueller Hinton Agar (MHA) pour les bactéries et milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA) pour *C. albicans* préalablement ensemencés par les bactéries et la levure. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante (CLSI, 2012).

5.3. Méthode de puits

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de puits contre *Aspergillus brasiliensis* (Schlumberg et al., 1986) avec quelques modifications. L'inoculation se fait au centre de la surface gélosée de la boîte de Pétri à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Ainsi, on creuse des puits dans l'agar SDA d'un diamètre de 7 mm et on introduit 80 µl de l'échantillon dans le puits. Ensuite, on incube les boîtes de gélose et on évalue l'activité antifongique en mesurant la zone d'inhibition de la croissance fongique en mm.

5.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée, par la technique de microdilution en milieu liquide (NCCLS, 2012; Bouhdid et al., 2009). Des séries de dilutions doubles (50 µl) dans le Bouillon Mueller Hinton (BMH) pour les bactéries et le Bouillon Sabouraud (BSD) pour les champignons à 0,15% d'agar, sont préparées dans les puits d'une plaque de microtitration de 96 puits. A chaque puits sont ajoutés 50 µl du BMH ou BSD à 0,15% d'agar inoculés à partir de l'inoculum préparé en vue d'obtenir une concentration cellulaire finale d'environ 10⁶ UFC/ml. Les puits servant de contrôle ne contiennent pas d'échantillon. Les plaques sont ensuite, incubées à 37°C pendant 24 h. La CMI correspond à la plus petite concentration de l'échantillon qui ne produit aucune croissance visible. La CMI des antibiotiques est déterminée par la même méthode dans le BMH sans agar. Après incubation, l'absence de la croissance microbienne dans les microplaques, est déterminée par la résazurine.

5.5. Détermination de la Concentration Minimale Microbicide (CMM)

La CMM a été déterminée par étalement de 100µl du contenu de chaque puits de concentration supérieure ou égale à la CMI sur milieu solide. A partir de la CMI, la plus petite concentration, qui ne laisse survivre qu'au plus 0.01% des microorganismes (bactéries et champignons) de la suspension de départ, correspond à la CMM (NCCLS, 2012).

6. Test de Stabilité

Les études de stabilité constituent un élément clé lors du développement et de la commercialisation de nouveaux produits et substances actives cosmétiques. Les tests garantissent que le produit ou l'ingrédient réponde aux spécifications, dans les conditions de stockage définies et pendant toute sa durée de vie. Dans ces tests, on réalise en principe une étude de vieillissement accéléré et on évalue l'intégrité de la crème sur plusieurs critères pertinents, en fonction du produit : des critères microbiologiques, mais aussi physico-chimiques (pH, texture...) et organoleptiques (apparence générale, odeur, couleur...).

6.1. Contrôle physico-chimique et organoleptique

L'examen des caractéristiques macroscopiques constitue la première approche de la qualité de la préparation et doit faire l'objet d'une étude approfondie de la part du fabricant, afin de lui permettre l'observation de toute anomalie. En effet, des modifications perçues au niveau des caractéristiques visuelles, olfactives, sont des indicateurs possibles d'une dégradation de causes diverses (oxydations, variation de pH). Le pH de la formulation a été déterminé en utilisant le pH-mètre numérique, il a été vérifié au moment de la préparation de la crème (temps zéro) et ensuite après un mois de conservation à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, et $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pour vérifier sa stabilité à différentes températures. Ainsi, l'apparence générale, l'odeur, la couleur et la texture de la crème a été évaluée durant les 28 jours de stockage à différentes températures (Colipa, 2004).

6.2. Contrôle microbiologique

La charge microbienne de la crème conservée à différentes températures à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, et $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a été évaluée selon le test suivant : 100 mg de la crème ont été reprises dans 900 µl de NaCl 0.9% stérile, ensuite une série de dilutions de 10^{-2} à 10^{-4} a été préparée. 100 µl de chaque dilution ont été étalés à la surface des boîtes Pétri (9 cm) contenant 25 ml des milieux TSA pour les bactéries ou SDA pour les champignons. L'incubation a été effectuée pendant 24h à 5 jours à 37°C pour TSA et 48h à 5 jours à 30°C pour SDA. Les

résultats sont présentés par UFC par gramme de la crème (Marchand et al., 2011; SCCP, 2006).

7. Challenge test

Le challenge test ou le test de l'efficacité de la conservation (TEC) est une technique expérimentale qui permet de démontrer l'efficacité du système conservateur présent dans la formule cosmétique. Il consiste en l'inoculation volontaire d'une concentration connue de microorganismes. On dénombre ensuite les bactéries, les levures et les moisissures par analyse microbiologique à différents intervalles de temps pendant un mois. Les challenges tests sont réalisés suivant les critères de la Pharmacopée européenne (EP, 2005). Les souches testées sont :

Souches bactériennes :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Gram +)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram -)
- *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram -)

Souches fongiques :

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

La crème à tester est répartie aseptiquement en flacons stériles à usage unique, à raison d'un flacon par souche testée. 20 g de la crème sont prélevés dans chaque flacon. Chaque flacon de produit est inoculé avec la suspension d'une des souches à tester, afin d'obtenir une concentration finale de 10^5 à 10^6 microorganismes/g. Des prélèvements et analyses sont réalisés, à intervalles de temps donnés (T.2 jours, T.7 jours, T.14 jours, et T.28 jours), à partir des différents flacons. La méthode de dénombrement utilisée est en surface (résultats en UFC/g ou mL). Les crèmesensemencées sont conservés à 25°C à l'obscurité pendant les 28 jours du test. Le Tableau 6 indique les critères d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne d'un produit cosmétique.

Tableau 6. Critères d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne d'un produit cosmétique

Pharmacopée Européenne					
Souches	Critères	Réduction logarithmique			
		2J	7J	14J	28J
Bactériennes	A	2	3	/	NI
	B	/	/	3	NI
Fongiques	A	/	/	2	NI
	B	/	/	1	NI

(/ : pas d'abattement minimal requis, NI : pas d'augmentation)

Les critères A, représentent l'efficacité recommandée à atteindre. Dans des cas justifiés, lorsque les critères A ne peuvent être respectés (e.g. en raison d'une augmentation du risque de réactions indésirables). Cependant, les critères B s'appliquent. Une tolérance de $\pm 0,3$ log est admise pour chaque critère.

8. Etude de l'activité antioxydante

8.1. Activité antioxydante de l'extrait de *S. vulgaris*

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par cinq méthodes: La méthode ABTS, la méthode de réduction de radical libre DPPH, la méthode de réduction de fer FRAP, l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles (HRSA) et l'inhibition des dommages à l'ADN. Le pouvoir antioxydant ainsi que le dosage des différents polyphénols ont été réalisées au Laboratoire de Biotechnologie Agro-alimentaire à la Faculté des sciences, Université de Burgos en Espagne.

8.1.1. Méthode de Piégeage des radicaux ABTS^{•+}

La méthode est basée sur la décoloration qui se produit lorsque les cations ABTS^{•+} est réduit à ABTS (Rivero-Pérez et al., 2007; Re et al., 1999). Le radical est généré par réaction de l'ABTS à 7 mM avec 2.45 mM de K₂O₈S₂ dans l'eau. Le mélange est incubé pendant 16h à l'obscurité et à température ambiante. Le test s'effectue en mélangeant 980 µl de ABTS^{•+} (60µM) avec 20 µl de l'échantillon. L'absorbance est mesurée à 734 après 15 minutes, la cinétique de la réaction a été faite pendant 90 minutes pour établir le temps de stabilité de la réaction où l'activité est maximale. Les résultats sont exprimés en mM (Trolox)/g de la plante sèche. Pour chaque échantillon, un blanc constitué de 980 µl de l'eau et 20 µl de l'échantillon est préparé. L'équivalent en Trolox est calculé par la formule suivante :

$$\text{mM (Trolox)} = 0.0139 + 2.0968 \times (\text{A0} - \text{Af})$$

Avec : **A0** : l'absorbance de blanc.

Af : l'absorbance de mélange réactionnel.

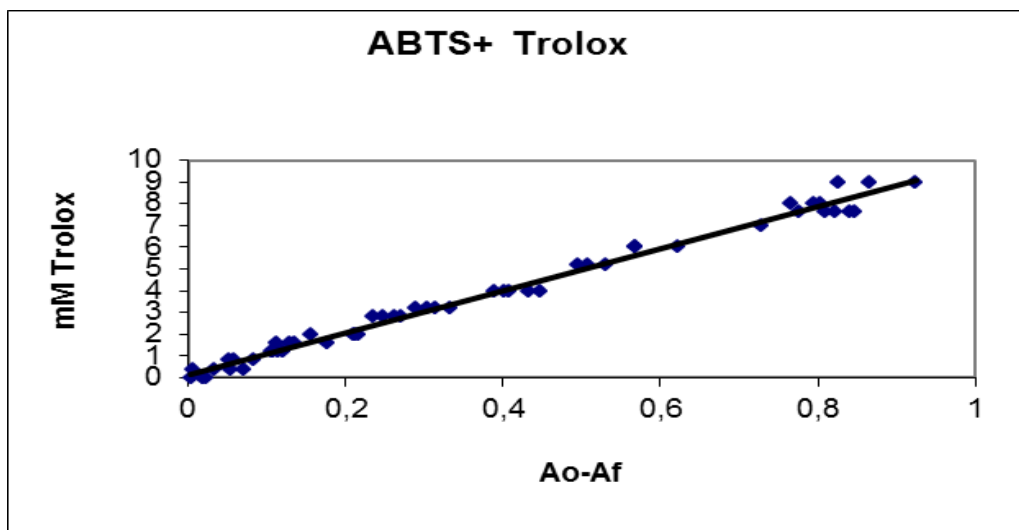


Figure 17. Courbe d'étalonnage de Trolox en fonction de la réduction de l'ABTS

8.1.2. Test DPPH (1, 1-Diphényl-2-picrylhydrozyl)

La méthode est basée sur la réduction du radical libre DPPH[•] (Rivero-Pérez et al., 2007; Brand-Williams et al., 1995), ce qui conduit à sa décoloration. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant à la longueur d'onde 517 nm la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH[•]. Le réactif est dissous dans le méthanol à une concentration de 60 µM. La réaction pourra avoir lieu lorsque la solution de DPPH atteint une valeur d'absorbance de l'ordre de 0.7 à 517 nm. Le test s'effectue en mélangeant 980 µl de DPPH (60 µM) avec 20 µl de l'échantillon. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 2h. Les résultats sont exprimés en mM (Trolox)/g de plante. Pour chaque échantillon, on prépare un blanc constitué de 980 µl de méthanol et 20 µl de l'échantillon. L'équivalent en Trolox est calculé par la formule suivante :

$$\text{mM (Trolox)} = 1.6903 \times (\text{A0} - \text{Af}) - 0.0056$$

Avec : **A0** : l'absorbance initiale de DPPH à 517 nm.

Af : l'absorbance de mélange réactionnel.

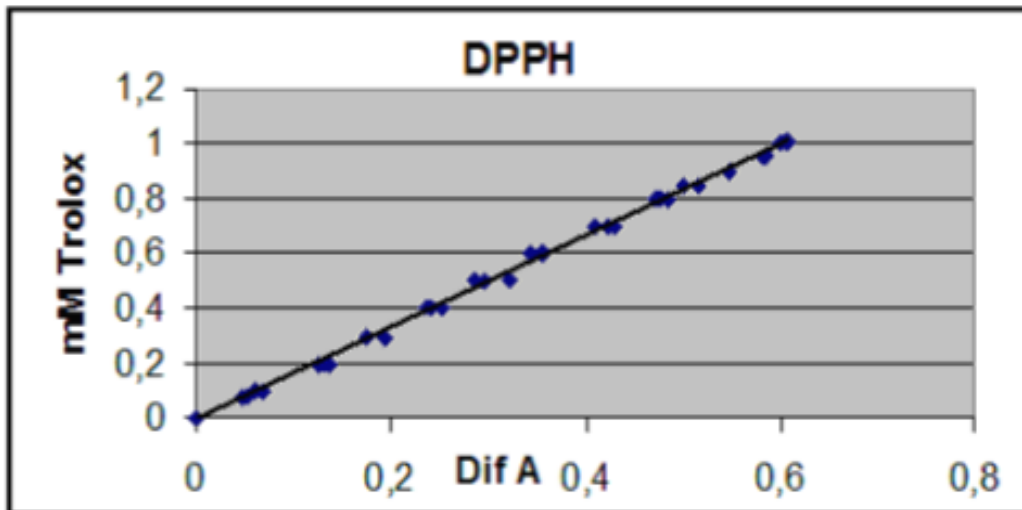


Figure 18. Courbe d'étalonnage de Trolox en fonction de la réduction de DPPH

8.1.3. Test de pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans l'extrait est déterminé selon la méthode décrite par Benzie et al., (1996). Le mélange réactionnel est constitué de 25 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium (0.3 M) à $\text{pH}=3.6$, 2.5 ml de TPTZ (10 mM), 2.5 ml de FeCl_3 (20 mM), et 3 ml d'eau distillée. 30 μl de l'extrait est ajouté à 970 μl de mélange et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Les résultats sont exprimés en mM ($\text{Fe}(\text{II})$) en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue par différentes concentrations de FeSO_4 . Une augmentation de l'absorbance à 593 nm correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé par la formation de complexe tripyridyl-S-triazine. L'équivalent en ($\text{Fe}(\text{II})$) est calculé par la formule suivante : $Y = 1.4744x + 0.0304$.

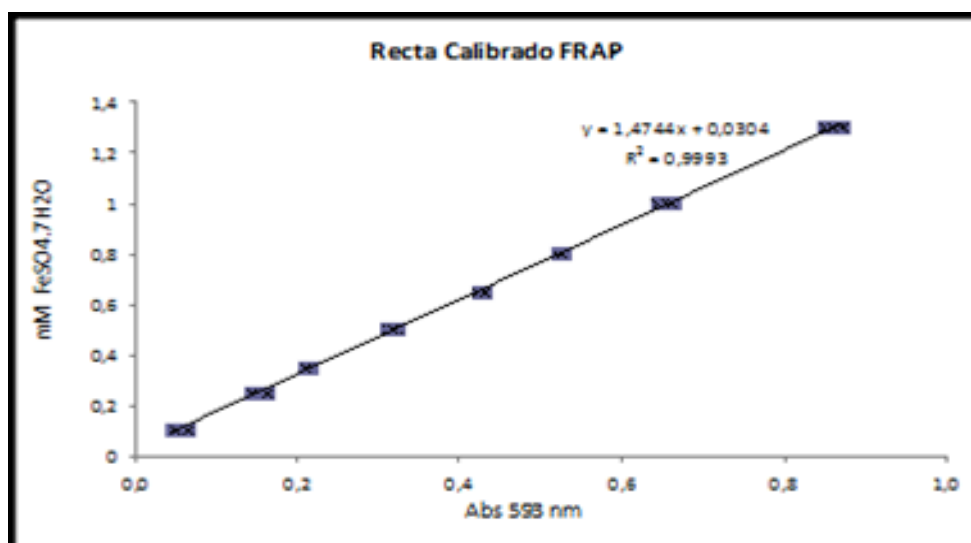


Figure 19. Courbe d'étalonnage de FeSO_4

8.1.4. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles (HRSA)

Le désoxyribose (2-désoxy-D-ribose) se désintègre lorsqu'il est exposé à des radicaux hydroxyles générés par la réaction de Fenton (Halliwell et al., 1987). Les radicaux hydroxyles (OH[•]) ont été générés par le système suivant: 10 µl de FeCl₃ (0.1 mM), 10 µl de l'acide ascorbique (0.1 mM), 10 µl de H₂O₂ (1mM) et 10 µl de EDTA (0.1 mM). 20 µl de l'extrait et 10 µl de désoxyribose sont incubés pendant une heure à 37°C en présence de FeCl₃, l'acide ascorbique, H₂O₂ et EDTA (3). Ensuite, le mélange est incubé pendant 15 minutes à 100 °C puis il est laissé refroidir à température ambiante. Le malondialdéhyde formé par la désintégration du désoxyribose est évaluée en réaction avec le TBA et mesurée à 532 nm.

Des témoins et contrôles ont été préparés comme suit :

- 10µl de désoxyribose + 990 µl de tampon (1)
- 10µl de désoxyribose + 10 µl d'acide ascorbique + 10 µl H₂O₂ + 10 µl de FeCl₃ + 10µl EDTA + 950 µl de tampon (2)
- 10µl de désoxyribose + 20µl d'extrait + 970 µl de tampon (4)

Les résultats sont exprimés en % d'inhibition selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (1 - (\text{DO (3)} - \text{DO (4)}) / \text{DO (2)}) * 100$$

8.1.5. Inhibition des dommages à l'ADN

8.1.5.1. Incubation de l'ADN de thymus de veau

Deux cent microgrammes de l'ADN de thymus de veau ont été mises en contact avec 100 µl d'échantillon et ont été exposés à l'action des radicaux hydroxyles, générés par le mélange de 100 µl d'acide ascorbique (1 mM) et 10 µl de sulfate de cuivre (II) (100 M). Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 1h. Ensuite, les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse.

8.1.5.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse a été réalisée avec 1% d'agarose à température ambiante en utilisant un système d'électrophorèse Bio-Rad power-Pac 1000 (Hercules, CA). Par la suite, le gel contenant 15µl de bromure d'éthidium (10 mg/ml) a été observé sous une lumière ultraviolette, à l'aide d'un transilluminateur, et photographié. Les bandes d'ADN ont finalement été numérisées en utilisant un gel Doc (à partir de Bio-Rad) (Guimaraes et al., 2007; Rivero-Pérez et al., 2005).

8.2. Activité antioxydante des HE

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée *in vitro* par trois méthodes à savoir: la méthode de réduction de radical libre DPPH, la méthode de réduction de fer FRAP, et le test de blanchissement du β -carotène dans l'acide linoléique.

8.2.1. Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrozyl)

Des gammes de concentrations des huiles essentielles et des contrôles positifs ont été préparées dans le MeOH à partir de la concentration mère (Burits et al., 2000). 50 μ l de chaque concentration ou du méthanol (contrôle négatif) ont été mélangées avec 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH à une concentration de 60 μ M. Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 20 min en triple. L'absorption du DPPH a été mesurée à 517 nm, ensuite traitée en pourcentage d'inhibition en utilisant la formule suivante:

$$I\% = (A_{\text{control}} - A_{\text{ech}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

Avec - A_{control} est l'absorbance du témoin (DPPH + méthanol)

- A_{ech} est l'absorbance de l'essai.

Cette valeur est comparée à celles trouvées pour les témoins (Quercétine et BHT).

8.2.2. Test de pouvoir réducteur de fer (FRAP)

L'activité réductrice des HE est basée sur la réaction chimique de réduction de Fer (III) présent dans le complexe ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) en fer (II) (Miraliakbari et al., 2008). Différentes concentrations des échantillons étudiés ont été préparées dans le méthanol, puis 200 μ l de chaque concentration a été mélangé avec 500 μ l d'un tampon phosphate (0,2 mol/L, pH 6,6) et 500 μ l d'une solution à 1% de complexe $K_3Fe(CN)_6$. Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 minutes. Après incubation 500 μ l d'une solution d'acide trichloroacétique à 10% a été ajouté pour arrêter la réaction. La solution est centrifugée pendant 10 min à 650g. Le surnageant 500 μ l a été mélangé à 500 μ l de l'eau distillée et 100 μ l de fer (1mg/ml). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en substituant le méthanol par l'huile essentielle. La couleur jaune du milieu réactionnel change en vert dont l'intensité varie en fonction du pouvoir réducteur de l'HE étudiée.

8.2.3. Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique (Sahin et al., 2004). Pour cela, 0,5 mg de β -carotène a été mélangé avec 1ml de chloroforme, 25 μ l d'acide linoléique et 200 μ l du Tween 40, le tout a été évaporé à sec afin d'éliminer le chloroforme puis 100 ml d'eau distillée a été ajouté au résidu sec afin d'avoir une émulsion. Un blanc a été préparé sans ajout de β -carotène afin de calibrer le spectrophotomètre. Différentes concentrations des HE étudiés ont été préparées dans le méthanol, puis 350 μ l de chaque concentration, ont été mélangés à 2,5 ml de l'émulsion préparé. Le tout incubé à 50 °C pendant 2h. Les radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant la diminution de l'absorbance à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène.

9. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vivo* selon deux modèles : un modèle d'inflammation aiguë relatif à l'induction de l'œdème par la carragénine et un modèle d'inflammation subaiguë du granulôme au pellet de coton.

9.1. Les animaux

Des rats Wistar ont été fournis par le centre ECWP (Emirates Wildlife Propagation Center) de Missouri. Dès leur réception, ils ont été placés au hasard en groupe de cinq dans des cages standard pour une période d'adaptation de deux semaines avant d'être utilisés dans les différentes expériences. Une période pendant laquelle les animaux ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau et ont été maintenus à température constante (22 ± 2) °C et à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Les animaux sont actifs pendant la période nocturne, c'est pour cette raison que la phase obscure commence à partir de 12h pour que les différentes expériences puissent avoir lieu durant cette phase.

9.2. Méthode de l'œdème induite par la carragénine

L'étude anti-inflammatoire a été réalisée en appliquant une crème à base de l'extrait de *S. vulgaris* aux doses de 10 et 20%. Pour ce faire, nous avons adopté la méthode décrite par Winter et al., (1962). Des groupes de neuf animaux chacun dont un groupe contrôle n'ayant reçu que la base de crème neutre sans extrait, par voie topique et un autre groupe ayant reçu le

Diclofénac 1% par application locale. Une heure et demi après l'administration de la crème par voie cutanée, une injection sous-cutanée de 0.1 ml de la carragénine (0.5%) est effectuée sur l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite. La circonférence de la patte est mesurée avant l'injection de la carragénine, puis à chaque heure à partir de la troisième heure jusqu'à la sixième heure après l'injection de la carragénine (Ayoola et al., 2009).

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{St-S}_0) \text{ contrôle} - (\text{St-S}_0) \text{ traité}}{(\text{St-S}_0) \text{ contrôle}} \times 100$$

Avec

- S₀= circonférence avant injection de la carragénine
- St= circonférence à un temps donné après l'injection de la carragénine.

9.3. Granulôme au pellet de coton

La méthode du granulôme aux pellets de coton a été utilisée pour l'évaluation de l'inflammation subaiguë (Jaijoy et al., 2010). Chaque lot est constitué de sept rats pour chaque groupe. Un lot témoin négatif traité par la base de crème, deux lots traités par la crème à base de l'extrait de *S. vulgaris* aux doses de 10 et 20% et un lot témoin positif traité avec le produit de référence le Diclofénac 1%. Les animaux sont anesthésiés à l'éther, épilés et une incision d'environ un centimètre (1cm) est réalisée au niveau de la région scapulaire dorsale de la patte antérieure. Des pellets de coton de 20 ± 1mg, préalablement stérilisés sont introduits sous la peau des animaux et l'incision refermée par suture. Aussitôt après, les produits cités ci-dessus sont appliqués par voie cutanée une fois par jour, à la même heure pendant sept (7) jours. Au huitième jour les animaux sont anesthésiés à l'éther, les pellets de coton et le thymus sont retirés, débarrassés de tissus adjacents puis séchés, et pesés. La différence de masse du pellet de coton avant et après implantation constitue la masse du granulôme, celle-ci varie en fonction de l'intensité de l'inflammation. La variation du poids corporel des animaux est mesurée du premier jour jusqu'à la fin de l'expérimentation (7j).

10. Activité analgésique

L'activité analgésique a été évaluée *in vivo* selon deux modèles de douleur, un modèle périphérique à l'acide acétique et la méthode de Plantar test (méthode de Hargreaves).

10.1. Méthode périphérique de l'acide acétique

L'effet analgésique a été évalué suivant le nombre de contorsions abdominales induites par l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique suivant la méthode décrite par (Hernandez-Perez et Rabanal, 2002). Une heure et demi après l'application cutanée de la crème à base de *S. vulgaris* aux doses de 10 et 20%, le diclofénac 1% et la base de crème neutre, l'acide acétique à 0,7% est injecté par voie intrapéritonéale (IP), à la dose de 10 ml/kg. Le nombre de contractions abdominales est évalué à partir de 5 minutes après l'injection de l'acide acétique, pendant 30 minutes (Hernandez-Perez et Rabanal, 2002).

10.2. Test plantaire ou méthode de Hargreaves

Nous avons utilisé le Plantar test (Ugo-Basile) pour évaluer la sensibilité nociceptive thermique (Hargreaves et al., 1988). Ce test explore l'activité analgésique des substances et utilise un stimulus thermique. Les animaux sont installés dans les cages 10 min avant le début du test, ceci consiste à stimuler la voûte plantaire de la patte postérieure du rat à l'aide du faisceau infrarouge et à déterminer le temps de latence (en secondes) du retrait de la patte. Le test est effectué trois fois sur chaque patte et la latence moyenne de retrait pour chaque patte est calculée (Figure 20).

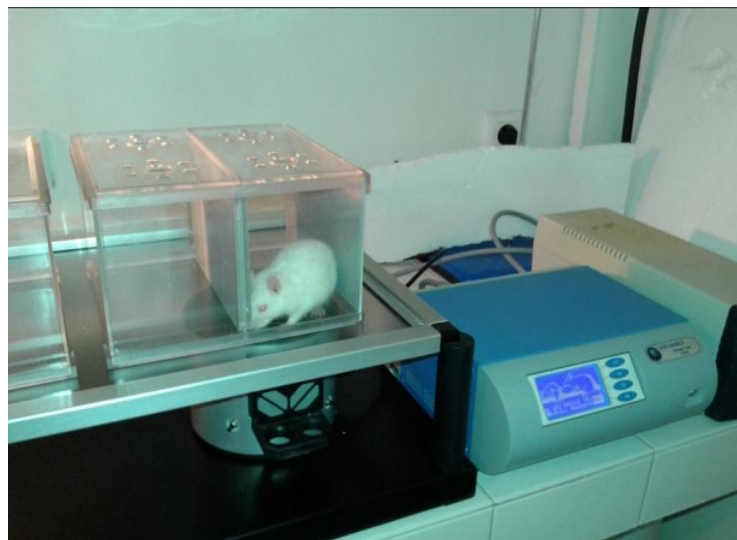


Figure 20. Plantar Test Ugo Basile

(Photo : S. Boukhira, laboratoire Toxicopharmacologie, INPMA)

11. Étude Toxicologique

11.1. Toxicité aiguë et DL50

L'étude de la toxicité aiguë fournit des informations sur les dangers susceptibles d'un produit sur la santé. Elle permet de relever les effets indésirables et les dangers immédiats suite à une prise unique du produit. La dose létale 50 (DL50) est la quantité de produit, exprimée en mg par kilogramme (mg/kg) de poids corporel (ou en mg/cm² de surface corporelle), qui provoque la mort de la moitié des animaux d'un lot homogène quant à la race, au sexe, à l'âge et au poids (Directives J.U.C.E, 1991). La DL50 est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'un produit, elle s'exprime en milligrammes de matière active par kilogramme d'animal; plus ce chiffre est faible, plus la substance est toxique. Ce test a concerné l'extrait hydro-éthanolique de *S. vulgaris* aux doses de 2000 mg/kg et 5000 mg/kg p.c administrées par voie orale et la crème formulée avec cet extrait à 20% par voie locale. Les animaux (5 par groupe) sont suivis pendant 14 jours pour d'éventuels effets indésirables ainsi pour surveiller une éventuelle mortalité.

Les signes de toxicité recherchés sont:

- Sur le plan expérimental : aspect général de l'animal, poids corporel, poids relatif des organes, comportement, somnolence, agitation, etc.
- Sur le plan biologique : paramètres biochimiques (hépatique, rénale, etc).

11.2. Toxicité cutanée subaiguë : Étude sur une durée de 28 jours

La toxicité à doses répétées correspond aux effets toxiques généraux résultant de l'exposition journalière répétée à une substance sur une durée spécifique. Il peut s'agir d'effets sur le poids ou le gain de poids corporel, sur le poids absolu et/ou relatif des organes et tissus, sur les paramètres urinaires et/ou biochimiques, sur les perturbations fonctionnelles des tissus et organes ou d'altérations pathologiques observables à l'examen macroscopique et microscopique. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence des effets qui nécessitent une longue période de latence ou des effets cumulatifs. Les tests de toxicité à doses répétées permettent également de déterminer les organes cibles et le caractère réversible des effets toxiques, ainsi que de définir la relation dose-réponse et le seuil pour chaque effet toxique observé (OCDE, 1981). Ce test a concerné la crème formulée avec l'extrait de *S. vulgaris* à 20% par voie locale. Les animaux (6 par groupe) sont suivis pendant 28 jours pour d'éventuels effets indésirables ainsi que pour surveiller une éventuelle mortalité.

11.3. Poids Relatif des Organes (ROW)

L'effet de l'administration, unique ou répétée des extraits par voie orale ou locale et leurs effets sur le poids corporel, le comportement, l'aspect et le poids relatif des organes, a été évalué chez les rats. Le poids relatif des organes (ROW) a été calculé par la formule suivante (Ramadan et al., 2012) :

$$\text{ROW} = (\text{poids de l'organe/poids corporel}) * 1000$$

11.4. Analyse des paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques concernant le dosage de quelques paramètres sériques en relation avec le métabolisme lipidique (triglycérides), le métabolisme glucidique (glucose), la fonction hépatique (transaminases et phosphatases alcalines) et la fonction rénale (urée et créatinine) sont déterminés par un automate (Olympus AU 640) piloté par un logiciel d'application. Les études des analyses biochimiques ont été effectuées au laboratoire de Biochimie au CHU Hassan II de Fès. Cette partie permet de rechercher d'éventuels effets toxiques des produits. Les paramètres biochimiques sériques sont analysés, à l'aide de kits de dosages standards commercialisés, par méthodes en cinétique enzymatique (ALT: Alanine aminotransférase, AST: Aspartate aminotransférase et AP : phosphatase alcaline), par méthodes enzymatiques en point final (cholestérol, triglycérides) et par la méthode de Jaffé en cinétique chimique (la créatinine).

11.5. Méthode d'essai sur œil de poulet isolé (OPI)

L'objectif du test OPI est de déterminer l'opacité et la perméabilité de la cornée de poulet suite à son traitement par l'extrait de *S. vulgaris*. Plus le produit est irritant et plus il va provoquer des modifications conduisant à une opacification et une diminution de l'épaisseur cornéenne (Igarashi et Northover, 1987). Il est décrit par la ligne directrice 438 de l'OCDE (OCDE 438). Ce test est réalisé à partir d'un œil de poulet fraîchement énucléé. Les globes oculaires sont obtenus à partir de poulets. Une solution saline est appliquée au goutte-à-goutte sur la cornée afin de la maintenir humide. Ensuite chaque œil est exposé dix secondes à l'extrait de *S. vulgaris* à 20%. L'opacité est ensuite relevée à divers temps de post-exposition : avant le traitement et 30, 75, 120, 180, et 240 minutes (\pm 5 minutes). La cornée est ensuite rincée et l'opacité est relevée. Pour chaque échantillon, on a réalisé trois expérimentations dont la moyenne est comparée à l'acide acétique 10%.

11.6. Innocuité cutanée (Patch test)

Le Patch test humain permet l'étude de la tolérance cutanée chez l'homme. Le test a été réalisé chez **23** personnes volontaires (20 femmes et 3 hommes) leur âge varie de 19-52 ans par application topique de la crème formulée à base de *S. vulgaris* à 20% sous patch au niveau du pli du coude. Les tests sont lus à 24 h, 48 h et 96 h pour évaluer la présence d'éventuelles réactions cutanées au retrait du patch. La première lecture est réalisée, 30 min après le retrait du patch test (Seo et al., 2002).

Les résultats sont rapportés selon les critères établis par « International Contact Dermatitis Research Group » (ICDRG) suivant :

- - : négatif; absence de réaction
- + : réaction positive faible; érythème
- ++ : réaction fortement positive; érythème, œdème et vésicules bien visibles
- +++ : réaction violemment positive et vésicules bien visibles
- IR : irritant

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I

**ÉTUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DE
CERTAINES PLANTES MÉDICINALES RÉPUTES
ANTISEPTIQUES DANS LA REGION DE SEFROU**

Introduction

Actuellement, dans certains pays en développement comme le Maroc, la médecine traditionnelle fait souvent appel à l'utilisation de plantes ou d'extraits végétaux pour lutter contre différentes pathologies. Dans le but de relever, d'identifier et documenter les plantes médicinales et antiseptiques utilisées dans le traitement des maladies dermatologiques et autre pathologies par la population locale de la région de Sefrou dans le Moyen Atlas du Maroc, une étude ethnopharmacologique a été réalisée dans cette région.

1. Enquête ethnopharmacologique

Le Tableau 7 donne les résultats de l'étude ethnopharmacologique des plantes utilisées dans la région de Sefrou et ses quatre communes d'Ait Taleb, Aghbalou Aqorar, Ain Smar et Bhalil.

Tableau 7. Liste de différents usages de plantes en médecine traditionnelle dans la région de Sefrou (Boukhira et al., 2013)

Famille, Espèces	Nom vernaculaire	PU	Processus de préparation/ Recette	Usage thérapeutique et cosmétique	FU (%)
Lamiaceae					8,14
<i>Teucrium polium</i> L.	Al'khiyyata	L	cicatrisation des plaies, abcès, furoncles, brûlures/ la poudre de feuilles est appliquée/Lo; BaBo: Mal aux dents, gingivitis.	blessures, Abcès, Furoncles, Brûle; gingivite, Mal aux dents	6.71
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Azîr	L	La poudre de feuilles est appliquée à sur la partie affectée; Decoction / Lo, se baigner jusqu'au rétablissement	abcès, Cicatrisation des plaies; alopecie	1.01
<i>Origanum compactum</i> Benth. <i>Origanum elongatum</i> Emb. Et Maire	Zaâtar	L	Pour l'eczéma, la poudre de feuilles est mélangée avec la poudre d'absinthe, le lawsonia et le sel meniral; Gar: ulcères, gingivite	Eczéma, furoncles, ulcères, gingivite.	0.67
<i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb.	Chendgûra	Pa	Broyé et appliqué; Cataplasme / Lo	Plaies, tumeurs de la peau, soins capillaires, antidiabétiques, A : nourriture	1.01
<i>Mentha pulegium</i> L.	Fliyyo, flayou	Pa	La décoction de <i>Mentha pulegium</i> et <i>Punica granatum</i> est mélangée à Lawsonia ; Poudre / Lo	eczema, grippe, rhume, toux	0.67
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Merrîwa	Pa	Broyé et appliqué; Cataplasme/ Lo, décoction pour usage externe; baignade	Furoncles, abcès, eczéma, Taches de peau, traitement capillaire, Antidiabétique, Maux de	1.68

				tête, Otite et collyre ophtalmique	
<i>Lavandula vera</i> DC.	khzâma	L, F	Broyé et appliqué; Cataplasme / Lo	Perte de cheveux, blessure, eczéma, abcès, lésion de teigne, décharge vaginale, rhumatisme	1.01
Asteraceae					10.34
<i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter	Tirhla, Magraman	L	Pour les brûlures, les plaies, les abcès, la poudre de feuilles est appliquée à l'extérieur	Abcès, brûlures, blessures, boutons	6.38
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Chiba, ch'hiba	Pa	Décoction pour usage externe	Ulcères cutanés	1.68
<i>Artemisia herba alba</i> Asso.	Achiḥ	L	L'infusion de Romarin est mélangée avec des poudres d' <i>Artemisia herba alba</i> , <i>Tetraclinis</i> , <i>Lawsonia</i> / Lo	Eczéma	1.01
<i>Tanacetum annuum</i> L.	Timarsad	L	Mélangé avec du henné pour le traitement de la migraine / Lo	Traitement de l'herpès labial (boutons de lèvres), anti-migraine	0.34
<i>Chamaemelum fuscatum</i> . (Brot.) Vasc.	Babounej	Pa,	Decoction ou infusion/Lo	C: contre la perte de cheveux, colorants capillaires; M: irritation, apaisement, maux de dents, migraines, jaunisse	1.01
<i>Calendula officinalis</i> L.	L'jamra	F	Cataplasme / Lo Inf: vers intestinal, infection microbienne / Or	Abscès, blessures, brûlures, verrues, tâches cutanées, acné	1.01
<i>Centaurea cyanus</i> L.	Zrika, atout	F	60g / 1L d'eau bouillante pour 1/2h, eau florale pour le bain oculaire	Soins du cuir chevelu, infection des yeux	0.67
<i>Atractylis resinifera</i> L.	Addad	Rt	La poudre des racines est appliquée à l'extérieur.	Abcès cutané	0.34
<i>Cichorium intybus</i> L.	Bouâkad	Rt	500g de jus de racine frais / Utilisation externe; Se baigner 2 fois par jour.	Eczéma	1.34
Fabaceae					4.65
<i>Trigonella foenum- graecum</i> L.	L' alba	S	Mélangé avec du miel pour le visage / Lo; Mélangé à l'écorce grenade pour le traitement des cheveux / Lo	Peau du visage, traitement et coloration des cheveux	1.01
<i>Vicia faba</i> L.	L'foul	Fr	La poudre est mélangée avec la citronnelle et du miel / Lo	Peau visage «kelf»; A : nourriture.	0.67
<i>Retama sphaerocarpa</i> (Boiss.) L.	Retam, rt'em	L,F r	Poudre	Plaies, ulcérations cutanées, boutons	0.34

<i>Quercus suber</i> L.	El-ballût	L	Broyé et appliqué / Lo	cheveux	0.34
Cupressaceae					2.33
<i>Tetraclinis articulata</i> (Vahl) Mast.	l-arâar, âzuka	L	En tant que tonique pour cheveux, la poudre est mélangée avec des feuilles Lawsonia	Perte de cheveux, tonique capillaire; Ot: fumigation, bronzage	1.01
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Taqqa/ getran taqqa	Gou	Frottant la partie infectée avec l'ail et après un jour, elle est mélangée à taqqa.	Le psoriasis, l'eczéma, les plaies, la gale, l'alopecie, la teigne, la perte de cheveux, les cheveux secs. Gale des animaux	0.34
Apocynaceae					1.16
<i>Nerium oleander</i> L.	Defla	L	poudre dans l'huile végétale	C: contre la perte de cheveux; M: cancer de la peau, Galle	1.01
Myrtaceae					2.33
<i>Syzygium aromaticum</i> Merr. & L.M.Perry	Aoud anwar, qronfal	Fr	La poudre de Syzygium est mélangée au miel pour Vitiligo / Lo Mélangé avec du jaune d'oeuf et Cuminum / Lo	Vitiligo, analgésique dentaire	1.34
<i>Myrtus communis</i> L.	Rihane	L, Fr	Pour la perte de cheveux, un mélange avec <i>lawsonia inermis</i> est appliqué sur les cheveux.	L: soins ou perte capillaire; Fr: stomacométrique	1.01
Poaceae					2.33
<i>Arundo donax</i> L.	Laqsab, ghanime	Rh	Les cendres de rhizomes brûlés sont utilisées avec de l'huile d'olive / Lo L'arundo est rempli par les poudres de rosmarinus, Origanum, ajuga et nerium / Cataplasme pour les furoncles	Traitement capillaire, furoncles	0.34
<i>Cynodon dactylon</i> Pers.	Anjem	Rt, Rh	Inf: Le jus de rhizome est infusé dans de l'huile d'olive; Racine: Décoction / Oral	Eczéma, troubles de l'estomac	0.67
Apiaceae					6.98
<i>Magydaris panacifolia</i> (Vahl) Lange	F'rifra	Fr	Dec: soin des cheveux, la poudre est mélangée a d'autres plantes: myrthe, staphysaigre, rose, lavande, clou de girofle.	C: perte de cheveux; M: anémie, maux de tête	0.34
<i>Ammi majus</i> L.	Atrilâl, trilân	Fr	Les fruits en poudre ammi et le pyrethre afrique (2/3 ammi 1/3 de pyrethre) sont mélangés avec du miel, exposant le patient au soleil 1h-3h /	Vitiligo	0.34

			Lo, Or: ½-1c café en poudre de fruits		
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Kemmân, ikammen	Fr	Infusion ou bain: tonique pour nourrissons/ Lo; Ou: Pdr / Dec: Les maux d'estomac, les spasmes et les coliques.	Les maux d'estomac, les spasmes et les coliques.	0.67
<i>Daucus carota</i> L.	Khizzu	Rt	Jus de carottes utilisé dans les lotions; Comresse: traitement des brûlures.	Peau, brûlures, troubles de l'estomac	0.67
<i>Foeniculum vulgare</i> P. Mill.	An-nafaâ	Fr	Inf: collyre; Déc.: Gargarismes	Rops pour les yeux infectés, les soins de la bouche et la gorge; Spasmolytique, carminatif, diurétique, expectorant, digestif, galactogogue	0.34
<i>Helosciadum nodiflorum</i> Koch.	Ziyyâta	Pa	Cataplasme	Abcès gastrique; Affections intestinales lymphangites; Aliments	0.34
Rutaceae					4.65
<i>Citrus vulgaris</i> Risso.	Larenj	Pa	En tant que cosmétique et pour le soin du visage, les parties aériennes sont placées dans de l'eau tiède et le visage est exposé aux vapeurs.	Peau visage, traitement des abcès, alopecie, furoncles, vitiligo	0.34
<i>Ruta montana</i> L.	Al'fijel	PW , L	Dec : ApL: tumeurs de la peau; Pour le mal de tête, la feuille est appliquée à l'extérieur.	tumeurs de la peau, anti-émétique en pédiatrie	0.34
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f.	L'hamd	Fr	Mélangé avec du lait chaud	Antiseptique, hypotensive, antidiarrhéique, soignante amygdalite.	1.34
<i>Verbascum sinuatum</i>	Slah lendar	L	Cataplasme de feuilles fraîches bouillies dans du lait cinq minutes.	Psoriasis, ulcères, anti-hémorragique, mal de dents	0.34
Punicaceae					1.16
<i>Punica granatum</i> L.	Qchor' Arromman	BFr , L	La poudre est mélangée avec Lawsonia / Lo; infusion	Anti-ulcère, eczéma, soins capillaires, allergies, mal d'estomac, gros intestin; A : nourriture.	1.34
Rhamnaceae					1.16
<i>Ziziphus lotus</i> (L.) Lam.	Asadra, an'bag	L,St	Les feuilles séchées sont écrasées (mélangées avec du henné) / Lo; Comme astringent et antiseptique, décoction	traitement capillaire; Douleurs à l'estomac, calculs rénaux, maladies pulmonaires	0.34

Caryophyllaceae					3.49
<i>Satureja hochreutineri</i> Briq	Mentha ou Harast lahjar	Pa	Mélangé avec Lawsonia pour l'eczéma; La poudre est mélangée à l'huile d'olive / des taches de peau; Pour traiter les taches noires dans le visage, la partie aérienne en poudre est appliquée dans la partie affectée.	soins visage, boutons, eczéma, tache cutanée, dépuratif, analgésique néphrite	1.01
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke	Tighighacht	L	Poudre, cataplasme	Eczéma, psoriasis, plaies, prurit, nourriture	1.34
<i>Corrigiola telephiifolia</i> Pour.	Sargina	Rt	Décoction: lavage soin capillaire	Soin capillaire	0.34
Plantaginaceae					1.16
<i>Plantago major</i> L.	L-massassa	L	Cataplasme	Furoncles, abcès cutanés	7.05
Polygonaceae					1.16
<i>Rumex acetosa</i> L.	Al'hummidh a	L	Pour les infections cutanées, la perfusion est bu / Or	Infections cutanées	0.34
Cactaceae					1.16
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	Hindiya	Jus	Le jus est mélangé à Lawsonia pour l'eczéma et à la teigne; Broyé et le jus appliqué	Eczéma; alopecie, teigne, douleurs d'estomac	1.68
Lythraceae					1.16
<i>Lawsonia inermis</i> L.	L'hana	L	La poudre de feuilles est malaxée avec de l'eau et appliquée; En émétique, la poudre de feuilles mélangée au jus de citron vert est prise par voie orale.	Traitement de cheveux	5.03
Vitaceae					1.16
<i>Vitis vinifera</i> L.	Dalya, laâ' nab	L	Feuilles chauffées; Cataplasme / Lo	Contre les abcès, les furoncles, le gros intestin, l'anémie. A: nourriture.	0.67
Zygophyllaceae					2.33
<i>Peganum harmala</i> L.	L'harmal	S	Décoction de semences est mélangé à l'huile d'olive; Fung.	C: perte de cheveux; M: analgésique dentaire; Ot: contre les mauvais yeux	0.67
<i>Tetraena gaetula</i> (Emb. & Maire) Beier & Thulin	L'âagaya	Pa	Décoction / Lo or Or	M: maux d'estomac, fièvre, intestin grêle, boutons du visage.	0.34
Brassicaceae					2.33
<i>Lepidium sativum</i>	Hab r'chad	S	La poudre est mélangée avec Chebba, Aud nwar, Henné et malaxée au	Eczéma, ulcères cutanés et verrues; Les maux	1.01

			Vinaigre; Pour les ulcères cutanés et les verrues, appliquée à l'extérieur.	d'estomac, l'anémie	
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Kiss el raï	L	Décoction / Lo	Blessure	0.34
Malvaceae					1.16
<i>Malva neglecta</i> Wallr.	L'khebbiza/l-baqoula	L	Les feuilles sont chauffées dans l'huile et appliquées à la partie concernée.	M: Maturation des furoncles et abcès; A : nourriture; De: pastoralisme	0.67
Ranunculaceae					1.16
<i>Delphinium staphisagria</i> L.	H'bate rass	S	La décoction est utilisée à l'extérieur; Pour le mal de dents, la poudre de semence mélangée à de l'huile d'olive est appliquée dans la cavité dentaire.	Perte de cheveux, mal de dents	0.34
Alliaceae					5.81
<i>Allium sativum</i> L.	Touma	B	Des gousses d'ail fraîches sont utilisées extérieurement par frottement sur la partie affectée.	Traitement du styé «Chaïra», teigne, M: toux, cancer du sein. A: épices.	4.03
<i>Allium cepa</i> L.	Al'Bassla	B	Pour les abcès cutanés, l'ampoule est chauffé dans l'huile et appliquée à la partie touchée; Pour les infections oculaires, le jus est appliqué sur les yeux.	Les furoncles, les abcès cutanés, la tension artérielle, le cancer de la peau, la lèpre, les infections oculaires. A: nourriture.	2.01
<i>Aloe succotrina</i> Lam.	Sbar	Jus	Le jus est appliqué à l'extérieur (massage des seins).	Galactogogue	0.34
<i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. & Viv.	Berwâg	Rh	Le tubercule est coupé et des morceaux sont appliqués sur la partie affectée ou le tubercule se réchauffe dans l'huile et est appliqué sur la partie concernée.	Eczéma, psoriasis, vitiligo	6.04
<i>Urginea maritima</i> L.	Lbssil, Bsal Addib	B	Broyé et le jus appliqué avec Lawsonia; Cataplasme	Troubles cutanés, abcès, Alopécie, teigne; diurétiques féculaires, sédatifs et pour les hémorroïdes.	0.67
Rosaceae					4.65
<i>Rosa canina</i> L.	Lward	F	Decoction / Lo; Mélangé avec rihan, asenbal, zaâter, azzaz / AplCC	Laxatif, peau visage; chute de cheveux.	1.34
<i>Rosa damascena</i> Mill.	Al'Ward al'Baldi	F	Pour les soins capillaires et comme tonique pour cheveux, le mélange avec Lawsonia inermis, les graines <i>Ricinus communis</i> , <i>Tetraclinis articulata</i> et <i>Daphne gnidium</i> est appliqué à l'extérieur.	Soins capillaires, cosmétiques, peau visage	1.68

<i>Prunus armeniaca</i> L.	machmach	S	Pour les soins du visage, la trituration des graines est appliquée à l'extérieur.	Soins du visage, tâches de peau	0.34
<i>Prunus dulcis</i> Mill.	Louz	S	En tant que soin facial, la trituration des graines est appliquée à l'extérieur; En tant que tonique capillaire, l'huile de graine mélangée à de l'huile de graines de <i>Ricinus communis</i> est appliquée sur les cheveux.	Soins du visage, tonique des cheveux	0.67
Euphorbiaceae					3.49
<i>Ricinus communis</i> L.	l'kharwaâ	S, L	Huile de la semence / Lo; Infusion de feuilles / oral	C: perte de cheveux; M: rhumatisme, toux	1.34
<i>Euphorbia</i> ssp.	Lûbina	Lat	Onguent, maladies externes de la peau,	Maladies de la peau	0.34
<i>Euphorbia echinus</i>	ddaghmûs	ex Pa	Cataplasme; Jus utilisé	Eczéma, verrues, boutons, blessures, prurit	1.01
Jungladaceae					1.16
<i>Juglans regia</i> L.	Asswak	BR	La poudre est mélangée avec lawsonia et sel / Lo; BR: Pour les soins dentaires et la gingivite, la partie sèche est utilisée à l'extérieur.	Eczéma, soins dentaires, gingivite.	1.34
Papaveraceae					1.16
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Bellaâman	F	Infusion / Lo	Peau sèche, Conjonctivite, fièvre	0.34
Zingiberaceae					1.16
<i>Zingiber officinalis</i>	s'canj'bir	Rh	Poudre d'Origanum, jaune d'oeuf, citrus mélangé avec Zingiber / Lo	M: eczéma, toux, rhumatisme. A: épices.	0.67
Adiantaceae					1.16
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Qezbûr l-ma, rejjafa	Pa	Cataplasme / Lo; Pour les calculs du rein et du pancréas, la partie aérienne en poudre est mélangée au miel et prise par voie orale tous les matins.	Blessures, pierres du pancréas	0.34
Brachytheciaceae					1.16
<i>Homalothecium aureum</i>	Assenbal	Pa	Mélangé avec Lavande et Rose pour la préparation de "ghasûl"	Soin des cheveux	0.67
Cannabaceae					1.16
<i>Cannabis sativa</i> L.	Al'Kif	L, S	Les graines et les feuilles sont conservées dans de l'huile d'olive, ou ensuite utilisées comme friction pour cheveux.	Tonique capillaire, renforcement des cheveux	1.34
Moraceae					1.16
<i>Ficus carica</i> L.	Karmouss	Lat ex	Le latex est appliqué sur la partie concernée.	Ulcère cutané, piqûres d'insectes	0.34

				A: nourriture	
Solanaceae					2.33
<i>Hyosevanus muticus</i>	Gangit	S	Décoction / lavage des cheveux	Soins capillaires et renforcement	0.34
<i>Solanum nigrum</i> L.	Âneb Eddib	Fr	Broyé et appliqué à l'extérieur	Eczéma, brûlures	0.34
Thymelaeaceae					2.33
<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb.	Aoud Laqmari	St	La décoction est appliquée à l'extérieur.	Coloration des cheveux	0.34
<i>Daphne gnidium</i> L.	Lazzaz	L	La poudre est mélangée avec de la poudre de Lawsonia et l'eau est appliquée à l'extérieur	capillaire tonique	3.36
Agavaceae					1.16
<i>Agave sisalana</i> L.	Sabra	Jus	Le jus est mélangé avec Lawsonia en poudre / Lo	eczéma	1.68
Urticaceae					1.16
<i>Urtica membranacea</i> Poir.	Horriqa	L	Décoction / Or	Antiseptique, système respiratoire, rénale, système digestif	0.34
Fumariaceae					1.16
<i>Fumaria officinalis</i>	Khnnunet en-naâja, Buqûl as-sabiya	L	60 g de poudre bouillie dans 0,5 litre de lait et laisser Infusé / Lo	Eczéma, prurit, acné, gale	0.34
Compositae					1.16
<i>Anthemis</i> spp.	Nouar el-jana	F	Maceration / Lo, Or	Peau de visage, douleurs intestinales	0.34
Lauraceae					1.16
<i>Persea americana</i> Mill.	Avocat	Fr	Avocat est mélangé à de l'huile d'olive / Lo	C: soins capillaires.A : nourriture.	0.34
Fagaceae					1.16
<i>Quercus suber</i> L.	El-ballout	L	Broyé et appliqué à l'extérieur	Le renforcement des cheveux	0.34 1.16
Cyperaceae					1.16
<i>Scirpus holoscholenus</i> L.	Smar/Azlef	Rt	Broyé et appliqué à l'extérieur	Verrues, maladies de la peau. Ot: Production de tapis	0.34
Globulariaceae					1.16
<i>Globularia alypum</i> L.	Âin lerneb/	L	Séché et écrasé (mélangé avec du	Estomac, purgatif, carminatif, anti-	0.34

	Taselgha		miel) / D	rhumatisme, anxiolytique, anti- diabétique, analgésique de douleur menstruelle	
Tamaricaceae					2.33
<i>Tamarix articulata</i> Vahl	AÄrich	L	Décoction / Lo	Soins capillaires	0.34
<i>Phoenix dactylifera</i> L.	Tt' mer /Tini	S, Fr	Poudre / Lo	Soins oculaires (Khôl), Gerçure	0.34
Araliaceae					1.16
<i>Hedera helix</i> L.	Lwaya/ Imessasa		Broyé et appliqué à l'extérieur, cataplasme	Furoncles, abcès cutanés, utilisés dans le traitement des plaies	4.03

FU : Fréquence d'Utilisation en %; PU : Partie Utilisée ; L : Feuille, S : Grains ; Fr : Fruits ; Pa ; Partie aérienne ;
Lo : Locale ; D : Décoction ; Rt : Racine ; F : Fleurs ; B : Bulb ; Or : Orale ; St : Tige ; Lat : Latex ; Rh :
Rhizome ; BaBo : Bain bouche, A : nourriture ; M : Macérat ; C : Cataplasme.

1.1. Aspects ethnopharmacologiques

1.1.1. Parties utilisées

Une série d'enquêtes ethnopharmacologiques réalisées à l'aide d'un questionnaire, a permis de collecter un certain nombre d'informations. Les résultats de cette étude ont montré que le feuillage constitue la partie la plus utilisée avec un pourcentage de 44%, suivie des fruits et les parties aériennes (Figure 21). D'autres études ont montré que les feuilles sont les plus utilisées avec un pourcentage de 59,10% (Adjanohoun et Aké Assi, 1979) et un pourcentage de 64,49% qui a été signalé dans l'étude de (Zirihi, 1991). La fréquence d'utilisation élevée des feuilles, pourrait être expliquée par le fait qu'elles sont le site de la photosynthèse et parfois du stockage des principaux métabolites secondaires responsables des propriétés biologiques de la plante (Bigendako-Polygenis et Lejoly, 1990).

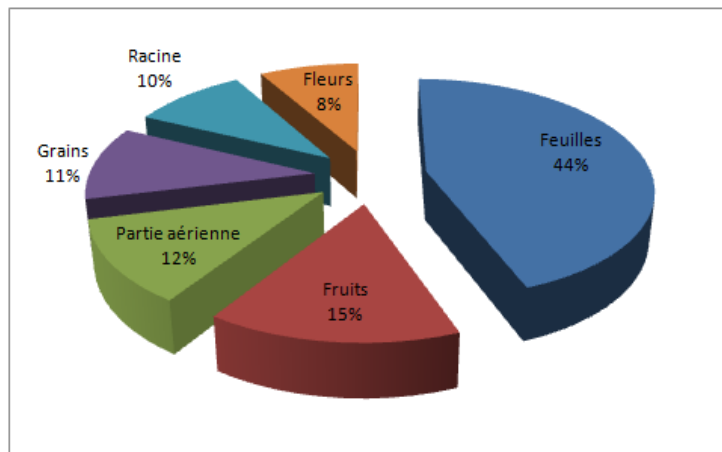


Figure 21. Parties utilisées des plantes

1.1.2. Usage des plantes médicinales selon le profil des enquêtés

Les résultats obtenus montrent effectivement que les personnes qui appartiennent à la classe d'âge de 31 à 60 ans ont plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges (Figure 22). En effet, L'expérience accumulée avec l'âge constitue la principale source d'information à l'échelle locale au sujet de l'usage des plantes en médecine traditionnelle (Bouayyadi et al., 2015; Benkhnigue et al., 2011; Mehdioui et kahouadji, 2007). Dans les zones d'étude, la grande majorité des usagers des plantes médicinales sont analphabètes, avec un pourcentage de 58% (Figure 23). Ce pourcentage relativement élevé est en corrélation directe avec le niveau d'études de la population locale.

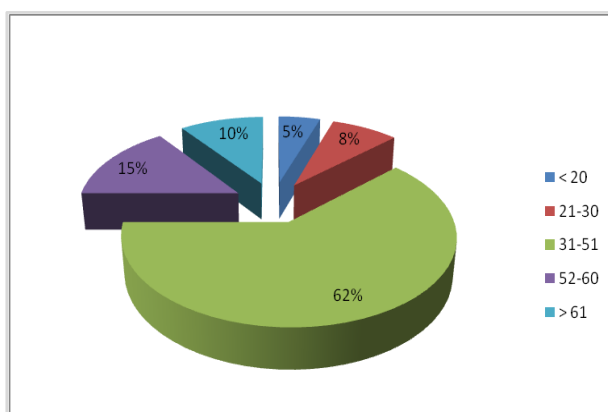


Figure 22. Fréquence d'utilisation des plantes par classes d'âge

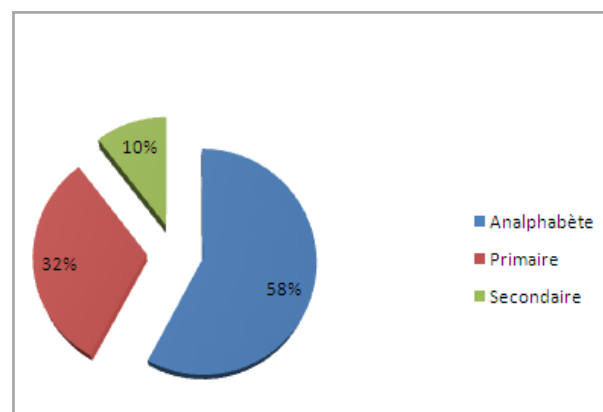


Figure 23. Fréquence d'utilisation des plantes selon le niveau d'étude

L'utilisation des plantes médicinales varie selon le sexe. Les femmes utilisent beaucoup plus les plantes médicinales que les hommes. En effet, 88% des femmes questionnées utilisent la médecine traditionnelle contre 12 % de la population masculine (Figure 24). Ceci peut être expliqué par l'utilisation des plantes médicinales par les femmes dans d'autres domaines que

la thérapie et par leur responsabilité en tant que mères, ce sont elles qui donnent les premiers soins en particulier pour leurs enfants. Ces résultats confirment d'autres travaux ethnobotaniques réalisés à l'échelle nationale (Bousta et al., 2014; Khabbach et al., 2012; Benkhniq et al., 2011; Mehdioui et kahouadji, 2007).

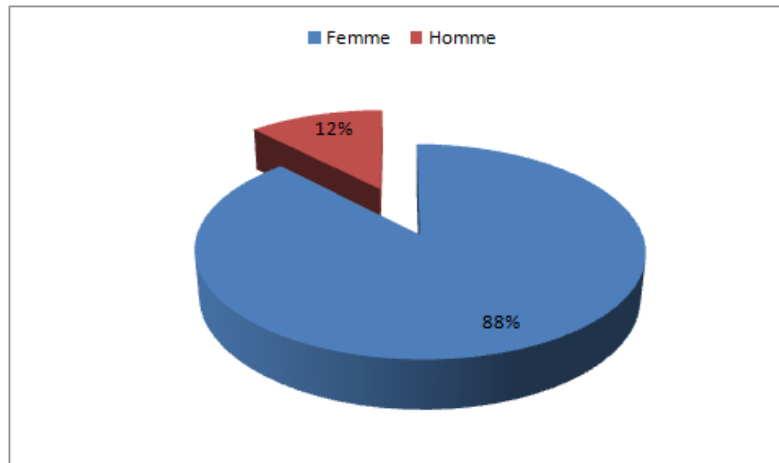


Figure 24. Pourcentage des femmes et des hommes utilisant les plantes

1.1.3. Mode de préparation et d'administration

Il est important de noter que les méthodes de préparation dépendent de la nature des métabolites et de la maladie à traiter. Dans la région d'étude, la majorité des remèdes est préparée sous forme de poudre (32%), de décoction (18%) et cataplasme (13%). Les méthodes d'administration externes, comme l'application topique ou le bain, étaient plus fréquentes (89.8%) que les méthodes internes (10.2%). Selon une étude réalisée par Rigat et al., (2007), 86,9% des personnes interrogées préparent les plantes par décoction que ce soit pour une utilisation interne ou externe.

1.1.4. Fréquence d'utilisation des plantes

Les résultats présentés dans la figure 25, montre que sur les 87 espèces rencontrées dans la région étudiée, 26 sont relativement plus utilisées que les autres espèces en phytothérapie traditionnelle par la population locale.

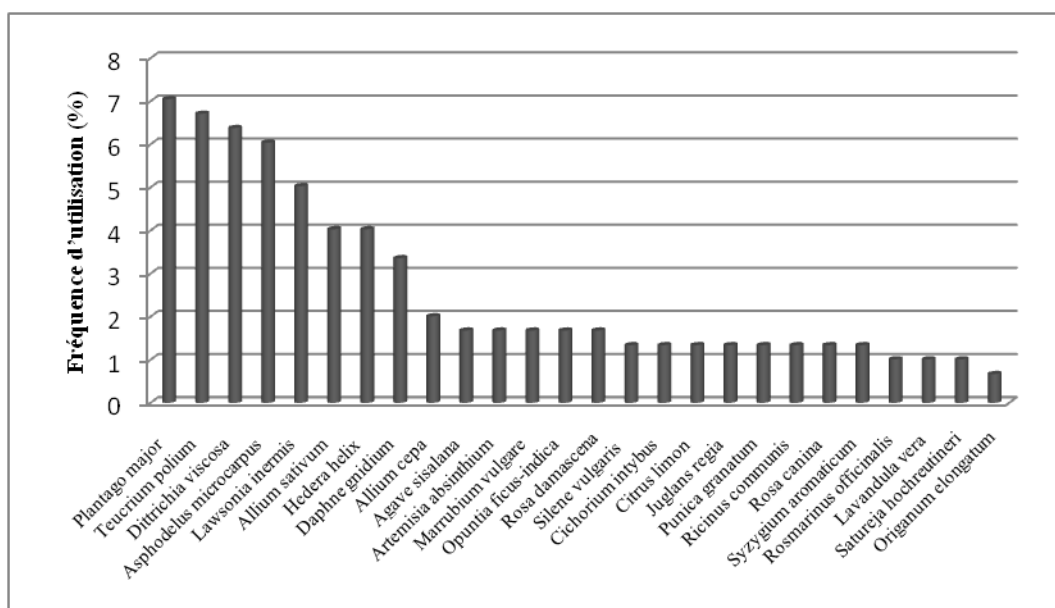


Figure 25. Fréquence d'utilisation des plantes en médecine traditionnelle dans la région de Sefrou

1.1.5. Domaines d'indications thérapeutiques

Les affections cutanées occupent la première place dans les maladies traitées par les plantes dans cette région avec un taux de 67.7%, suivies des troubles digestifs (8.16 %), affections ostéo-articulaires (4.49 %), affections urogénitales (3.27 %). En effet, les soins des cheveux (13.8 %) et l'eczéma (8 %) ont été parmi les troubles les plus fréquemment mentionnés. Suivie des abcès (5.5%) et les furoncles (4.08%) (Tableau 7). L'importance de chaque maladie a été déterminée par le nombre de citations faites par les informateurs. Ces plantes médicinales et cosmétiques peuvent servir à découvrir de nouveaux médicaments et agents antimicrobiens naturels et peuvent également être incorporées dans le système de santé du Maroc. Comparativement à la littérature, ces résultats confirment d'autres travaux où les pathologies les plus traitées sont les dermatoses et les problèmes digestifs (Kola'Kayode Ajibesin, 2012; Coelho de Souza et al., 2004; Hammiche et Gheyouche, 1988).

1.1.6. Choix des plantes retenues

A partir de l'étude ethnopharmacologique, quatre plantes ont été sélectionnées: *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, *Teucrium polium* L., *Satureja hochreutineri* Briq. et *Origanum elongatum* Emb. Et Maire. Ce choix a été basé sur:

- Leurs propriétés antiseptiques;
- Leur fréquence d'utilisation dans l'usage traditionnel de la région;
- Leur abondance;
- Leur originalité scientifique.

Conclusion

Le présent travail a été mené dans le but de réaliser un inventaire le plus complet possible des plantes médicinales utilisées dans la région de Sefrou et ses quatre communes de Ait Taleb, Aghbalou Aqorar, Ain Smar et Bhalil du Moyen Atlas et de réunir les informations concernant les usages traditionnelles et cosmétiques pratiqués dans cette région. Les enquêtes ethnopharmacologiques ont révélé une multitude de résultats sur l'utilisation des plantes médicinales, les parties utilisées, les modes de préparations ainsi que sur les maladies traitées et ont permis d'identifier 87 espèces. Les résultats obtenus montrent que parmi les 44 familles recensées, la famille des Asteraceae (10.4%) et Lamiaceae (8.14%), sont les plus représentées. De point de vue ethnomédicinal, le feuillage constitue la partie la plus utilisée, le cataplasme et la décoction sont les formes galéniques les plus pratiquées. De même, sur l'ensemble des maladies traitées, les affections dermatologiques (67.7%) représentent les maladies les plus citées. En outre, cette étude a permis d'apprécier et de connaître les pratiques traditionnelles utilisées par la population de cette région. Ces plantes médicinales et cosmétiques peuvent servir à découvrir de nouveaux médicaments, phytocosmétiques et agents antimicrobiens naturels et peuvent également être incorporées dans le système de santé du Maroc. Cet inventaire constitue aussi une base de données pour la valorisation des plantes médicinales en vue de découvrir de nouveaux principes actifs utilisables en pharmacologie.

CHAPITRE II

**ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE ET DEVELOPPEMENT DE
CONSERVATEURS NATURELS COMME
INGREDIENTS COSMETIQUES**

Introduction

La sécurité microbiologique des produits cosmétiques présente un intérêt très important pour les industries, en raison de la contamination microbiologique qui peut provoquer de grands changements sur la composition de ces produits. Afin de protéger le consommateur contre les infections microbiennes, prévenir l'altération microbiologique et prolonger la date d'expiration du produit, les agents conservateurs sont ajoutés. Cependant, ces conservateurs chimiques, posent beaucoup de problèmes pour une grande partie des consommateurs. En effet, le développement de conservateurs naturels fournit un moyen de substitution des conservateurs chimiques par des extraits végétaux dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques. Le but de cette étude est d'évaluer la capacité des extraits et des huiles essentielles à conserver la crème formulée dans notre laboratoire et ceci sur la base des résultats des activités antimicrobiennes obtenues de différentes plantes sélectionnées pour cette étude. La première démarche de cette étude, consiste à réaliser dans un premier temps un criblage phytochimique de l'extrait hydroéthanolique de *Silene vulgaris* et le dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes, catéchines, tanins, ortho-diphénols et saponines. Par ailleurs, des analyses chimiques de l'extrait de *S. vulgaris* et des HE par application des techniques chromatographiques, analyse par chromatographie liquide haute Performance (HPLC) et analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC/MS) ont été également réalisées.

1. Étude microscopique

L'évaluation microscopique contribue principalement à l'identification et la caractérisation des plantes, à la confirmation de la pureté des médicaments bruts et à la détection de contaminations et/ou d'altérations. L'étude microscopique en poudre des feuilles de *S. vulgaris* montre la présence de stomates diacytiques et de cristaux d'oxalate de calcium de grande taille (Figure 26). Cependant, nous n'avons pas noté de poils sécrétoires dans cette plante.

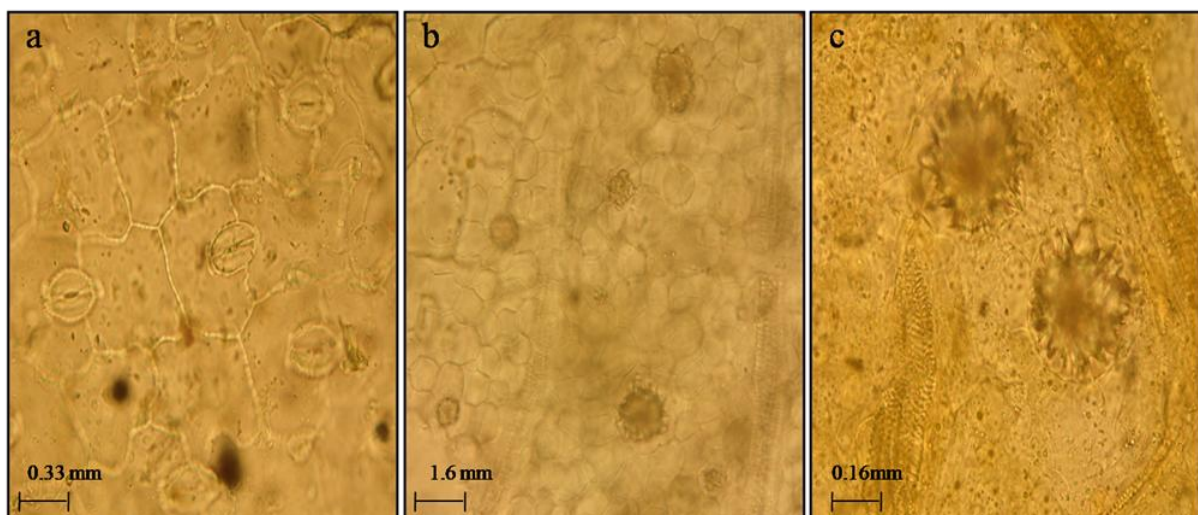


Figure 26. Etude microscopique de la poudre de *Silene vulgaris*: a: Épiderme avec stomate diacytique ($\times 400$), b: cristaux jumeaux ($\times 100$), c: cristaux d'oxalate de calcium de grande taille incluant les vaisseaux ($\times 400$)

2. Rendement des extractions

Les rendements des composés bioactifs sont présentés dans le Tableau 8. Ils sont exprimés par rapport au poids sec de la plante. Ainsi, Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, la nature et les caractéristiques physico-chimiques des solvants dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites, la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Lee et al., 2003).

Dans cette étude, la technique d'extraction végétale par Ultrasons est utilisée pour extraire les principes actifs de *S. vulgaris*. L'extraction est une étape importante impliquée dans la découverte de composés bioactifs à partir de matières végétales. Des études récentes ont montré que l'extraction assistée par sonication améliore l'efficacité d'extraction en réalisant un rendement plus élevé de métabolites secondaires des plantes, à un temps de traitement réduit, une moindre consommation de solvant et à une température inférieure (Huang et al., 2009; Wu et al., 2001). Toutes ces caractéristiques font de la sonication une technique attrayante pour l'extraction des composés bioactifs (Lee et al., 2002).

Le rendement des huiles essentielles représente le premier signe de variation entre les HE sauvages et cultivées. Une étude réalisée par El Bouzidi et al., (2013) montrent que la culture conventionnelle n'a pas grandement affecté la production d'huile essentielle. En effet, les rendements des HE quantifiés par hydrodistillation de la partie aérienne de *T. broussonetii*

d'Essaouira et *T. satureioides* d'Idni étaient de 1.64% et 1.86% pour les plantes sauvages et 1.78% et 1.99% pour les plantes cultivées, respectivement. On note que nos HE *T. broussonetii* et *T. satureioides* qui viennent de la culture *in vitro* présentent des rendements importants.

Tableau 8. Rendements des composés bioactifs

Echantillons		Rendement en %
Extrait brut		
<i>Silene vulgaris</i>	sauvage	17
Huiles essentielles		
<i>Origanum elongatum</i>	cultivé	1.51
<i>Teucrium polium</i>	sauvage	0.06
<i>Satureja hochreutineri</i>	sauvage	0.40
<i>Thymus broussonetii</i> Tb(7)	culture <i>in vitro</i>	2.05
<i>Thymus broussonetii</i> Tb(3)	culture <i>in vitro</i>	1.03
<i>Thymus satureioides</i>	culture <i>in vitro</i>	3.49
<i>Thymus zygis</i>	cultivé	0.61
	sauvage	0.70

3. Analyses phytochimiques

3.1. Caractérisation des molécules actives

L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence l'existence de flavonoïdes, des tanins catéchiques, des saponosides, des triterpénoïdes, des leucoanthocyanes, des glycosides cardiaques et des coumarines. Les résultats se sont révélés négatifs pour ce qui est des quinones, mucilages et alcaloïdes (Tableau 9).

Des travaux antérieurs sur les études chimiques du genre *Silene* ont démontré la présence des glycosides triterpéniques et phytoecdysteroids (Gaidi et al., 2002), des terpénoïdes, des benzénoïdes, des flavonoïdes (Darmograi, 1977), des anthocyanines (Dotterl et al., 2005), des acides gras (Kucukboyaci et al., 2010; Mamadalieva et al., 2010a; Mamadalieva et al., 2010b), des acides aminés (Terrab et al., 2007), des polysaccharides (Ovodova et al., 2000), des sucres (Mogosanu et al., 2011), des stérols, des vitamines et des acides organiques (Arnetoli et al., 2008; Eshmirzayeva et al., 2005).

De plus, les composés phénoliques, représentés majoritairement par les flavonoïdes et les tanins, suscitent actuellement un grand intérêt scientifique, car ils sont considérés comme de puissants antioxydants, antibactériens, antifongiques et anti-inflammatoires (Chen et al., 2008; Akindele et al., 2007; Bose et al., 2007). De ce fait, il nous a semblé intéressant de les quantifier dans l'extrait hydro-éthanolique de notre plante *S. vulgaris*.

Tableau 9. Criblage phytochimique de l'extrait hydro-éthanolique de *S. vulgaris*

Famille chimique	Réaction
Flavonoïdes (flavone)	+
Tanins	+
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	-
Triterpènes	+
Coumarines	+
Quinones	-
Leucoanthocyanes	+
Glycosides cardiaques	+
Mucilages	-
Saponines	+
Alcaloïdes	-

+ : présence ; - : Absence

3.2. Dosage des composés phénoliques

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, flavonoïdes, catéchins, O-diphénols, tanins et saponosides, sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage. Le dosage quantitatif des polyphénols totaux de l'extrait *S. vulgaris* a révélé une teneur en phénols totaux estimée à 3.35 ± 0.12 mg GAE /g (équivalent d'acide gallique). Les résultats relatifs aux flavonoïdes montrent que l'extrait contient des teneurs de 1.13 ± 0.01 mg EQ/g d'extrait (équivalent en Quercétine) qui sont nettement supérieures par rapport à d'autres composés. En effet, la teneur des catéchines est de l'ordre de 0.13 ± 0.01 mg exprimées en équivalent Catéchines (EC) par g d'extrait, celle des O-diphénols 0.12 ± 0.02 (mg EC/g d'extrait), tanins 0.28 ± 0.01 (mg acide tanique /g d'extrait) et saponosides 0.01 ± 0.13 (mg acide oléanolique/g d'extrait).

Une étude réalisée par Gatto et al., (2011) sur l'extrait méthanolique de *S. vulgaris* de l'Italie a révélé la présence de polyphénols à un taux de 9.92 ± 82 mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait. De même, en 2006 Pourmorad et al., ont révélé des teneurs en flavonoïdes de 5.64 ± 0.49 mg EQ/ g d'extrait pour *S. swertiifolia*, une autre espèce de *Silene* qui était supérieur à notre extrait. Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques, la période de collecte ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions expérimentales notamment le type d'extraction.

Table 10. Teneurs en composés chimiques de l'extrait de *S. vulgaris*

Composés	Extrait
Polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)	3.35 ± 0.12
Flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)	1.13 ± 0.01
Catéchines (mg EC/g of extract)	0.13 ± 0.01
Tanins (mg EAT/g of extract)	0.28 ± 0.01
O-diphénols (mg EC/g of extract)	0.12 ± 0.02
Saponosides (mg EAO/g of extract)	0.01 ± 0.13

GAE : équivalent d'acide gallique; EC : équivalent en D-catéchine; EAT : équivalent en acide tanique; EAO : équivalent en acide oléanolique.

3.3. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

L'analyse de l'extrait hydro-éthanolique de *Silene vulgaris* a été réalisée dans le but d'une bonne identification des différents composés, de la plante. Le Tableau 11, reflète l'analyse qualitative par chromatographie (HPLC). Cette analyse confirme la présence des familles de polyphénols et les acides phénoliques révélés auparavant par des criblages phytochimiques (cf. les chromatogrammes sont regroupés dans l'Annexe N°1). Notons qu'au cours de nos analyses tous les composés n'ont pas été identifiés par manque des standards adéquats.

Les travaux de Gatto et al., (2011), ont identifié par RP-HPLC les composés phénoliques de *S. vulgaris* de l'Italie, notamment des dérivés de l'apigénine. En comparant nos résultats avec ces travaux, quelques nouveaux composés comme l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'épicatéchine et la lutéoline sont également identifiés dans notre plante.

Tableau 11. Analyse qualitative de l'extrait de *S. vulgaris* par HPLC

Nom du composé	Temps de rétention (min)
Acide Caféique	11.932
Acide p-Coumarique	14.683
Epicatechine	16.741
Lutéoline	22.907
Apigénine	34.605

3.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC/MS)

Pour l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de deux plantes, la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectrophotomètre de masse a été utilisée. La composition chimique de l'huile essentielle de *T. broussonetii* a révélé la présence de thymol (63.09%), de p-cymène (11%) et de γ -terpinène (8.99%) comme composants majoritaires (Tableau 12). Les résultats des analyses chimiques de l'huile essentielle d'*O. elongatum* ont montré que le carvacrol est le composé majoritaire (63.06%), suivi de deux hydrocarbures monoterpènes: γ -terpinène (15.99%) et p-cymène (9.51%) (Tableau 12). D'autres travaux ont également montré que cette huile est constituée majoritairement de carvacrol (62.8-79.2%), suivi du γ -terpinène (0.6-7.3%) et p-cymène (5.2-16.9%) (Benjilali et al., 1986).

La comparaison entre la composition chimique de l'huile essentielle de *T. broussonetii* provenant de la culture *in vitro* obtenue au niveau de Taounate avec d'autres régions a montré des différences qualitatives et quantitatives. Citant l'exemple des travaux de (El Bouzidi et al., 2013) qui ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *T. broussonetii* sauvage et cultivé et d'autres espèces de thym au niveau de la région d'Essaouira et Marrakech. Ces auteurs ont mis en évidence dix neuf composants avec une prévalence de carvacrol (43.4%) et thymol (12.3%) pour le sauvage et le carvacrol (60.8 %) et thymol (0.5 %) dans le cultivé. Une autre étude réalisée en 2010 au sud du Maroc (Tensift el Haouz) sur l'espèce *T. Broussonetii* Boiss., a montré que les composants majoritaires sont: p-cymène (21%); α -Pinène (11.8%); thymol (11.3%) et bornéol (16.5%) (Belaqziz et al., 2010). En outre, Tantaoui et al., (1992), a montré que l'élément majeur dans l'huile essentielle de *Thymus broussonetii* était le carvacrol (47.8%), accompagné de quantités considérables d'hydrocarbures.

Tableau 12. Analyse des compositions chimiques par CPG/SM des huiles essentielles

Peak N°	Composants	Pourcentage relatif des HE (%)	
		<i>T. broussonetii</i>	<i>O. elongatum</i>
1	5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	6.9	-
2	2-Heptene, 5-ethyl-2,4-dimethyl-	-	0.6
3	α -Pinene	1.08	0.8
4	3-Carene	0.88	1.71
5	Phenol, 2,3,6-trimethyl-	-	3.5
6	α -Thujene	1.80	-
7	α -Phellandrene	1.10	1.95
8	p-Cymene	11.0	9.51
9	γ-Terpinene	8.99	15.99
10	linalyl acetate	-	0.74
11	Terpinen-4-ol	1.21	-
12	Thymol	63.09	-
13	Carvacrol	-	63.06
14	Caryophyllene	0.88	1.94
15	Aromadendrene	2.85	-
Total identifié (%)		99.78	99.8
Monoterpènes oxygénés		18.18	20
Monoterpène hydrocarbures		54.55	50
Sesquiterpène hydrocarbures		18.18	10
Autres		9.09	20

A partir de ces résultats, nous avons constaté que la composition chimique de l'huile essentielle de *T. broussonetii* de la culture *in vitro* récoltée dans le jardin expérimental de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate, était différente de celles obtenues à partir de nombreuses expériences sur la même espèce cultivée et sauvage, avec une abondance du monoterpène oxygéné le thymol (63.09%).

Les différences obtenues entre les compositions chimiques de l'HE en terme qualitatif et quantitatif, dont la dominance du carvacrol dans certains travaux et l'absence de ce composé dans notre plante, pourrait être liée à la culture *in vitro* que la plante a subi, qui a

probablement modifié la composition chimique. En effet, les variations qualitatives et quantitatives rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles des espèces de thym, peuvent être dues aussi à certains facteurs écologiques (Horwath et al., 2008; Bertomeu et Arrillaga, 2007; Loziene et Venskutonis, 2005; Benjilali et al., 1987), à la partie de la plante utilisée (Cristina Figueiredo et al., 2001), au stade végétatif de la plante (Jordan et al., 2006) ou à des facteurs génétiques (Loziene et Venskutonis, 2005).

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des plantes étudiées

L'objectif de cette partie est d'évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne et de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* (Moench) Garcke et de huit huiles essentielles de plantes médicinales et aromatiques de la famille des Lamiacées, à savoir *Satureja hochreutineri* Briq., *Teucrium polium* L., *Thymus satureioides* Coss., *Thymus broussonetti* Boiss (deux génotypes de la culture *in vitro*), *Thymus zygis* L. (cultivé et sauvage) et *Origanum elongatum* Emb. Et Maire, provenant de plantes sauvages et cultivées au Maroc dans le but de rechercher des extraits végétaux qui peuvent être incorporés dans des formulations cosmétiques comme conservateurs antimicrobiens. Dans une première étape, l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* et les huiles essentielles ont été testés pour leurs activités antimicrobiennes sur cinq souches microbiennes *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* et *A. brasiliensis* contre lesquelles l'industrie cosmétique, doit obligatoirement lutter, conformément à la réglementation. Les résultats expriment l'efficacité inhibitrice de l'extrait et des huiles essentielles sur chaque souche en déterminant la concentration minimale inhibitrice de chacun.

4.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait *S. vulgaris*

Les concentrations minimales inhibitrices de l'extrait de *S. vulgaris* sur les cinq souches varient entre 0.31-10 %. Nous pouvons dire que la bactérie à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) est la plus sensible à l'extrait. En effet l'extrait montre une bonne activité vis-à-vis de *P.aeruginosa* avec une concentration minimale inhibitrice de 0.31% (Tableau 13). Le rapport CMB ou (CMF) /CMI nous a permis de déterminer les pouvoirs microbicide et microbiostatique de l'extrait étudié. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'extrait a un pouvoir microbiostatique, et quand il est inférieur ou égal à 4 l'extrait a un pouvoir microbicide (Derwich et al., 2010; Canillac et Mourey, 2001). Les résultats illustrés dans le Tableau 13, montrent que l'extrait de *S. vulgaris* présente un effet bactéricide et fongicide sur toutes les souches à l'exception de *A. brasiliensis* pour laquelle il a un effet fongistatique.

D'après les résultats des analyses phytochimiques, on note la présence des flavonoïdes épicatechine, apigénine et lutéoline, les acides phénoliques comme l'acide caféique et l'acide p-coumarique identifiés par HPLC et les tanins catéchiques, les saponosides, les leucoanthocyanes, les glycosides cardiaques et les coumarines. L'activité inhibitrice de l'extrait de *S. vulgaris* vis-à-vis des microorganismes étudiés est probablement liée à leur richesse en polyphénols et en acides phénoliques qui peuvent être qualifiés de molécules antimicrobiennes. En effet, Il a été rapporté que les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont possédé une activité antimicrobienne (Tim et al., 2005). Ainsi, de nombreuses études ont rapporté les activités antimicrobiennes des flavonoïdes (Haraguchi et al., 2000; Iinuma et al., 1994). Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupes phénoliques, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés comme de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams, 2000). L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie. De plus, une étude réalisée sur *Dianthus caryophyllus*, a montré l'efficacité des flavonoïdes, sur des souches fongiques (Galeotti et al., 2008).

Le mécanisme d'action de polyphénols est sans doute très complexe, parmi les hypothèses avancées, l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer et l'inhibition du métabolisme microbien (Mila et Scalbert, 1994).

L'effet antimicrobien de certaines espèces de *Silene* a été étudié par des travaux antérieurs (Mahesh et Satish, 2008; Borchardt et al., 2008, Bajpai et al., 2008; Ertürk et al., 2006). L'activité antimicrobienne de différents extraits du genre *Silene* contre des microorganismes pathogènes ont été étudiés (Mamadalieva et al., 2013). *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ont été inhibés par l'extrait méthanolique de *Silene wallichiana* (concentration minimale inhibitrice, MIC = 0.25%). Tandis que *Escherichia coli* a été inhibée avec une MIC = 0.125%. De plus, l'extrait butanolique de *S. wallichiana* a montré une activité contre les bactéries pathogènes *E. coli*, *P. agglomerans* et *P. aeruginosa*. Une autre étude montre que les extraits de chloroforme de *S. brachuica* et *S. viridiflora* ont inhibé la croissance du Gram-négatif *P. aeruginosa* (Mamadalieva et al., 2014). De plus, l'extrait de *S. wallichiana* et *S. guntensis* ont présenté une activité contre des bactéries pathogènes : *E. coli* et *P. aeruginosa* (Taskin et al., 2013; Mamadalieva et al., 2010).

Tableau 13. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentrations Minimales Microbicides (CMM) de l'extrait de *S. vulgaris*

Souches microbiennes	Extrait de <i>Silene vulgaris</i>	
	CMI ^a	CMM ^b
<i>S. aureus</i>	2.5	5.0
<i>E. coli</i>	2.5	5.0
<i>P. aeruginosa</i>	0.31	1.23
<i>C. albicans</i>	0.62	0.62
<i>A. brasiliensis</i>	10	>10

^a MIC, concentration minimale inhibitrice en %; ^b MMC, concentration Minimale Microbicide.

4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE

4.2.1. Méthodes de diffusion

Les essais ont été effectués en utilisant les méthodes de diffusion sur disque et puits. Nos résultats montrent que les huiles essentielles du genre thymus, *O. elongatum*, *S. hochreutineri* et *T. polium*, présentaient une activité antimicrobienne significative contre les cinq souches bactériennes et fongiques testées sauf *P. aeruginosa*, *E coli* et *A. brasiliensis* qui résistent aux deux huiles essentielles de *S. hochreutineri* et *T. polium*. Les zones d'inhibition variaient entre 7.00 - 48 mm (Tableau 14).

Les résultats de l'activité antifongique indiquent que les huiles essentielles de *Thymus satureioides*, *Thymus broussonetii*, *Thymus zygis* et l'huile essentielle d'*Origanum elongatum* ont une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne de *A. brasiliensis* exceptée *Satureja hochreutineri* et *Teucrium polium* (Tableau 14, Figure 27c).

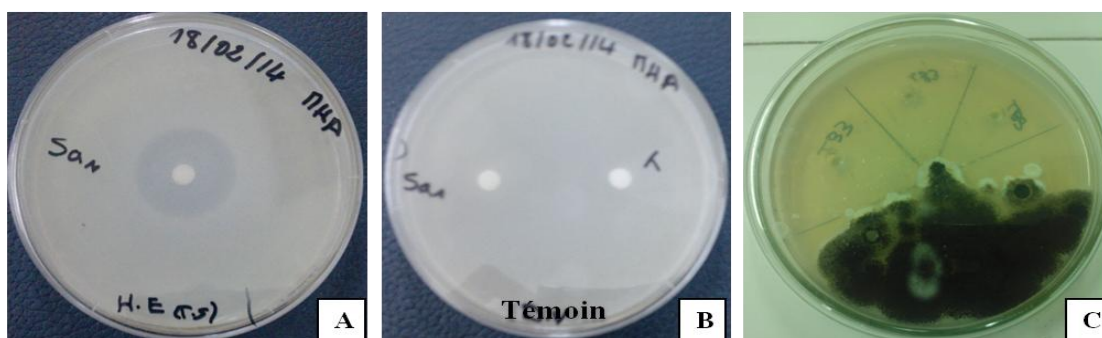


Figure 27. Zones d'inhibition de certaines huiles essentielles testées sur *S. aureus* (A) et *A. brasiliensis* (C) avec (B) le témoin

Tableau 14. Diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre du disque 6 mm) des huiles essentielles vis-à-vis des souches microbiennes

HE	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
	Souches bactériennes			Souches fongiques	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<i>Origanum elongatum</i>	35.67 ± 0.66***	26.33 ± 1.66***	9.33 ± 0.66***	33.67 ± 0.33	ZIN
<i>Thymus broussonetii</i> Tb(7) ^c	48,00± 1.15***	28.00± 1.15***	12.00 ± 1.15	42.33 ± 1.45	ZIN
<i>Thymus broussonetii</i> Tb(3) ^c	42.67 ± 1.45	29.33 ± 0.54	8.67 ± 1.20	35.67 ± 0.33	ZIN
<i>Thymus satureioides</i> ^c	34.67 ± 0.33	20.67 ± 0.27	7.00 ± 0.00	24.67 ± 0.67	ZIN
<i>Thymus zygis</i> ^a	37.33 ± 5.04	29.33 ± 1.44	10.00 ± 0.58	34.67 ± 0.33	ZIN
<i>Thymus zygis</i> ^b	46.33 ± 0.33	28.67 ± 2.60	10.00 ± 0.58	36.00 ± 0.58	ZIN
<i>Satureja hochreutineri</i>	12.67 ± 0.33	8.83 ± 0.14	-	11.67 ± 1.45	-
<i>Teucrium polium</i>	12.00 ± 0.00	-	-	10.33 ± 0.33	-
Chloramphenicol	19.00 ± 4.20	22.4 ± 9.10	10.00 ± 0.00	--	--
Streptomycine	12.67 ± 0.3	15.33 ± 0.3	21.66 ± 3.8	--	--

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± SEM, ZIN: zone d'inhibition non mesurable; -: pas d'activité; Contrôle positif: suspensions microbiennes et bouillon Mueller-Hinton ou Sabouraud Dextrose additionné d'agar (0,15% p/v); a: plante cultivée; b: plante sauvage; c: plante de la culture *in vitro*, génotype Tb3 et Tb7; Standard: streptomycine: 10 µg / ml et chloramphenicol 30µ / disque.

4.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Microbicide (CMM)

Les CMI des huiles essentielles ont été déterminées par la méthode de microdilution sur microplaques contre cinq micro-organismes, recommandés par la Pharmacopée Européenne, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Les résultats de cette étude ont révélé que ces huiles essentielles possèdent des propriétés antimicrobiennes intéressantes. Par conséquent, elles peuvent être utilisées comme une source potentielle d'actifs cosmétiques, particulièrement comme

conservateurs cosmétiques. Les analyses antimicrobiennes ont révélé que les huiles essentielles étaient plus efficaces contre les bactéries Gram-positives par rapport au Gram négatif. Les valeurs CMI des huiles essentielles contre les bactéries et les champignons variaient de 0.02 à 2% (Tableau 15).

Tableau 15. Détermination de la CMI des huiles essentielles étudiées

HE	MIC*				
	Souches bactériennes			Souches fongiques	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<i>Origanum elongatum</i>	0.03	0.03	0.5	0.02	0.02
<i>Thymus broussonetii</i> Tb(7) ^c	0.02	0.03	1.0	0.02	0.02
<i>Thymus broussonotii</i> Tb(3) ^c	0.02	0.125	2	ND	ND
<i>Thymus satureioides</i> ^c	0.06	1	2	0.06	0.125
<i>Thymus zygis</i> ^a	0.03	0.125	2	0.03	0.125
<i>Thymus zygis</i> ^b	0.06	0.06	2	0.02	0.06
<i>Satureja hochreutineri</i>	0.02	1	-	0.125	-
<i>Teucrium polium</i>	0.125	-	-	ND	-
Chloramphenicol	4.0	6.25	-	---	---
Streptomycin	4.0	8.00	32	---	---

*: % (v/v) pour les huiles essentielles et en µg/ml pour les antibiotiques ; -: pas d'activité; Contrôle négatif: les suspensions microbiennes plus le bouillon Mueller-Hinton pour les bactéries ou le bouillon Sabouraud Dextrose pour les champignons, additionnés d'agar (0,15% p/v); a: plante cultivée; b: plante sauvage; c: de la culture *in vitro*, génotype Tb3 et Tb7; ---: pas testé; MIC, concentration minimale inhibitrice.

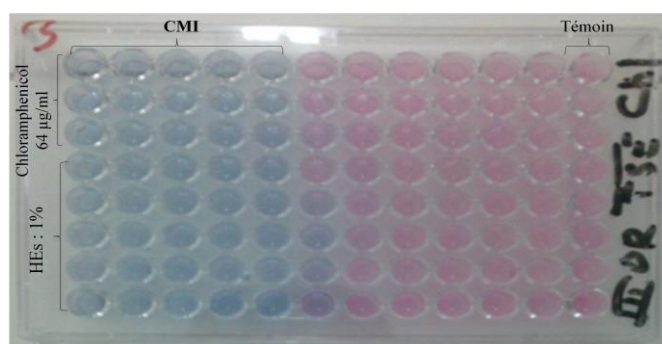


Figure 28. Essai de microdilution sur microplaque pour la détermination de la CMI

Les résultats illustrés dans le Tableau 16, montrent que 21 cases correspondent à un effet bactéricide et fongicide des HE (cases en caractère gras), les autres correspondent à un effet bactériostatique et fongistatique. Par conséquent, on peut constater que l'HE de *T. zygis* sauvage à un effet complètement microbicide sur les cinq microorganismes étudiés par rapport à la même espèce cultivée et les autres HE.

Les valeurs des concentrations minimales bactéricides et fongicides, CMB et CMF ont varié de 0.03 à 8% (Tableau 16). *Origanum elongatum* et *Thymus broussonetii* Tb(7) ont donné les valeurs des CMB et CMF, les plus intéressantes avec 0.03%. D'après les travaux antérieurs de (Derwich et al., 2010; Canillac et Mourey, 2001), les substances antimicrobiennes sont considérées comme des agents microbicides lorsque le rapport CMB ou CMF/CMI est inférieur ou égal à 4. On parlera d'agents microbiostatiques quand le rapport CMB ou CMF/CMI est supérieur à 4.

Tableau 16. Détermination de la CMB et CMF des huiles essentielles étudiées

HE	CMB et CMF* (%)				
	Souches bactériennes			Souches fongiques	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<i>Origanum elongatum</i>	0.125	0.03	0.5	0.03	0.125
<i>Thymus broussonetii</i> Tb(7) ^c	0.03	> 1	8	0.03	0.06
<i>Thymus broussonotii</i> Tb(3) ^c	0.06	0.125	>8	ND	ND
<i>Thymus satureioides</i> ^c	0.06	1	>8	0.125	0.125
<i>Thymus zygis</i> ^a	0.25	0.25	8	0.125	0.125
<i>Thymus zygis</i> ^b	0.06	0.06	8	0.06	0.06
<i>Satureja hochreutineri</i>	0.25	>1	-	0.5	-
<i>Teucrium polium</i>	>4	-	-	ND	-
Chloramphenicol	4.0	25	-	---	---
Streptomycin	4.0	64	32	---	---

*: % v/v pour les huiles essentielles et en µg/ml pour les antibiotiques ; -: pas d'activité; a: plante cultivée; b: plante sauvage; c: de la culture *in vitro*; ---: pas testé ; ND : n'est pas évalué ; CMB et CMF, concentration minimale bactéricide ou fongicide.

5. Formulation cosmétique et étude de stabilité

5.1. Formulation cosmétique

Afin de garantir la qualité d'un produit cosmétique et la sécurité du consommateur, il est nécessaire de réaliser régulièrement des contrôles microbiologiques de chaque lot de produit fini avant la commercialisation. Ces contrôles incluent généralement une détermination du nombre de germes dans le produit et le contrôle de sa conservation (test de l'efficacité de la conservation). Afin d'évaluer l'efficacité de la conservation de nos extraits, nous avons formulée une base de crème à base de la cire d'abeille et de l'huile végétale d'amande (Tableau 17).

Table 17. Composition et pH de la formulation étudiée par le biais du challenge test

	Crème	Proportion (%)
Phase huileuse	Cire d'abeille	22.0
	Huile d'amande	49.2
	Tween 80	0.80
Phase aqueuse	Water	q.s 100
pH de la crème	5.6	

5.2. Test de Stabilité

5.2.1. Stabilité physico-chimique et organoleptique

L'évaluation du pH est importante pour vérifier la stabilité d'une formulation. Nos résultats indiquent que les pH des formules, compris entre 5-6 sont voisins de celui de la peau humaine qui est typiquement compris entre 4,5 à 6,0 et le pH 5,5 est considéré comme un pH moyen de la peau. Par conséquent, la formulation destinée à être appliquée à la peau devrait avoir un pH proche de cette gamme. Dans cette étude, l'effet de l'extrait testé et de l'huile essentielle sur les caractères organoleptiques de la crème pendant la période d'essai a été surveillée sur la couleur, l'odeur et la texture. La stabilité organoleptique de la crème qui a été formulée au laboratoire au cours du temps est notable. En effet, il n'y avait aucun changement dans l'apparence des crèmes formulées telles que, la couleur "blanche" pour la formulation de

l'huile essentielle et "marron" pour la crème formulée avec l'extrait de *S. vulgaris*, ni dans l'odeur et la séparation des phases de la crème pendant 28 jours (Figure 29).



Figure 29. Crème contenant l'extrait de *S. vulgaris*

(Photo : S. Boukhira, Laboratoire Toxicopharmacologie, INPMA)

5.2.2. Stabilité microbiologique

Un produit cosmétique doit avoir une qualité microbiologique contrôlée de la phase de fabrication jusqu'à la dernière dose délivrée à l'utilisateur dans des conditions normales d'application pour assurer l'innocuité et la conservation des caractères organoleptiques du produit. La stabilité *in vitro* de la crème formulée a été étudiée à différentes températures de 37 ± 2 °C, 25 ± 2 °C et 4 ± 2 °C. Le contrôle microbiologique réalisé sur la crème conservée avec *S. vulgaris* indique une bonne qualité de la crème. En effet, le dénombrement de bactéries et des champignons ne dépassait pas 3 Log CFU/g à différentes températures de stockage 4°C, 25°C et 37°C, ceci est en accord avec les recommandations cosmétiques (SCCP, 2006) (Tableau 18). Ainsi, on note l'absence des microorganismes pathogènes suivants: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.

Tableau 18. Charge microbienne de la crème à base de *S. vulgaris* à 20%

Étapes	Durée de stockage	Nombre de microorganismes Log CFU/g					
		Bactéries			Levures et moisissures		
	Jours	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C
I	0	2.65			0		
II	5	2	2	2	0	0	0
III	14	2	2.3	2.6	0	0	0

6. Analyse des challenges test

La sécurité microbiologique des produits cosmétiques présente un intérêt très important pour les industries, en raison de la contamination microbiologique qui peut provoquer de grands changements sur la composition de ces produits. Les agents conservateurs sont ajoutés dans les produits pour prévenir l'altération microbiologique, prolonger la date d'expiration du produit et protéger le consommateur contre les infections. Dans cette étude trois extraits naturels dont l'extrait hydroéthanolique et deux huiles essentielles sont choisis pour évaluer leurs capacités à conserver le produit cosmétique formulé et ceci sur la base des résultats des activités antimicrobiennes obtenus. Notre choix a porté sur:

- L'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris*
- L'huile essentielle d'*Origanum elongatum*
- L'huile essentielle de *Thymus broussonetii*

Les critères d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne et d'acceptation de la Pharmacopée Européenne (EP, 2005), sont présentés dans le Tableau 6 (Partie II), en terme de réduction logarithmique du nombre des microorganismes viables par rapport à la valeur de l'inoculum.

Pour les formulations destinées à une application locale, les critères A expriment l'efficacité recommandée à atteindre. Lorsque ces critères A ne peuvent être satisfaits, et dans des cas justifiés, par exemple une augmentation du risque de réactions indésirables, des critères minimums dits critères B doivent être remplis. Le challenge test est effectué sur les dix formulations suivantes:

- Crème + extrait de *S. vulgaris* aux concentrations 2%, 5%, 10% et 20%
- Crème + huile essentielle d'*Origanum elongatum* aux concentrations 0.5% et 2%
- Crème + huile essentielle de *Thymus broussonetii* aux concentrations 1% et 2%
- Crème + Phénoxyéthanol à 1%
- Crème témoin (crème neutre)

6.1. Effet conservateur de l'extrait de *S. vulgaris* incorporé dans la crème formulée

La Figure 30, résume les essais d'incorporation de l'extrait de *S. vulgaris* à différentes concentrations 2%, 5%, 10% et 20% afin d'évaluer l'efficacité antimicrobienne de l'extrait dans la crème. Ce test a été réalisé selon la procédure standard proposée par la Pharmacopée Européenne, en utilisant des souches de référence: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213,

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Les résultats du challenge test ont démontré que l'extrait de *S. vulgaris* à 10% et 20% (p/p), incorporé dans la crème réduisait les inoculations bactériennes avec un facteur de plus de 3 Log après 7 jours de conservation et permettait aussi une conservation similaire pendant 28 jours à celle de conservateur synthétique le phénoxyéthanol 1% (critère A de la Pharmacopée Européenne).

En ce qui concerne la souche de levure et de champignon, à la concentration 10% et 20% d'extrait, l'inoculum est réduit d'un facteur de 2 Log dès le 14^{ème} jour sans augmentation au 28^{ème} jour, ce qui satisfait le critère A. Les résultats obtenus avec l'extrait montrent aussi que les formulations répondent aux critères A contre *P. aeruginosa*, dès la concentration de 2% d'extrait, avec un effet bactéricide permanent qui est atteint lors du premier jour d'inoculation par rapport aux huiles essentielles; tandis que le contrôle négatif (crème sans conservateur) s'est avéré un bon substrat pour la multiplication des bactéries à Gram négatif et Gram positif au 28^{ème} jour.

Les travaux d'Ostrosky et al. (2011), ont montré que l'extrait de *Rubus rosaefolius* à la concentration de 0.2%, présente des propriétés conservatrices de leurs formulations (émulsion et gel), contre les bactéries et *C. albicans*, par contre il est inefficace sur *Aspergillus brasiliensis*. En revanche, en comparaison avec nos travaux la crème conservée avec l'extrait de *S. vulgaris* a montré une action antibactérienne et antifongique intéressante contre ce champignon qui satisfait le critère A de la Pharmacopée Européenne.

L'extrait de *S. vulgaris* a présenté une grande activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées avec un effet bactéricide contre *P. aureginosa* à partir de la concentration de 2% en comparaison au Phénoxyéthanol 1%. Cette activité pourrait être due à la présence des flavonoïdes comme l'épicatéchine, lutéoline et l'apigénine, des acides phénoliques comme l'acide p-coumarique et l'acide caféique, des tanins catéchiques, des coumarines et des saponosides. Le spectre d'activité du phénoxyéthanol est très large, mais il est particulièrement efficace vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, dont *Pseudomonas aeruginosa* (Kabara, 1984; CIR, 1990). Des études ont identifié le site d'action bactéricide du phénoxyéthanol, comme étant la membrane cellulaire, où il provoque une augmentation de la perméabilité aux ions potassium (Fitzgerald et al., 1992).

Selon des études antérieures, les polyphénols et les flavonoïdes ont suscité un intérêt considérable en raison de leur large spectre et de la diversité de leurs effets biologiques

(antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire, vasorelaxant, antiviral, anticancéreux, antimutagène) (Guo, 2011; Maimoona, 2011). En effet, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries comme par exemple *S. aureus* (Babayi et al., 2004), *E. coli* (Ulanowska et al., 2006). Les acides phénoliques possèdent des activités antivirale, antibactérienne et antifongique (Moreno et al., 2006; Brantner et al., 1996). Par ailleurs, les tanins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries responsables de différentes infections chez l'homme: *Escherichia coli* et *S.aureus* (Leitao et al., 2005; Sivakumaran, 2004; Latte et Kolodziej, 2001).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il y a: l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, l'équestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Harrar, 2012; Jungkind, 1995). L'efficacité optimale de l'extrait peut ne pas être due à un composé majoritaire, mais plutôt à une action synergique de différents composés (Essawi et Srour, 2000).

Oludemi et al. (2017) rapportent que les acides phénoliques comme par exemple les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés présentent des activités antimicrobiennes, antioxydantes, anti-collagénase, anti-inflammatoires et anti-tyrosinase, ainsi que des effets protecteurs ultraviolets (UV), ce qui suggère qu'ils peuvent être exploités comme agents anti-âge, anti-inflammatoire, et conservateur. L'analyse HPLC de notre extrait de *S. vulgaris* montre la présence de deux acides hydroxycinnamiques, l'acide p-coumarique et l'acide caféique.

L'acide p-coumarique est un acide phénolique dérivé de l'acide cinnamique synthétisé principalement à partir de la tyrosine et la phénylalanine. C'est un précurseur majeur dans la synthèse d'autres acides phénoliques, tels que les acides caféique, chlorogénique, rosmarinique et ferulique. Les études sur l'acide p-coumarique et ses formes conjuguées ont révélé des propriétés antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire (Pei et al., 2016). De plus, l'acide caféique est l'un des acides phénoliques les plus courants et possède des propriétés médicinales telles que antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antitumorales et antidiabétiques (Heleno et al., 2015; Yang et al., 2013).

Une autre étude a évalué les activités antioxydantes et antimicrobiennes des dérivés synthétisés des acides p-coumarique et caféique (Georgiev et al., 2013). Tous les composés testés ont montré une activité antioxydante à piéger les radicaux DPPH, ainsi que la capacité à

inhiber la peroxydation lipidique. Ainsi, ces composés ont montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*. Les propriétés biologiques multiples présentées par ces composés montrent qu'ils devraient être étudiés plus qu'au paravant comme ingrédients cosmétiques. En effet, la présence de ces deux acides phénoliques dans notre extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* jouent un rôle très important dans la propriété conservatrice de l'extrait incorporé dans la formulation de crème.

Le mécanisme de l'effet antimicrobien des acides phénoliques, tels que les acides caféiques et leurs dérivés peut être expliqué par la perturbation de la membrane cellulaire bactérienne et fongique, ce qui permet la fuite du contenu de la membrane cytoplasmique et enfin la mort cellulaire (Teodoro et al., 2015). D'autres travaux ont indiqué le potentiel anti-Candida des acides hydroxycinnamiques tels que l'acide caféique et l'acide p-coumarique (acide 4-hydroxycinnamique) (Martins et al., 2015). Ces auteurs ont signalé que le mécanisme d'action est lié à leur capacité à perturber la membrane cellulaire des champignons.

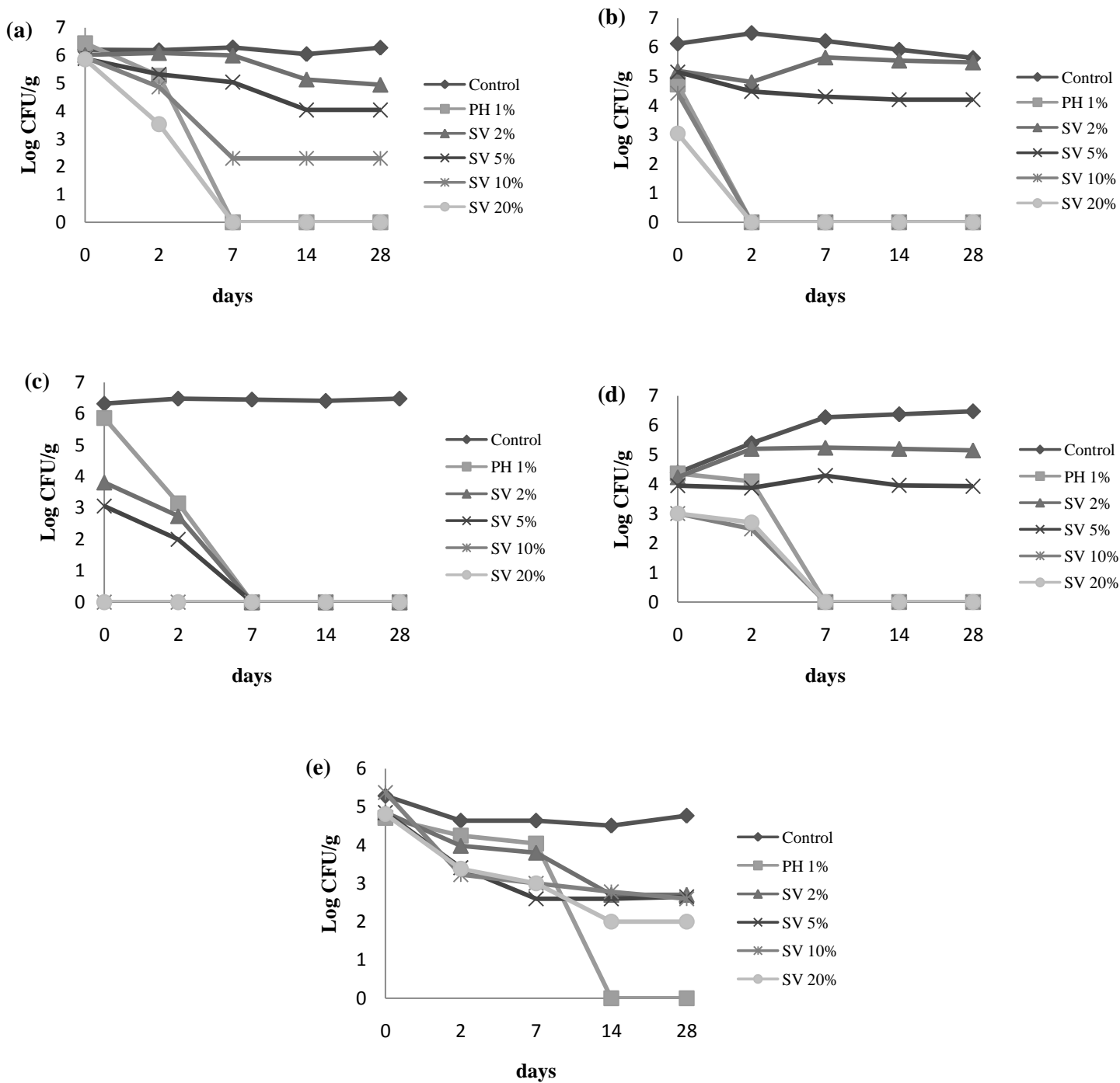


Figure 30. Réduction du Log CFU/g suite à l'incorporation de l'extrait de *S. vulgaris* dans la crème, mesurée lors du challenge test pour chacune des souches bactériennes et fongiques: (a) *S. aureus*, (b) *E. coli*, (c) *P. aeruginosa*, (d) *C. albicans* et (e) *A. brasiliensis*: SV 2%: Crème à base de *S. vulgaris* à 2% (w/w); SV 5%: Crème à base de *S. vulgaris* à 5% (w/w); SV 10%: Crème à base de *S. vulgaris* à 10% (w/w); SV 20%: Crème à base de *S. vulgaris* à 20% (w/w) PH 1%: Crème avec phénoxyéthanol 1%; Contrôle: base de crème neutre sans conservateur.

6.2. Pouvoir conservateur des HE incorporées dans la crème formulée

6.2.1. Huile essentielle d'*Origanum elongatum*

L'objectif de cette partie est d'évaluer l'efficacité conservatrice de l'huile essentielle d'*Origanum elongatum* dans une crème par le biais du challenge test. La partie aérienne d'*O. elongatum* a été hydrodistillée et l'huile essentielle a été analysée par GC-MS. En outre, un challenge test a été effectué sur la crème contenant l'huile essentielle aux concentrations 0.5% et 2% (v/p) contre cinq microorganismes de référence.

Les résultats du challenge test de la crème contenant l'huile essentielle d'*O. elongatum*, ont démontré que l'effet de conservation était efficace à une concentration de 2% d'HE dans la formulation, satisfaisant le critère A de la Pharmacopée Européenne contre *S. aureus*, *E. coli* et *A. brasiliensis*. Ainsi, l'huile essentielle à la concentration de 0.5%, réduisait l'inoculum microbien en satisfaisant le critère B contre *A. brasiliensis* avec une réduction de 1 Log. Cependant, l'huile essentielle était inefficace contre *P. aeruginosa* qui présentait une réduction de 1.85 Log dans les 14 jours du challenge sans augmentation jusqu'au 28^{ème} jour dans le challenge test. Les mesures concernant *C. albicans* montrent que la formulation ne permet pas une réduction suffisamment importante de ces micro-organismes après 14 jours de conservation pour être conforme à la réglementation (Figure 31).

Nous observons par ailleurs que la souche bactérienne qui se montre la plus résistante dans nos essais est *P. aeruginosa*. En effet, la complexité de la structure des membranes cellulaires des bactéries à Gram négatif les rend plus résistantes que celles à Gram positif et souvent difficiles à combattre. Nous savons néanmoins que cette bactérie, est résistante dans les produits cosmétiques et qu'il est fréquent que les nouveaux conservateurs soient moins actifs contre celui-ci (FIP, 1980; Anelich et Korsten, 1996).

Ce résultat peut surprendre car l'huile essentielle d'*O. elongatum* s'est montrée très active sur *P. aeruginosa* et *C. albicans* lors des tests microbiologiques avec une CMI de 0.5% et 0.02% respectivement. Les différences observées entre les résultats obtenus lors des essais antimicrobiens de l'huile essentielle et les challenge test peuvent être dues aux différences de conditions opératoires entre les essais.

Les interactions entre les tensioactifs et les nombreuses molécules présentes au sein des formules cosmétiques peuvent avoir un fort impact sur l'activité antimicrobienne des conservateurs évalués dans la crème formulée (Fernandez et al., 2012). Les tensioactifs non-

ioniques sont généralement utilisés en tant qu'agents solubilisants et émulsifiants. Leur potentiel antimicrobien dépend souvent de leur concentration. En effet, en deçà de leur Concentration Micellaire Critique (CMC), ils peuvent exercer une activité contre les microorganismes, alors qu'au-delà de cette valeur, ils risquent d'inhiber l'activité biocide, les agents antimicrobiens se retrouvant en partie encapsulés dans les micelles de tensioactifs (Kabara et al., 2006; Glover et al., 1999; Cozzoli, 1996). En effet, le faible effet antimicrobien de l'HE contre ces deux souches dans la crème peut être dû à l'effet antagoniste du tensioactif non ionique Tween-80. D'autre part, nous remarquons que le contrôle positif composé de la crème conservée avec le conservateur chimique "Phénoxyéthanol à 1%", satisfait le critère A de la Pharmacopée Européenne pour les cinq souches bactériennes et fongiques.

Les résultats de l'analyse de composés chimiques contenus dans l'huile essentielle d'*O. elongatum* par la chromatographie en phase gazeuse couplé au spectrophotomètre de masse GC-MS ont montré la dominance du carvacrol (63.06%), suivi de deux hydrocarbures monoterpènes: γ -terpinène (15.99%) et p-cymène (9.51%). D'après certains auteurs, la combinaison du carvacrol et le thymol, induit un effet additif contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Nazer et al., 2005; Lambert et Skandamis, 2001). En outre, les travaux de Ultee et al. (2000) ont noté un effet de synergie entre le carvacrol et son précurseur le p-cymène, lequel malgré sa faible activité antibactérienne, induisant un gonflement de la membrane cellulaire plus que le carvacrol seul ne le fait. En 2002, le même auteur principal approfondit le mécanisme d'action du carvacrol et a démontré que ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acide gras. Cette déformation structurelle augmente donc la fluidité membranaire affectant ainsi sa perméabilité.

Les bactéries exposées à cette molécule présentent une diminution de l'ATP intracellulaire et une diminution du potentiel membranaire (Yann-Olivier, 2015). La diminution de l'ATP intracellulaire est due en réalité à la fuite de protons, provoqués par le carvacrol qui induit la chute de la force protomotrice et donc la synthèse de l'ATP (Ultee et al., 2002). Il est aussi possible que le p-cymène contenu dans l'HE d'*O. elongatum* facilite l'entrée du carvacrol dans la cellule.

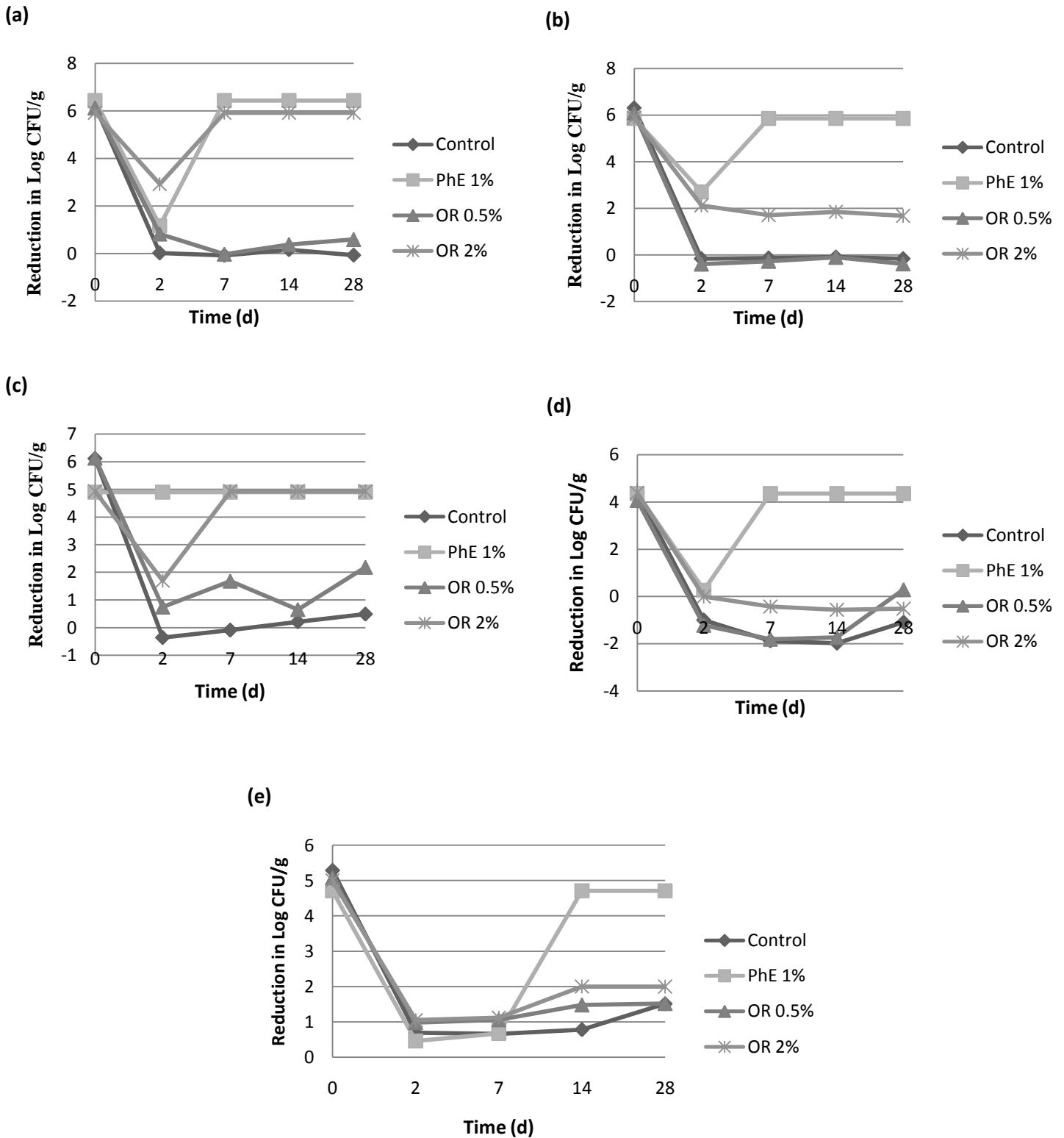


Figure 31. Réduction du Log CFU/g, mesurée lors du challenge test pour chacune des souches microbiennes, suite à l'utilisation de l'HE d'*Origanum elongatum* comme conservateur : (a) *S. aureus*, (b) *P. aeruginosa*, (c) *E. coli*, (d) *C. albicans*, (e) *A. brasiliensis*; OR 0.5%: crème avec 0.5% de l'HE d'*Origanum elongatum*, OR 2%: crème avec 2% de l'HE d'*Origanum elongatum*, PhE 1%: crème avec 1% de phénoxyéthanol; Contrôle: base de crème neutre sans conservateur.

6.2.2. Huile essentielle de *Thymus broussonetii*

Les résultats du challenge test ont clairement démontré que l'huile essentielle de la plante endémique Marocaine *Thymus broussonetii* Boiss., incorporée dans la crème formulée à une concentration de 2% (v/p), réduisait l'inoculum microbien en satisfaisant le critère A de la Pharmacopée Européenne contre *S. aureus*, *E. coli* et *A. brasiliensis*, avec une réduction de plus de 3 Log de *S. aureus* et *E. coli* dans les 7 jours du challenge sans augmentation jusqu'au 28^{ème} jour. Ensuite, nous notons une réduction de 2 Log de *A. brasiliensis* dans les 14 jours du challenge sans augmentation jusqu'au 28^{ème} jour dans le challenge test. Ainsi, l'huile essentielle aux concentrations de 1% et 2%, présente une conformité au critère B à 14 jours contre *A. brasiliensis* et *C. albicans* respectivement (Figure 33).

L'activité est un peu moins marquée contre *P. aeruginosa* puisque la réduction n'est pas suffisante à 14 jours pour respecter le critère B. En fait, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *P. aeruginosa* deviennent actives (Mann et al., 2000).

Les agents chélatants ont la capacité d'augmenter l'efficacité antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif. Ils sont particulièrement efficaces contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*. Les agents chélatants utilisés en industrie cosmétique sont, par exemple, l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique), le calcium disodium EDTA, l'acide citrique, le citrate de sodium, le citrate de potassium, le trisodium phosphate. Différents travaux ont montré le potentiel de l'EDTA pour avoir un effet synergique avec des conservateurs naturels tels que des huiles essentielles ou des extraits végétaux (Lambert et al., 2004; Xie et al., 2003; Alzoreky et al., 2003; Nastro et al., 2002; Kabara et al., 1996). En effet, nous proposons d'ajouter des agents chélatants naturels dans notre crème pour augmenter l'efficacité antimicrobienne contre *P. aeruginosa* Gram négatif.

Les résultats de l'analyse de composés chimiques contenus dans l'huile essentielle de *T. broussonetii* par la chromatographie en phase gazeuse couplé au spectrophotomètre de masse GC/MS, ont montré la dominance du thymol (63.09%), du p-cymène (11%) et de γ -terpinène (8.99%), comme composants principaux. L'importante bioactivité de l'huile essentielle est probablement en relation avec sa teneur élevée en thymol. Dorman et al., (2000), ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité

antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées. Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. En effet, le thymol semble capable d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert et al., 2001), en détruisant la membrane externe des bactéries. En plus, il augmenterait la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (Helander et al., 1998). D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure (Trombetta et al., 2005).

Manou et al., (1998), ont rapporté que l'HE de *Thymus vulgaris* à chemotype thymol à la concentration 3%, présente des propriétés conservatrices contre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *C. albicans* par rapport à *Aspergillus niger*. D'après nos travaux la crème conservée avec l'HE de *Thymus broussonetii* à la concentration de 2%, a montré une action antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli* et une action antifongique intéressante contre *A. brasiliensis* et *C. albicans*.

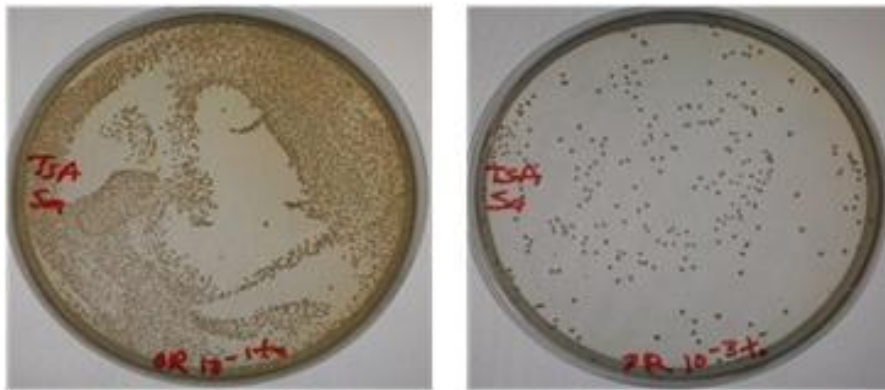


Figure 32. Illustration de quelques résultats obtenus pour le challenge test d'une HE vis-à-vis de *S. aureus*

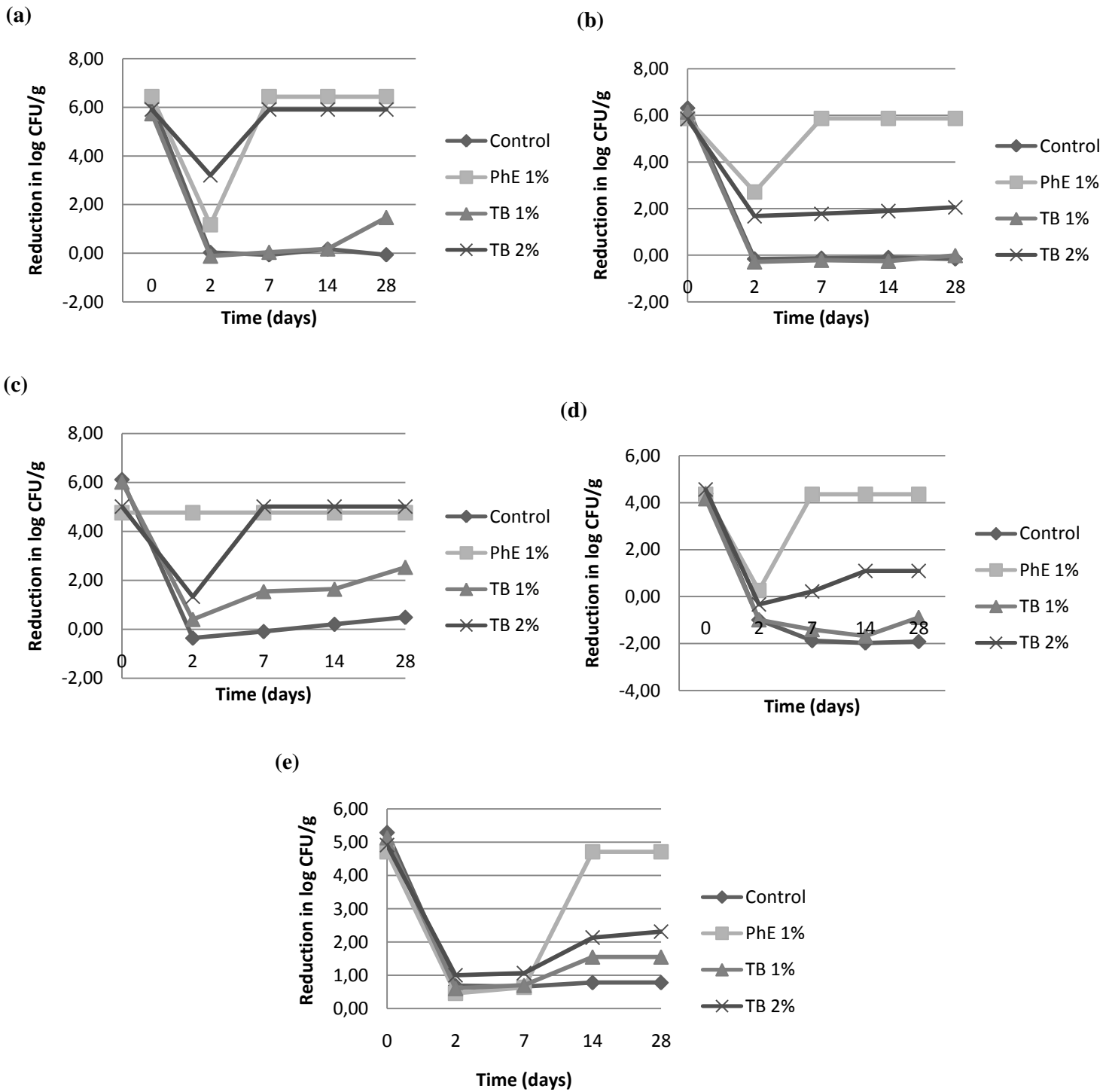


Figure 33. Réduction du Log CFU/g mesurée lors du challenge test pour chacune des souches microbiennes, suite à l'utilisation de l'HE de *Thymus broussonetii* comme conservateur : (a) *S. aureus*, (b) *P. aeruginosa*, (c) *E. coli*. (d) *C. albicans*, (e) *A. brasiliensis*; TB 1%: crème avec 1% de l'HE de *T. broussonetii*, TB 2%: crème avec 2% de l'HE de *T. broussonetii*, PhE 1%: crème avec 1% de phénoxyéthanol; Contrôle: base de crème neutre sans conservateur.

Conclusion

Le développement de conservateurs naturels fournit un moyen de substitution des conservateurs de synthèse par des extraits végétaux dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité de l'extrait de *Silene vulgaris* et des HE en tant que conservateurs naturels dans la crème formulée. L'activité antimicrobienne de l'extrait de *S. vulgaris* a été testée pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice. Ainsi la stabilité *in vitro* de la crème formulée a été étudiée à différentes températures de 4 °C, 25 °C et 37 °C. En outre, un challenge test a été réalisé sur la crème contenant l'extrait de *S. vulgaris* à différentes concentrations 2%, 5%, 10% et 20% afin d'évaluer l'efficacité conservatrice de l'extrait. Ce test a été réalisé selon la procédure standard proposée par la Pharmacopée Européenne, en utilisant des souches de référence: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Les concentrations minimales inhibitrices de l'extrait de *S. vulgaris* sur les cinq souches varient entre 0.31-10 %. En effet, l'extrait montre une bonne activité vis-à-vis de *P. aeruginosa* avec une concentration minimale inhibitrice de 0.31%. Les études phytochimiques de l'extrait de *S. vulgaris* ont montré la présence des composés phénoliques, essentiellement, les flavonoïdes (apigénine, épicatechine et lutéoline), les tanins, les acides phénoliques (acide p-coumarique et acide caféïque), les coumarines et les saponosides.

La stabilité physico-chimique et organoleptique de la crème formulée avec l'extrait de *S. vulgaris* s'est montrée au cours du temps stable. En effet, le contrôle microbiologique réalisé sur la crème conservée avec *S. vulgaris* indique une bonne qualité de la crème. De plus, le dénombrement des bactéries et des champignons ne dépassait pas 3 Log CFU/g à différentes températures de stockage 4°C, 25°C et 37°C.

Les résultats du challenge test ont démontré que l'extrait de *S. vulgaris* à 10% et 20% (p/p) incorporé dans la crème, réduisait les inoculations bactériennes et fongiques, selon le critère A de cette pharmacopée, avec une conservation similaire pendant 28 jours par rapport au conservateur synthétique (le phénoxyéthanol). Notre étude indique que l'extrait de *S. vulgaris* possède un pouvoir antimicrobien important et pourrait être considéré **comme un conservateur naturel alternatif** pour les formulations cosmétiques.

Les résultats de l'analyse de composés chimiques contenus dans les huiles essentielles d'*O. elongatum* et *T. broussonetii* par la GC/MS, ont montré la dominance de thymol pour l'HE de *T. broussonetti* et la carvacrol dans l'HE d'*O. elongatum*. Les analyses antimicrobiennes des HE ont révélé que les huiles essentielles étudiées étaient plus efficaces contre les bactéries Gram-positives par rapport aux Gram négatifs, les CMI des HE contre les bactéries et les champignons étaient de 0,02 à 2%.

Nos résultats de challenge test pour les HE avec les bactéries (*S. aureus*, *E. coli*) et *A. brasiliensis* dans la formulation de crème, indiquent que les deux huiles essentielles testées de *T. broussonetti* et *O. elongatum* à 2% présentent une activité conservatrice intéressante sur ces microorganismes en satisfaisant le critère A de la Pharmacopée Européenne. De plus, l'HE de *T. broussonetti* à 2% présente une conformité aux critères B à 14 jours contre *C. albicans* par rapport à l'HE d'*O. elongatum*. Cependant, les deux huiles essentielles *O. elongatum* et *T. broussonetti* étaient inefficaces contre *P. aeruginosa* qui présentait une réduction de 1.85 Log et 1.89 Log respectivement, dans les 14 jours du challenge sans augmentation jusqu'au 28^{ème} jour dans le challenge test.

Plusieurs études ont démontré l'activité antimicrobienne et antifongique de certaines familles de molécules que l'on retrouve en particulier dans les huiles essentielles, soit des molécules volatiles. Néanmoins, leur utilisation en tant que conservateur dans un produit cosmétique peut se montrer problématique si on augmente la concentration de ces HE dans le produit cosmétique. En effet, leur odeur marquée est parfois rédhibitoire pour une utilisation cosmétique, et la présence d'allergènes, sources de réactions cutanées, voire d'allergies de contact, souvent limitante. Aussi nous a-t-il semblé judicieux de concentrer nos travaux de recherche sur le potentiel antimicrobien d'extraits dont les familles de molécules non volatiles responsables de l'activité antimicrobienne auront été établies au préalable et de travailler à la formulation de ces extraits végétaux en tant que conservateur cosmétique. En effet, le peu d'études portant sur l'activité antimicrobienne d'extraits végétaux ne sont pas suffisamment approfondies pour proposer un conservateur efficace.

CHAPITRE III

ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'EXTRAIT DE

***SILENE VULGARIS* ET DES HUILES**

ESSENTIELLES

Introduction

Les produits cosmétiques tout comme les médicaments peuvent entraîner des effets indésirables et des réactions cutanées. Afin de répondre aux problèmes de santé liés à leurs effets indésirables, la deuxième approche de cette étude consiste à développer de potentiels conservateurs antimicrobiens avec des actions antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique. Dans ce chapitre, l'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par six techniques à savoir: le test au DPPH, la technique de décoloration du radical cation ABTS, la mesure du pouvoir réducteur du fer FRAP, le blanchissement au β -carotène, la méthode de piégeage du radical hydroxyle HRSA et la méthode du dommage de l'ADN. Jusqu'à présent, il n'y a pas de méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (Prior et al., 2005). Pour cette raison, nous avons pensé utile d'évaluer l'activité antioxydante en utilisant six techniques complémentaires.

1. Étude de l'activité antioxydante de l'extrait de *S. vulgaris*

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de l'extrait de *S. vulgaris* a été réalisée par cinq techniques chimiques à savoir: la méthode ABTS, la réduction de fer, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical hydroxyle et la méthode du dommage de l'ADN qui a été conduite pour évaluer le pouvoir de protection de l'extrait contre la dégradation de l'ADN.

1.1. Activité piègeur du radical cation ABTS^{•+}

La capacité de piégeage du radical cationique ABTS^{•+} de l'extrait de *S. vulgaris* est intéressante (28 μ M TEAC/g d'extrait). Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer ABTS^{•+}. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration donnée. Les valeurs obtenues avec le radical ABTS sont plus importantes que celles du radical DPPH et FRAP avec une IC50 de 2.05 mg/ml. Dans une étude réalisée par Dagdelen et al., (2014), l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *S. vulgaris* de Turquie, a été testée par la méthode d'ABTS (6.4 mg TEAC/g). Les résultats de cette étude, ont montré que l'extrait éthanolique possède une activité antioxydante élevée.

1.2. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* a été évaluée par son pouvoir inhibiteur du DPPH dans une solution méthanolique. La substance de référence était le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-2-carboxylique). La capacité de piégeage du radical libre DPPH est 10 μM TEAC/g d'extrait. Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle) donne naissance à un radical possédant une couleur violette en solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant. En effet, son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne de la disparition de la coloration violette. Ce changement de coloration est suivi par spectrométrie à 517 nm (Koleva et al., 2002; Acuna et al., 2002). La méthode est généralement standardisée par rapport au Trolox.

L'analyse HPLC de l'extrait de *S. vulgaris* montre la présence de deux acides hydroxycinnamiques, l'acide p-coumarique et l'acide caféique. D'après des études antérieures, ces deux composés ont montré une activité antioxydante à piéger les radicaux DPPH, ainsi que la capacité à inhiber la peroxydation lipidique (Georgiev et al., 2013). Ce qui laisse penser que ces deux composants sont responsables en partie de l'activité antioxydante de cet extrait.

1.3. Pouvoir réducteur du fer FRAP

C'est une analyse de l'activité antioxydante, qui est assez rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . D'ailleurs, la puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (Karagozler et al., 2008). La capacité de réduction du fer FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) pour l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* est 10 μM TEAC/g d'extrait.

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le Fe^{2+} à un pH faible forme un complexe avec la 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue, qui a une absorption maximale à 594 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité de l'extrait à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 594 nm du mélange réactionnel contenant l'extrait à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration

connue en Fe^{2+} (Pulido et al., 2000; Benzie et Strain, 1996). L'action antioxydante des polyphénols et flavonoïdes ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (Cotelle, 2001; Halliwell, 1994).

1.4. Piégeage du radical hydroxyle (HRSA)

La méthode du piégeage du radical hydroxyle a pour but de mesurer la capacité des antioxydants à inhiber l'oxydation du désoxyribose (Halliwell et al., 1987). L'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris*, présente une activité très intéressante à piéger les radicaux hydroxyles avec un pourcentage d'inhibition de 84.33%. Le radical hydroxyle est le plus connu par sa réactivité, sur les bio-macromolécules des cellules vivantes, et ces dommages biologiques caractérisés par sa capacité à stimuler la peroxydation des lipides, qui se produisent lors de l'attaque des phospholipides membranaires (Sangita et priyanka, 2012).

La capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton, en mesurant la génération du radical OH^{\cdot} , et son effet sur l'oxydation et la dégradation de molécules biologiques telles que le désoxyribose de l'ADN. Selon cette étude, on peut dire que notre plante *S. vulgaris* peut être considérée comme un bon piègeur de radicaux hydroxyles.

2. Inhibition des dommages à l'ADN

Les dommages liés à un stress oxydant se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN (Cooke et al., 2003; Marnett, 2000; Wiseman et Halliwell, 1996), des protéines (Davies 2003; Refsgaard et al., 2000; Farber et al., 1990), la perturbation de l'homéostasie du calcium intracellulaire (Farber et al., 1990) ou encore la peroxydation des lipides. Nos résultats sur les dommages de l'ADN de l'extrait de *Silene* montrent un effet partiellement protecteur contre la fragmentation de l'ADN (Figure 34).

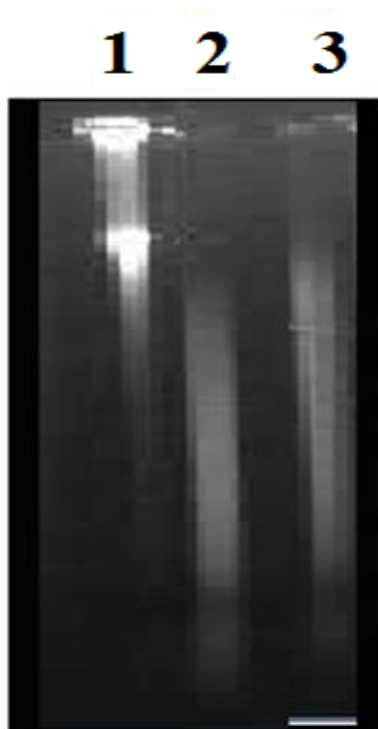


Figure 34. Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose d'ADN endommagé induite par Cu (II), acide ascorbique et effet de l'extrait *S. vulgaris*. Les colonnes numérotées représentent l'ADN seul (colonne 1), l'ADN exposé au Cu (II) et à l'acide ascorbique (colonne 2), l'ADN + Cu (II), l'acide ascorbique + 100 µl d'extrait (colonne 3).

Les résultats obtenus dans les analyses phytochimiques et l'essai d'identification des composés phénoliques par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), nous a permis de conclure que les composés polyphénoliques identifiés dans l'extrait de *S. vulgaris*, sont responsables de l'activité antioxydante et renforcent la capacité de cet extrait à céder un proton pour réduire le DPPH, le radical cation ABTS, le radical hydroxyle OH[•] et de libérer un électron pour réduire le fer. En effet, Montoro et al. (2006) ont suggéré que l'activité antioxydante des extraits d'une plante est en corrélation directe avec leur composition en polyphénols. Kang et al., (2003), ont montré aussi que les extraits végétaux, qui contiennent des molécules polaires, montrent une activité antiradicalaire élevée. D'autres études ont montré que les substances phénoliques, comme les flavonoïdes et les acides phénoliques, sont considérablement plus antioxydants que la vitamine C et la vitamine E (Cao et al., 1997; Vinson et al., 1995).

3. Activité antioxydante des huiles essentielles

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *Thymus broussonetti* (Tb7) et *Origanum elongatum* a été évaluée par les tests DPPH, FRAP et β carotène. Les résultats sont exprimés en IC50. La concentration inhibitrice à 50% ou IC50 est inversement lié à la capacité

antioxydante de l'huile essentielle, car il exprime la quantité d'antioxydants nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante est grande (Pokorny et al., 2001).

3.1. Piégeage du radical libre DPPH

En comparant les IC50 des deux huiles essentielles testées par rapport à celles des standards, BHT et Quercétine, nous avons remarqué une activité antioxydante élevée de l'huile essentielle d'*Origanum elongatum* (OR) avec une IC50 de l'ordre de $64 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ qui est supérieure à celle de l'huile essentielle de *Thymus broussonetii* (TB7) dont l'IC50 est de l'ordre de $210 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ (Figure 35).

Dans une étude réalisée sur trois espèces de thym sauvages et cultivés dont *T. broussonetii*, El Bouzidi et al., (2013), ont déterminé l'activité antioxydante de l'huile essentielle. Ce travail a montré que l'IC50 est de l'ordre de $132.23 \pm 3.09 \mu\text{g/ml}$ pour la plante sauvage et $145.83 \pm 3.47 \mu\text{g/mL}$ pour la plante cultivée. Ces valeurs sont relativement élevées par rapport à celles de notre huile essentielle. En effet, l'activité antioxydante des huiles essentielles de plusieurs espèces de *Thymus* a été rapportée précédemment (Tepe et al., 2005), et cette activité a été attribuée principalement à leurs contenus en composants phénoliques, en particulier le thymol et le carvacrol (Ruberto et Baratta, 2000). Malgré la teneur élevée du thymol dans notre huile essentielle *T. broussonetii*, cependant l'absence du carvacrol peut expliquer la faible activité antioxydante de cette dernière.

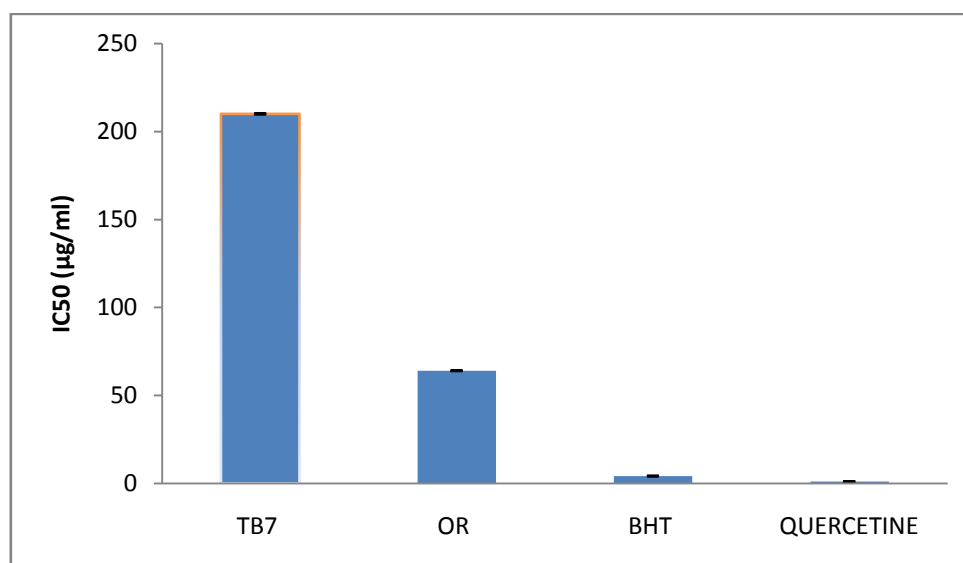


Figure 35. Activité antioxydante des HE évaluées par la méthode DPPH

3.2. Pouvoir réducteur du fer FRAP

L'huile essentielle d'*O. elongatum* (OR) a montré une activité antioxydante très intéressante avec une IC50 de l'ordre de $30 \pm 0,062 \mu\text{g/ml}$ par rapport à l'huile essentielle de *T. broussonetti* (TB7) avec une IC50 de l'ordre de $84 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ (Figure 36). Dans une étude antérieure, l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *T. broussonetti* cultivée et sauvage a été testée par la méthode de FRAP (El Bouzidi et al., 2013). Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de cette espèce possède une activité antioxydante importante en comparaison avec notre plante *T. broussonetti* provenant de la culture *in vitro*.

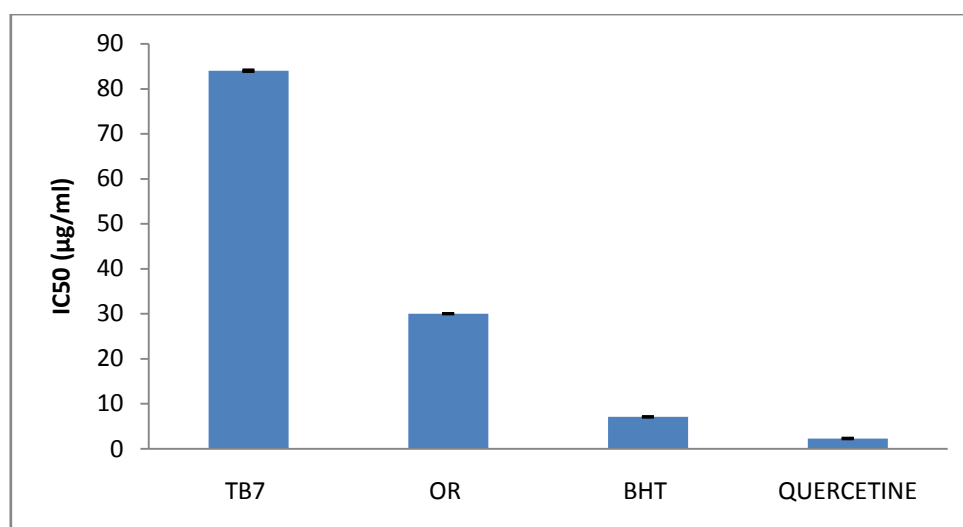


Figure 36. Activité antioxydante des HE évaluées par la méthode de FRAP

3.3. Méthode de décoloration du β -carotène

L'aptitude des huiles essentielles à inhiber la peroxydation des lipides a été évaluée par la technique de décoloration du β -carotène. En effet, toute substance chimique qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être considérée comme antioxydante (Liyana-Pathirana et al., 2006). Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle d'*O. elongatum* présente une activité antioxydante très élevée avec une IC50 de l'ordre de $41 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ par rapport à l'huile essentielle de *T. broussonetti* (IC50 est $145 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$), mais cette activité reste significativement inférieure à celle de la quercétine et du BHT qui sont utilisés comme témoins positifs. En effet, les HE, le BHT et la quercétine testés inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène.

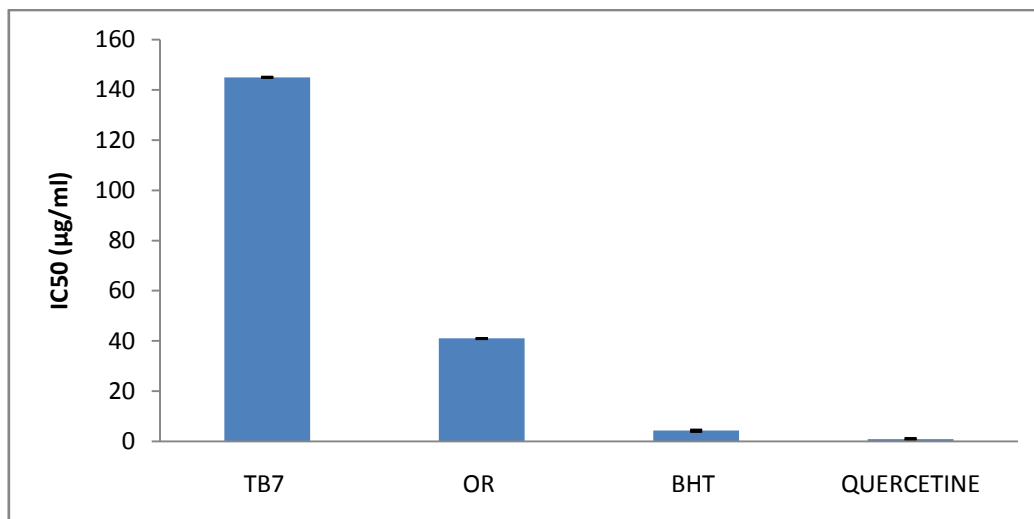


Figure 37. Activité antioxydante des HE évaluées par la méthode de β -carotène

Conclusion

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique de *Silene vulgaris* (Moench) Garcke et des HE. Six méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante à savoir: la méthode de réduction de radical libre DPPH, la technique de décoloration du radical cation ABTS, la mesure du pouvoir réducteur du fer FRAP, la méthode de décoloration du β -carotène, la méthode de piégeage du radical hydroxyle HRSA et l'effet protecteur des dommages de l'ADN. L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence l'existence de flavonoïdes, des acides phénoliques, de tanins, de saponines et les coumarines. De plus, l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *S. vulgaris* contient une teneur en polyphénols totaux estimée à 3.35 ± 0.12 mg GAE /g (équivalent en acide gallique). La capacité de piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer FRAP est intéressante $10 \mu\text{M TEAC/g}$. La valeur obtenue par le radical ABTS est plus importante que celle du radical DPPH et FRAP avec une capacité antioxydante de $28 \mu\text{M TEAC/g}$ d'extrait. L'extrait présente aussi une activité très intéressante à piéger le radical hydroxyle avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 84.33%. Les résultats des dommages de l'ADN montrent un effet partiellement protecteur contre la fragmentation de l'ADN. En outre, l'huile essentielle d'*O. elongatum* présente une activité antioxydante très élevée par les méthodes DPPH, FRAP et β -carotène avec une IC50 de l'ordre de 64 ± 0.08 , 30 ± 0.062 et $41 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ respectivement par rapport à l'huile essentielle de *T. broussonetti* (IC50 est 210 ± 0.3 , 84 ± 0.21 et $145 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$).

CHAPITRE IV

**ACTIVITES ANTI-INFLAMMATOIRE,
ANALGESIQUE ET ETUDES TOXICOLOGIQUES
DE LA CREME DE *SILENE VULGARIS***

Introduction

Plusieurs types d'effets indésirables peuvent être dus à l'utilisation d'un produit cosmétique. Il peut s'agir de phénomènes d'irritation, d'intolérance ou d'allergie se manifestant dès l'application d'un produit ou dans un délai relativement court, ou de toxicité s'évaluant à plus long terme. Ainsi que les infections microbiennes causant souvent des réactions inflammatoires et d'autres pathologies. En effet, la présente étude s'intéresse à l'évaluation des activités anti-inflammatoires et analgésiques d'une formulation de crème à base de *Silene vulgaris*. Le choix de cette plante de la famille des caryophyllaceae est basé sur une enquête ethnopharmacologique réalisée dans la région de Sefrou (Moyen Atlas-Maroc). L'activité anti-inflammatoire de *S. vulgaris* formulée dans une base de crème, a été évaluée sur deux modèles *in vivo*, l'inflammation aiguë par l'œdème induit par la carragénine et la méthode du granulôme au pellet de coton pour l'inflammation subaiguë aux doses 10% et 20%. De plus, L'activité analgésique a été quant à elle, évaluée sur deux modèles *in vivo* de douleur, un modèle périphérique à l'acide acétique et la méthode de Plantar test (méthode de Hargreaves).

La réalisation d'une étude toxicologique est une étape substantielle afin de cerner tout effet indésirable et de mieux comprendre les sites d'action des substances actives. En effet, la toxicité aiguë et subaiguë, ont été étudiées selon les guidelines de l'OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). Le comportement et le poids des animaux ont été observés après chaque traitement. Les paramètres biochimiques ont été mesurés. Ensuite, nous avons réalisé le test OPI comme méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'évaluation du potentiel irritant des produits cosmétiques. De plus, le Patch test a été évalué chez un groupe de volontaires pour déterminer l'innocuité et la tolérance cutanée de notre crème formulée à base de l'extrait de *S. vulgaris*.

1. Activité anti-inflammatoire

1.1. Méthode de l'œdème induite par la carragénine

La crème de *Silene vulgaris* à 20% a montré une inhibition significative de l'œdème de la patte du rat induit à la suite de l'injection de la carragénine avec une efficacité maximale à 5h et 6h et plus importante que le diclofenac (80.30, 85.71 et 65.52, 58.33%, respectivement) (Tableau 19). En effet, l'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale, qui dure environ une heure, est due à la

libération de l’histamine et de la sérotonine, alors que la bradykinine est libérée au cours de la deuxième phase (1.5–3 heures), et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure (Wantana et al., 2009). Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l’exsudat s’échappe de la circulation sanguine vers l’espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l’œdème localisé, qui, à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (Rousselet et al., 2005; Devulder et al., 2002). En tenant compte de ces indications, il a été proposé que l’effet observé puisse être dû à la capacité de l’extrait *S. vulgaris*, à inhiber la synthèse des prostaglandines par la voie de la cyclooxygénase.

Tableau 19. Activité anti-inflammatoire *in vivo* de la crème formulée à partir de *S. vulgaris*

Groupes	Dose (%)	S ₀	Temps après l’injection de la carragénine							
			3 h		4 h		5 h		6 h	
			S _{3h}	% I	S _{4h}	% I	S _{5h}	% I	S _{6h}	% I
Témoin	-	2.62 ± 0.06	2.86 ± 0.05	-	2.88 ± 0.05	-	2.91 ± 0.06	-	2.92 ± 0.05	-
Crème	10	2.83 ± 0.06*	3.14 ± 0.02***	29.17	2.98 ± 0.02	42.31	2.94 ± 0.02	62.07	2.98 ± 0.04	50.0
	20	2.44 ± 0.07	2.66 ± 0.08	10.71	2.56 ± 0.06***	56.04	2.50 ± 0.08***	80.30	2.49 ± 0.10**	85.71
Diclofenac	1	2.68 ± 0.06	2.95 ± 0.05	14.58	2.79 ± 0.07	56.73	2.78 ± 0.08	65.52	2.8 ± 0.07	58.33

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.E.M., n = 9 pour chaque groupe. *** p < 0.001. S = circonférence de l’œdème (cm). % I = pourcentage d’inhibition de l’œdème de la substance d’essai.

1.2. Méthode de Granulôme au pellet de coton

Les effets de la crème de *S. vulgaris* sur le granulôme au pellet de coton sont représentés sur les tableaux 20, 21. Une réduction significative du granulôme du coton a été notée dans le groupe traité avec la crème de *S. vulgaris* à 20% comparée au témoin (1.96 ± 0.04, 2.59 ± 0.2, respectivement). Cette inhibition est dose-dépendante. En effet, les résultats du Tableau 20 montrent une réduction significative de la masse transudative du granulôme chez les animaux traités au diclofénac à 1% et à la crème de *S. vulgaris* aux doses de 10% et 20%. Les valeurs obtenues sont de 163.4 ± 5.06 mg, 172.8 ± 19.53 mg et 159.25 ± 7.75 mg respectivement, par rapport au témoin négatif qui est la base de crème sans extrait (193.75 ± 6.93 mg). Cette diminution témoigne d’une inhibition de la réaction inflammatoire. En effet, nos résultats

montrent une inhibition de l'inflammation induite chez le rat de 8.11% à la dose de 10% et de 24.23% à la dose de 20% alors que le produit de référence inhibe l'inflammation à 22.39 %. La crème de *S. vulgaris* et le diclofénac inhibent significativement l'inflammation par rapport au témoin. Ce test fait intervenir la phase tardive et prolongée dominée par la prolifération des fibroblastes.

La réaction granulomateuse est caractérisée par la formation de cellules géantes multinucléées, ou cellules géantes à corps étranger (Woodward, 1999; Tizard, 1996; Cotran et al., 1994). Ces cellules proviennent d'une activation particulière des macrophages qui prennent une apparence épithélioïde et qui fusionnent entre eux le plus souvent. Ainsi, les pellets de coton implantés qui ont des propriétés antigéniques provoquent une réponse inflammatoire où les plasmocytes et lymphocytes prédominent (Woodward, 1999). La formation du granulôme est due à la difficulté de dégradation et de digestion du pellet de coton implanté par un macrophage. Des travaux antérieurs ont observés une accumulation de plasmocytes après implantation sous cutanée de différents biomatériaux chez le rat (Van Luyn et al., 2001).

Tableau 20. Effet anti-inflammatoire subaiguë de la crème de *S. vulgaris* en utilisant le test du granulôme au pellet de coton

Groupes	Dose (%)	Poids frais du granulôme (mg)	Poids sec du granulôme (mg)	Poids transudatif (mg)	Poids du granulôme (mg/mg coton)	IG (%)
Témoin	-	265.5 ± 10.17	71.75 ± 3.91	193.75 ± 6.93	2.59 ± 0.2	-
Crème	10	240.4 ± 21.93	67.6 ± 2.69	172.8 ± 19.53	2.38 ± 0.13	8.11
	20	218.5 ± 7.7*	59.25 ± 0.84**	159.25 ± 7.75*	1.96 ± 0.04**	24.23
Diclofenac	1	223,6 ± 7.82**	60.2 ± 4.73	163.4 ± 5.06**	2.01 ± 0.24	22.39

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.E.M., n = 7, Significativement différent du contrôle, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. IG = Inhibition du Granulôme.

Le thymus constitue un organe lymphoïde central dans la production du répertoire des lymphocytes T. D'après le Tableau 21, nous notons que le poids du thymus n'a pas changé pour la crème à base de *S. vulgaris* à 20% et le contrôle positif diclofénac 1% en comparaison au témoin, par contre, le poids du thymus est réduit dans la crème de *S. vulgaris* à la dose 10%. De plus on note un gain au niveau du poids des animaux pour les trois groupes. Des

études ont signalées que la croissance du poids du thymus et du poids corporel de l'animal est lié à une réponse immunitaire positive compte tenu de l'importance fonctionnelle du thymus pour la constitution d'un potentiel de défenses immunitaires efficaces et pour le développement de la mémoire antigénique (Pedernera et al., 2006; Theisen-Popp et Muller Psddinghaus, 1994).

Tableau 21. Effet anti-inflammatoire subaiguë de la crème de *Silene vulgaris* sur le poids corporel et le poids du thymus

Groups	Dose	Poids corporel (g)			Poids du thymus sec (mg/100g)
		Initial	Final	Gain	
Témoin	-	287 ± 17.39	301.75 ± 10.78	14.75 ± 6.62	51.62 ± 3.07
Crème	10%	207.5 ± 9.81	249.25 ± 11.06	41.75 ± 13.98	31.85 ± 3.88
	20%	258.6 ± 16.77	279.6 ± 13.27	21.00 ± 5.8	54.49 ± 2.38*
Diclofenac	1%	204 ± 8.98	258.75 ± 1.91	54.75 ± 9.78	55.83 ± 3.80*

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.E.M., n = 7, * p < 0.05

2. Activité analgésique

L'activité analgésique a été évaluée sur deux modèles *in vivo* de douleur, un modèle périphérique à l'acide acétique et la méthode de Plantar test (méthode de Hargreaves).

2.1. Méthode périphérique de l'acide acétique

Les contractions abdominales induites par l'injection de l'acide acétique ont été utilisées pour évaluer l'effet analgésique de la crème à base de *S. vulgaris* aux doses 10% et 20%. La crème à la dose de 20% a montré un effet analgésique au niveau des contractions abdominales induites par l'acide acétique qui est comparable à celui du diclofenac 1% avec des pourcentages d'inhibition de la douleur de 48.2% et 53.6% respectivement (Tableau 22).

Les contractions induites par l'injection i.p. de l'acide acétique est une méthode utilisée pour étudier l'effet analgésique périphérique d'une substance. La douleur provoquée par l'injection de l'acide acétique est due à la libération de la sérotonine, de l'histamine, de la bradykinine et des prostaglandines (PGE2 α , PGF2 α). Ces médiateurs chimiques stimulent les neurones nociceptifs périphériques et induisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Frederico

et al., 2009; Wantana et al., 2009). La crème à base de *S. vulgaris* a inhibée les contractions abdominales de manière significative et dose-dépendante. Cet effet analgésique pourrait être lié à l'inhibition de la libération des médiateurs chimiques de la douleur.

Tableau 22. Effet analgésique de la crème de *Silene vulgaris*

Groupes	Dose (%)	Nombre de contorsions	% Inhibition
Témoin	-	68.5 ± 5.04 ^{ns}	-
Crème <i>S. vulgaris</i>	10	37 ± 3.32 ^{ns}	46.0
	20	35.5 ± 1.77 ^{***}	48.2
Diclofenac	1	31.8 ± 5.54 ^{ns}	53.6

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.E.M., n = 6, *** p < 0.001; ns : non significatif.

2.2. Plantar test

Ce test explore l'activité analgésique des substances et utilise un stimulus thermique qui réside dans l'irradiation de la patte postérieure du rat. Le temps (en secondes) mis par l'animal pour retirer sa patte du faisceau thermique émis par l'appareil, est fonction de l'effet analgésique d'une substance. L'appareil est muni d'une cellule photoélectrique qui arrête automatiquement le chronomètre dès que l'animal retire sa patte. Les résultats montrent que la crème à base de *S. vulgaris* à la dose de 20%, possède un effet analgésique qui est comparable à celui du Diclofenac 1% (21.78 ± 1.35 (p < 0.01); 46.82 ± 3.32 (p < 0.01) respectivement).

Tableau 23. Effet analgésique de la crème *S. vulgaris* dans le Plantar test

Groupes	Dose (%)	Temps de latence (s)
Témoin	-	14.84 ± 0.81 ^{ns}
Crème <i>S. vulgaris</i>	10	18.80 ± 0.7 ^{ns}
	20	21.78 ± 1.35 ^{**}
Diclofenac	1	46.82 ± 3.32 ^{**}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.E.M.; n = 5; ns : non significatif. ** p < 0.01

Pour qu'on puisse interpréter ces résultats, nous avons mené des études phytochimiques. En effet, les criblages et l'analyse par HPLC ont montré la présence des flavonoïdes, des acides phénoliques, des tanins catéchiques, des coumarines et des saponosides dans l'extrait de *S. vulgaris*. D'autres travaux antérieurs ont montré les effets anti-inflammatoire et analgésique des flavonoïdes, des tanins, des saponosides et des triterpènes/stéroïdes (ELHamsas EL Youbi et al., 2016; EL Mansouri et al., 2014; Akindele et al., 2007; Bose et al., 2007). La présence de ces composés chimiques dans l'extrait de *S. vulgaris*, pourrait être responsable de ces propriétés pharmacologiques observées.

De plus, de nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes, qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (Gallego et al., 2007), d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (Kim et al., 2004).

Les tanins sont des polyphénols hydrosolubles, qu'on divise en tanins hydrolysables, dérivés de l'acide gallique combinés à des sucres, et en tanins dérivés de catéchol. Ils ont la propriété de se fixer sur les protéines de la peau grâce, en partie, à des liaisons hydrogènes. Cette action se traduit par un resserrement des pores et un raffermissement de la peau.

Les tanins catéchiques ont, en outre, la propriété de diminuer la perméabilité capillaire ce qui leur confère une activité anti-inflammatoire (Martini et Seiller, 2006). Des études sur l'acide p-coumarique ont révélé des propriétés anti-inflammatoire, antioxydante et antimicrobienne (Pei et al., 2016). De même, l'acide caféique possède des propriétés médicinales telles que antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (Heleno et al., 2015; Yang et al., 2013).

3. Étude Toxicologique

La toxicité aiguë et la DL50 ont été étudiée jusqu'à 5000 mg/kg de poids corporel des rats par voie locale et par voie orale selon les guidelines OECD. Concernant la toxicité subaiguë, elle a été évaluée sur des rats qui ont reçu des doses uniques de 20% de l'extrait de *S. vulgaris* formulée en crème pendant 28 jours. Le comportement et le poids des animaux ont été observés après chaque traitement. Les poids relatifs des organes et les paramètres biochimiques ont été mesurés.

3.1. Étude de la toxicité aiguë et DL50

Les tests de toxicité aiguë servent à déterminer le danger éventuel que représente une exposition ponctuelle à une substance chimique ou à un produit par voie orale, cutanée ou respiratoire. La DL50 correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50% d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises.

3.1.1. Evolution du poids

L'application de la crème de *S. vulgaris* par voie topique à la dose de 20 % pendant 14 jours n'a pas perturbé la croissance des rats (Figure 38). Ainsi, L'application topique de la crème à la dose 20% n'est pas toxique par voie locale en une prise unique. De plus, l'administration de l'extrait de *S. vulgaris* par voie orale aux doses de 2000 mg/kg et 5000 mg/kg pendant 14 jours n'a pas perturbé la croissance des animaux et ne présente aucun effet létal (Figure 39). Il ressort que l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* et la crème ne présentent aucun effet létal, car aucune mortalité ou modification de l'état général n'a été observée chez les rats soumis au traitement par voie locale à la dose 20% et orale aux doses 2000 mg/kg et 5000 mg/kg en prise unique pendant 14 jours selon l'OCDE.

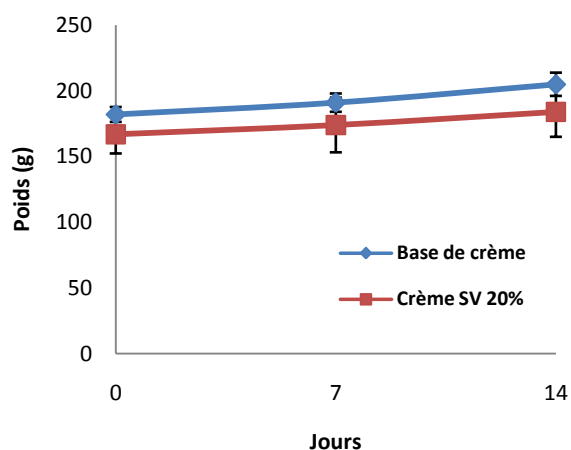


Figure 38. Poids corporel des rats traités en application aiguë avec la crème de *S. vulgaris*

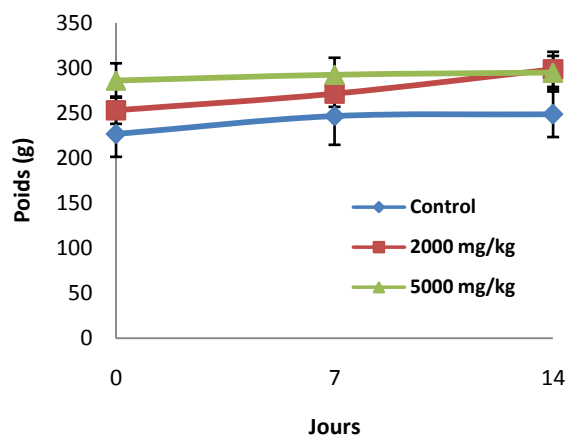


Figure 39. Poids corporel des rats traités en administration unique avec l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris*

3.1.2. Poids Relatifs des Organes

3.1.2.1. Par voie cutanée

Les poids relatifs des organes (reins, foie, et rate) prélevés chez les rats à la fin du traitement aiguë n'ont pas significativement varié (Tableau 24). Aucune toxicité gastrique n'a été mise en évidence après observation macroscopique de l'estomac.

Tableau 24. Effet de la crème de *S. vulgaris* à 20% sur le poids relatif des organes (ROW)

Groupes	Dose (%)	Poids (g)	Poids relatifs des organes (ROW) (g)		
			Foie	Reins	Rate
Base de crème	-	206 ± 7.23	51.55 ± 3.69 ^{ns}	4.14 ± 0.14 ^{ns}	2.52 ± 0.21 ^{ns}
Crème <i>S. vulgaris</i>	20	184.67 ± 2.4	52.67 ± 2.17 ^{ns}	4.08 ± 0.13 ^{ns}	2.66 ± 0.11 ^{ns}

Valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n = 5), ns: non significatif.

3.1.2.2. Par voie orale

La toxicité aiguë de l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* par voie orale a été évaluée chez le rat. En outre, l'extrait aux doses 2000 mg/kg et 5000 mg/kg de poids corporel n'ont pas produit de mortalité et aucun signe visible de toxicité selon l'OCDE n° 420. Les poids relatifs des organes (reins, foie, et rate) prélevés chez les rats à la fin du traitement aigu n'ont pas significativement varié (Tableau 25). Aucune toxicité gastrique n'a été mise en évidence après observation macroscopique de l'estomac.

Tableau 25. Effet de l'extrait de *S. vulgaris* sur le poids relatif des organes, n = 5.

Groupes	Dose (mg/kg)	Poids (g)	Poids relatifs des organes (ROW) (g)		
			Foie	Reins	Rate
Témoin	-	250.33 ± 32.6 ^{ns}	35.27 ± 1.94 ^{ns}	3.46 ± 0.08 ^{ns}	2.94 ± 0.32 ^{ns}
Extrait <i>S. vulgaris</i>	2000	298.61 ± 26.4 ^{ns}	36.65 ± 5.56 ^{ns}	4.57 ± 1.14 ^{ns}	3.6 ± 0.30 ^{ns}
	5000	295.13 ± 26.43 ^{ns}	49.33 ± 4.11 ^{ns}	4.69 ± 0.26 ^{ns}	2.49 ± 0.17 ^{ns}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n = 5), ns: non significatif.

3.1.3. Analyse des paramètres biochimiques

3.1.3. 1. Par voie cutanée

Afin de s'assurer de la non toxicité de la dose 20% de l'extrait de *S. vulgaris* formulée en crème, quelques paramètres biochimiques ont été analysés chez les rats traités à cette dose à la fin de l'expérimentation (J14). L'application aiguë de la crème ne provoque pas de variations significatives des teneurs sériques en glucose, cholestérol total, tri-glycérides, protéines totales, urée et créatinine. De plus, nos résultats n'ont pas montré de variation significative des taux des transaminases AST et ALT et Phosphatase alcaline (AP) après une administration unique, ce qui suggère dans ce cas que la crème n'est pas hépatotoxique (Tableau 26).

Tableau 26. Evaluation des paramètres biochimiques après l'application aiguë de la crème de *S. vulgaris*

Paramètres biochimiques	Base de crème	Crème de <i>S. vulgaris</i> 20%
Analyse hépatique		
AST (U/L)	269.3 ± 46.1	281.3 ± 2.66 ^{ns}
ALT (U/L)	86.33 ± 28.08	66.66 ± 2.33 ^{ns}
Phosphatase alcaline (PA) (U/L)	157.0 ± 15.50	184.6 ± 43.6 ^{ns}
Analyse Rénale		
Urée (U/L)	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.01 ^{ns}
Créatinine (U/L)	6.33 ± 0.67	6.00 ± 0.00 ^{ns}
Biochimie du sang		
Protéines totales (g/l)	48.67 ± 2.33	55.67 ± 2.67 ^{ns}
Glucose (g/l)	1.30 ± 0.18	1.04 ± 0.08 ^{ns}
Cholestérol (g/l)	0.52 ± 0.07	0.72 ± 0.01 ^{ns}
Triglycérides (g/l)	0.64 ± 0.10	0.41 ± 0.04 ^{ns}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM; n = 3, AST; aspartate transminase, ALT; alanine aminotransferase; Témoin : base de crème; ns: non significatif.

3.1.3. 2. Par voie orale

Nos résultats pour l'extrait de *S. vulgaris* administré oralement à la dose de 2000 mg/kg n'ont pas montré de variation significative des taux des transaminases AST et ALT et Phosphatase alcaline (PA) après une administration unique, ce qui suggère que l'extrait n'est pas hépatotoxique. Cependant, nous avons noté une différence non significative dans les fonctions

hépatiques indiquées AST et ALT des rats traités en aiguë à l'extrait hydroethanolique de *S. vulgaris* à la dose 5000 mg/kg par rapport à la dose 2000 mg/kg et au témoin. En outre, les valeurs des paramètres biochimiques relative aux fonctions rénales et du sang (urée, créatinine, triglycérides, cholestérol et protéines totales) ne sont pas modifiées en comparaison avec ceux du témoin, à l'exception de la créatinine qui s'est révélée légèrement élevée pour la dose 5000 mg/kg (Tableau 27). Il est connu que les dommages à l'intégrité structurale du foie se traduisent par une augmentation des enzymes hépatiques spécifiques (AP, ALT et AST) dans le sérum, parce qu'ils sont des enzymes cytoplasmiques et qui sont mis en circulation après des dommages cellulaires (Janbaz et Gilani, 1995; Venkateswaran et al., 1995). Il est nécessaire de mentionner que ces transaminases jouent un rôle important dans le métabolisme des acides aminés et en fournissant des intermédiaires nécessaires à la néoglucogenèse (Hanley et al., 1986). On peut supposer que le niveau accru de l'AST et ALT après traitement par la dose 5000 mg/kg peut être responsable des dommages aux tissus dans le foie et les reins. Cela doit être confirmé par des études histologiques dans laquelle la morphologie tissulaire donne des informations sur le foie et les reins sachant que l'observation macroscopique du foie et reins ne révèle aucun signe de toxicité. En revanche, la dose 2000 mg/kg n'entraîne aucune perturbation du cholestérol, triglycérides, protéines totales et de la glycémie ainsi que la fonction hépato rénale. La diminution de la concentration de protéines plasmatiques totales et d'albumine a été proposée comme indicatrice de l'altération de la synthèse protéique (Kubena et al., 1993). Dans la présente étude, les protéines totales n'ont pas été affectées, dans le groupe expérimental. C'est pourquoi nous concluons, que le traitement par l'extrait de *S. vulgaris* et la crème de *S. vulgaris* n'a eu aucun impact significatif sur le métabolisme protéique.

Tableau 27. Evaluation des paramètres biochimiques après une administration orale de l'extrait de *S. vulgaris*

Paramètres biochimiques	Témoin	Extrait SV 2000 mg/kg	Extrait SV 5000 mg/kg
Analyse hépatique			
AST (U/L)	248.6 ± 27.25 ^{ns}	230 ± 14.29 ^{ns}	722 ± 36.42 ^{ns}
ALT (U/L)	69.33 ± 8.08 ^{ns}	25.67 ± 3,76 ^{ns}	127.3 ± 10.7 ^{ns}
Phosphatase alcaline (U/L)	258.0 ± 5.00 ^{ns}	164.33 ± 30.72 ^{ns}	254 ± 33.47 ^{ns}
Analyse Rénale			
Urée (U/L)	0.30 ± 0.03 ^{ns}	0.29 ± 0.02 ^{**}	0.35 ± 0.01 ^{ns}
Créatinine (U/L)	3.5 ± 0.5 ^{ns}	3.67 ± 0.33 ^{ns}	5.50 ± 0.41 ^{ns}
Biochimie du sang			
Protéines totales (g/l)	49.00 ± 6.0 ^{ns}	49.67 ± 2.30 ^{ns}	54.33 ± 1.45 ^{ns}
Glucose (g/l)	0.70 ± 0.28 ^{ns}	1.25 ± 0.33 ^{ns}	1.12 ± 0.12 ^{ns}
Cholestérol (g/l)	0.35 ± 0.11 ^{ns}	0.34 ± 0.04 ^{ns}	0.75 ± 0.03 ^{ns}
Triglycérides (g/l)	0.57 ± 0.19 ^{ns}	0.61 ± 0.06 [*]	0.79 ± 0.14 ^{ns}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM; n = 3, AST; aspartate transaminase, ALT; alanine aminotransferase; ns: non significatif.

3.2. Étude de la toxicité subaiguë

3.2.1. Toxicité cutanée à doses répétées : 28 jours (OCDE 410)

3.2.1.1. Evolution du poids

Au cours de toute la période d'expérimentation, aucun animal n'a manifesté un comportement anormal. Les pesées hebdomadaires des rats ont montré que l'application de la crème de *S. vulgaris* par voie topique à la dose de 20 % pendant 28 jours n'a pas perturbé la croissance des animaux (Figure 40). En effet, le poids moyen du lot expérimental a évolué de 280.20 ± 18.39 g jusqu'à 305.00 ± 27.38 g vers la fin de la quatrième semaine. Quant au témoin, la moyenne du poids corporel a varié de 279.33 ± 12.54 g à 320.33 ± 9.85 g au terme de la période expérimentale.

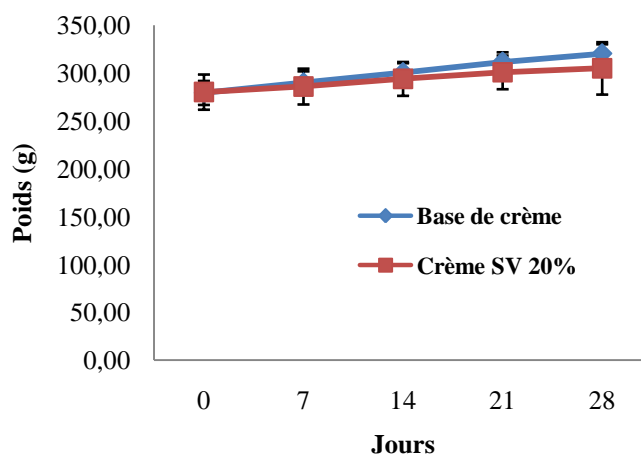


Figure 40. Poids corporel des rats traités en administration répétée pendant 28 jours avec la crème de *S. vulgaris*. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM; N = 6.

3.2.1.2. Poids Relatifs des Organes

L'aspect général des organes des rats traités, ainsi que leurs poids relatifs ont été semblables à ceux des témoins. Certains produits pourraient altérer l'une ou l'autre des fonctions de ces organes. L'atrophie ou l'hypertrophie sont les conséquences de telles altérations. Ces études ont porté essentiellement sur les organes suivants : foie, reins et rate. D'après les résultats, les poids relatifs des organes (reins, foie, et rate) prélevés chez les rats à la fin du traitement subaigu n'ont pas varié (Tableau 28). Aucune toxicité gastrique n'a été mise en évidence après observation macroscopique de l'estomac.

Tableau 28. Effet de la crème de *S. vulgaris* à 20% sur le poids relatif des organes

Groups	Dose (%)	Poids (g)	Poids relatifs des organes (ROW) (g)		
			Foie	Reins	Rate
Base de crème	-	316.31 \pm 8.89 ^{ns}	39.59 \pm 3.52 ^{ns}	4.09 \pm 0.09 ^{ns}	3.14 \pm 0.26 ^{ns}
Crème SV	20	300.00 \pm 26.31 ^{ns}	39.70 \pm 4.69 ^{ns}	4.51 \pm 1.05 ^{ns}	2.93 \pm 0.62 ^{ns}

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 3), ns: non significatif.

3.2.1.3. Analyses des paramètres biochimiques

L'application topique de la crème pendant 28 jours, à la dose 20%, n'entraîne aucune perturbation significative des paramètres biochimiques (AST, ALT, PA, urée, créatinine, cholestérol, triglycérides et de la glycémie, ect..) comparativement au groupe témoin (Tableau

29). Dans plusieurs organes, les lésions cellulaires sont suivies par la libération d'un certain nombre d'enzymes cytoplasmiques dans le sang; phénomène qui constitue la base pour le diagnostic clinique (Dolai et al., 2012; Sundberg et al., 1994).

Dans notre étude, la fonction hépatique a été évaluée par la mesure des concentrations plasmatiques en ALT et AST. La fonction rénale a été évaluée par la mesure de la créatinine plasmatique et les concentrations d'urée (Correges et al., 1998; Finco, 1997; Davis et Berdt, 1994). La fonction rénale n'a pas été altérée suite au traitement par la crème à base de l'extrait de *S. vulgaris* à 20% en administration subaiguë pendant 28 jours. En outre, nos résultats n'ont pas montré de variation significative des taux des transaminases AST, ALT et phosphatases alcalines après une application répétée de la crème de *S. vulgaris* pendant 28 jours.

Tableau 29. Evaluation des paramètres biochimiques après une application locale de la crème de *S. vulgaris* pendant 28 jours

Paramètres biochimiques	Base de crème	Crème de <i>S. vulgaris</i> 20%
Analyse hépatique		
AST (U/L)	236.0 ± 44.58 ^{ns}	279.5 ± 13.47 ^{ns}
ALT (U/L)	27.33 ± 10.49 ^{ns}	57.33 ± 10.93 ^{ns}
Phosphatase alcaline (PA) (U/L)	189.0 ± 25.00 ^{ns}	161.5 ± 15.11 ^{**}
Gamma glutamyl Transferase UI/l	4.00 ± 0.00 ^{ns}	4.00 ± 0.00 ^{ns}
bilirubine totale (mg/l)	3.67 ± 2.67 ^{ns}	1.33 ± 0.33 ^{ns}
Analyse Rénale		
Urée (U/L)	0.40 ± 0.03 ^{**}	0.42 ± 0.04 ^{**}
Créatinine (U/L)	4.33 ± 0.33 ^{ns}	5.33 ± 0.33 ^{ns}
Biochimie du sang		
Protéines totales (g/l)	49.67 ± 4.41 ^{ns}	53.67 ± 2.57 ^{ns}
Glycémie (g/l)	1.22 ± 0.25 ^{ns}	1.31 ± 0.14 ^{ns}
Cholestérol total (g/l)	0.34 ± 0.04 ^{ns}	0.41 ± 0.01 ^{ns}
Triglycérides (g/l)	0.40 ± 0.09 ^{ns}	0.74 ± 0.10 ^{ns}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM; n = 3, AST; aspartate transminase, ALT; alanine aminotransferase; ns: variation non significatif.

3.3. Méthode OPI

Le recours à des méthodes alternatives en expérimentation animale est aujourd'hui une nécessité, et notamment en réponse aux exigences réglementaires relatives aux cosmétiques, qui requièrent des résultats rapides et fiables sur les propriétés toxiques des substances chimiques sans utiliser les animaux. En effet, cette méthode est une alternative à l'expérimentation animale pour l'évaluation du potentiel irritant des produits cosmétiques. La méthode d'essai OPI est un modèle organotypique qui permet le maintien à court terme d'yeux de poulet *ex vivo*. Selon cette méthode, les dommages provoqués par le produit testé sont évalués par détermination du gonflement, de l'opacité et de la rétention de la fluorescéine de la cornée. Cette technique consiste en l'étude de la tolérance oculaire qui en principe met en œuvre des techniques *in vitro* telle que l'œil de poulet isolé (OPI) (OCDE n° 438).

La méthode OPI utilise des yeux prélevés sur des poulets provenant d'abattoirs, où ils sont tués à des fins de consommation humaine. L'œil est énucléé et placé sur un support d'œil, la cornée étant en position horizontale. La substance d'essai et les contrôles négatifs/positifs sont appliqués sur la cornée. Les effets toxiques pour la cornée sont estimés à partir d'une évaluation qualitative de son opacité, une évaluation qualitative de l'endommagement morphologique macroscopique de la surface et une évaluation qualitative de l'endommagement de l'épithélium sur la base de la rétention de fluorescéine. Les résultats de l'essai sur l'œil de poulet isolé n'ont montré aucun changement sur l'opacité, la perméabilité de la cornée de poulet et la morphologie macroscopique de la surface de la cornée suite à son traitement par l'extrait testé de *S. vulgaris* à 20% par rapport au témoin et l'acide acétique à 10% dont l'opacité de la cornée a changé pour ce dernier (Figure 41, Tableau 30).

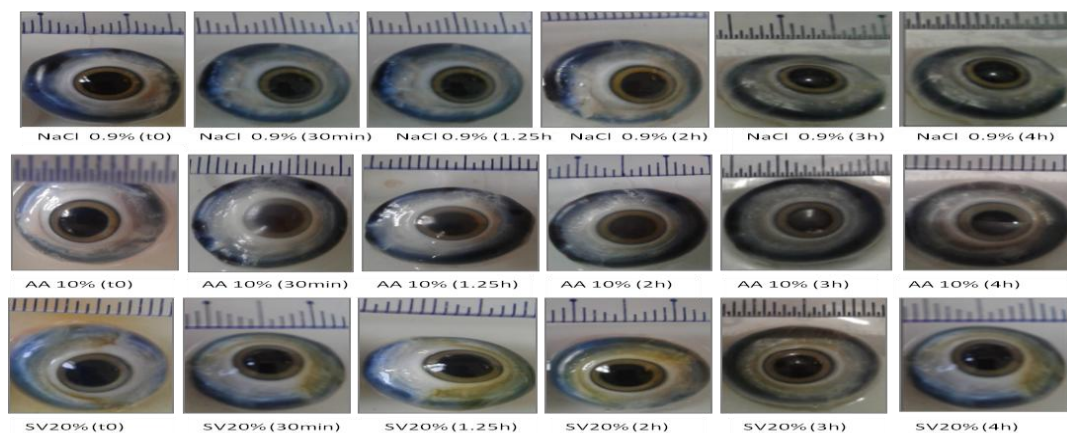


Figure 41. Exemples du test OPI de l'irritation oculaire. SV: Extrait de *S. vulgaris*,
T: Témoin NaCl et AA: Acide Acétique

Tableau 30. Incidence de l'irritation oculaire en OPI test après l'exposition de l'extrait de *S. vulgaris* à 20%

Temps de post-instillation (h)	Incidence d'une irritation oculaire			
	Opacité cornéenne	Iritis	Conjonctivite	Gravité de l'irritation, MT* score
0.5	0/6	0/6	0/6	0.0
1.25	0/6	0/6	0/6	0.0
2	0/6	0/6	0/6	0.0
3	0/6	0/6	0/6	0.0
4	0/6	0/6	0/6	0.0

* Score total moyen

4. Innocuité cutanée (Patch test)

Une substance sensibilisante est capable de provoquer une réaction immunologique chez des individus prédisposés. La réaction allergique survient lorsqu'une exposition préalable à la substance a conduit au développement d'une immunité à son égard (sensibilisation à la substance). Les effets apparaissent ensuite lors des contacts ultérieurs. La sensibilisation cutanée peut se caractériser, chez l'homme, par l'apparition d'un prurit, d'un érythème, d'un œdème, de vésicules, de bulles ou par une combinaison de ces différentes manifestations (CNRS, 2007).

Le Patch test humain ou test épicutané est le test phare en dermatologie de contact et permet l'étude de la tolérance cutanée. Ce test consiste à appliquer un produit sous patch occlusif ou semi occlusif dans le bras ou le dos du volontaire. Le protocole utilisé a été établi pour chaque volontaire. L'essai clinique s'est déroulé dans la région de Sefrou et Fès (Maroc).

Le suivi de l'essai clinique permet de relever la tolérance de la crème à base de *S. vulgaris* à 20%. Dans notre étude, le test a été réalisé chez 23 volontaires (20 femmes et 3 hommes) leur âge varie de 19-52 ans, par application topique de la crème formulée à base de *S. vulgaris* à 20%, sous patch au niveau du pli du coude pendant 24, 48 et 96 heures. D'après les résultats obtenus, la crème est dénuée de tout effet inducteur d'irritabilité ou de sensibilisation de la peau (Tableau 31).

Tableau 31. Réactions cutanées après l'application de la crème *S. vulgaris* à 20% (Patch test)

Volontaires	Sexe	Age (ans)	Antécédents allergiques	Érythème	Œdème	Prurit	Vésicules	Lecture totale 96 h
1	Femme	39	RAS	-	-	-	-	-
2	Femme	32	RAS	-	-	-	-	-
3	Femme	25	RAS	-	-	-	-	-
4	Femme	26	RAS	-	-	-	-	-
5	Femme	26	RAS	-	-	-	-	-
6	Femme	27	RAS	-	-	-	-	-
7	Homme	28	RAS	-	-	-	-	-
8	Femme	19	RAS	-	-	-	-	-
9	Femme	22	RAS	-	-	-	-	-
10	Femme	32	RAS	-	-	-	-	-
11	Homme	27	RAS	-	-	-	-	-
12	Homme	29	RAS	-	-	-	-	-
13	Femme	20	RAS	-	-	-	-	-
14	Femme	35	RAS	-	-	-	-	-
15	Femme	36	RAS	-	-	-	-	-
16	Femme	26	RAS	-	-	-	-	-
17	Femme	28	RAS	-	-	-	-	-
18	Femme	45	RAS	-	-	-	-	-
19	Femme	29	RAS	-	-	-	-	-
20	Femme	52	RAS	-	-	-	-	-
21	Femme	32	Eczéma	-	-	-	-	-
22	Femme	31	RAS	-	-	-	-	-
23	Femme	27	RAS	-	-	-	-	-
Irritation totale								-
Index d'irritation								0.00
Résultat								Non irritant

RAS : rien à signaler; - : négatif, absence de réaction

Conclusion

La présente étude s'intéresse à l'étude toxicologique et l'évaluation des activités anti-inflammatoires et analgésiques de la crème de *Silene vulgaris*. En effet, l'activité anti-inflammatoire a été évaluée sur deux modèles *in vivo*, l'œdème induit par la carragénine sur la patte de rat Wistar et la méthode du granulôme au pellet de coton aux doses de 10% et 20%. L'activité analgésique a été quant à elle, évaluée sur deux modèles *in vivo* de douleur, un modèle à l'acide acétique et la méthode de Plantar test (méthode de Hargreaves). En outre, la toxicité aiguë et subaiguë, l'essai clinique de Patch test et le test OPI de la crème ont été évaluées. Ainsi, une analyse phytochimique a été réalisée sur l'extrait de *S. vulgaris*. La crème de *S. vulgaris* a montré une activité anti-inflammatoire à la dose de 20% par rapport au Diclofénac 1%, avec des pourcentages d'inhibition de l'œdème de 85.71% et 58.33% respectivement. De plus, une réduction significative du granulôme du coton a été notée dans le groupe traité avec la crème de *S. vulgaris* comparée au témoin (1.96 ± 0.04 , 2.59 ± 0.2 , respectivement). Dans le test analgésique, la crème à la dose de 20% a montré un effet analgésique, comparable à celui du Diclofenac 1%. L'étude de la toxicité et de la dose létale 50 de la crème à base de *S. vulgaris* par voie locale et de l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* par voie orale n'a montré aucune létalité et aucun effet indésirable à la dose thérapeutique. La toxicité aiguë et subaiguë de la crème par voie locale n'a révélé aucun effet toxique sur le comportement général de l'animal, le poids relatif des organes (ROW), les paramètres biochimiques et il n'y a pas eu de mort au cours des 14 jours d'observation pour la toxicité aiguë et 28 jours d'observation pour la toxicité subaiguë. Ces résultats montrent que notre formulation de *S. vulgaris* est un anti-inflammatoire qui agit à la fois sur les symptômes inflammatoires aiguë et subaiguë et un intéressant analgésique sans effets indésirables.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'utilisation des conservateurs de synthèse présentés dans l'annexe V de la réglementation cosmétique, Européenne et Marocaine, induit des effets indésirables sur la santé humaine, comme c'est le cas pour les parabènes. Pour cela de plus en plus d'industriels privilégient aujourd'hui d'autres alternatives en utilisant notamment des matières premières aux propriétés antimicrobiennes notoires. Encore peu de solutions naturelles et efficaces sur les cinq souches microbiennes testées lors du challenge test sont disponibles sur le marché. Certes, les huiles essentielles sont très étudiées pour ce potentiel d'activité. Néanmoins, les extraits non volatils restent peu valorisés.

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles molécules à pouvoir conservateur d'origine naturelle, est basée sur les études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes d'une zone ou d'un pays, puis sur les études phytochimiques et pharmacologiques et bien d'autres aspects scientifiques. De ce fait, les objectifs de cette thèse sont de développer des conservateurs naturels à base des plantes médicinales et aromatiques pour lutter contre les proliférations microbiennes et qui possèdent aussi des propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique, pour protéger contre les réactions cutanées et les effets indésirables inhérents aux ingrédients des produits cosmétiques.

La première partie de ces travaux a mis en évidence la réalisation d'une enquête ethnopharmacologique dans la région du Moyen Atlas-Sefrou, dans le but de relever les plantes antiseptiques de cette région et ses environs, comme les communes d'Ait Taleb, Ain Smar, Aghbalou Aqorar et Bhalil. Selon cette étude, plusieurs plantes ont été sélectionnées, en se basant sur leur pouvoir antiseptique traditionnel et valorisées par la suite par des études microbiologiques et toxico-pharmacologiques.

En vue d'incorporer l'extrait de *Silene vulgaris* et les huiles essentielles de *T. broussounitti* et *O. elongatum*, comme agent antimicrobien dans un produit cosmétique, il était nécessaire d'évaluer leur propriété antibactérienne et antifongique *in vitro* d'une manière qualitative par la méthode des aromatogrammes et quantitative par la méthode de micodilution sur microplaques.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne montrent que les concentrations minimales inhibitrices de l'extrait de *S. vulgaris* sur les cinq souches varient entre 0.31-10 %. Les études phytochimiques de l'extrait de *S. vulgaris* ont montré la présence des composés phénoliques, essentiellement, les flavonoïdes (apigénine, épicatechine et lutéoline), les tanins, les acides phénoliques (acide p-coumarique et acide caféique), les coumarines et les

saponosides. Les résultats de l'analyse de composés chimiques contenus dans les huiles essentielles d'*O. elongatum* et *T. broussonetii* par la GC/MS, ont montré la dominance de thymol pour l'HE de *T. broussonetti* et le carvacrol dans l'HE d'*O. elongatum*. Les analyses antimicrobiennes des HE ont révélé que ces dernières étaient plus efficaces contre les bactéries Gram-positives par rapport aux Gram négatifs, les CMI des HE contre les bactéries et les champignons étaient de 0,02 à 2%.

A partir des résultats microbiologiques obtenus, l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* et les huiles essentielles de *T. broussounitti* et *O. elongatum* ont été ajoutés à une formulation élaborée au niveau de notre laboratoire. Ensuite le challenge test, une méthode recommandée par la Pharmacopée Européenne pour tester l'efficacité des conservateurs, a été réalisé.

Les résultats ont été comparés à une base de crème neutre. Nous avons noté que la crème contenant l'extrait de *S. vulgaris* se montre systématiquement meilleure que le témoin sur les cinq souches. Nous soulignons également que les réductions logarithmiques de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* et *A. brasiliensis* sont conformes au critère A de la Pharmacopée Européenne aux concentrations 10% et 20% de l'extrait de *S. vulgaris* incorporé dans la crème formulée.

De plus, les résultats du challenge test obtenus, montrent que les formulations répondent aux critères A contre *P. aeruginosa* dès 2 % et contre *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* et *A. brasiliensis* à 10 % et 20%. L'augmentation de la concentration de l'extrait incorporé dans la formulation permet d'obtenir des résultats conformes aux critères A pour toutes les souches. Ainsi, la crème à 20% a montré un effet conservateur avec des propriétés anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante très intéressantes sans effets secondaires lors de l'étude de la toxicité expérimentale et le patch test relatif à l'évaluation de l'irritation cutanée sur 23 volontaires. D'après ces résultats, nous avons pu développer un conservateur naturel à base de l'extrait de *S. vulgaris* dans la crème formulée. La stabilité physico-chimique, organoleptique et microbiologique de la crème formulée avec l'extrait de *S. vulgaris* indique une bonne stabilité de la crème au cours du temps à différentes températures de 4°C, 25°C et 37°C.

Les résultats de challenge test pour les HE avec les bactéries (*S. aureus*, *E. coli*) et *A. brasiliensis* dans la crème formulée, indiquent que les deux huiles essentielles testées de *T. broussonetti* et *O. elongatum* à 2% présentent une activité conservatrice intéressante sur ces microorganismes en satisfaisant le critère A de la Pharmacopée Européenne. De plus, l'HE de

T. broussonetti à 2% présente une conformité aux critères B à 14 jours contre *C. albicans* par rapport à l'HE d'*O. elongatum*.

Le pouvoir antioxydant de l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris* et des HE ont été évalué par le biais de six techniques à savoir : ABTS, DPPH, FRAP, β -carotène, HRSA et l'effet protecteur de l'ADN. L'extrait de *S. vulgaris* présente une activité très intéressante à piéger le radical hydroxyle avec un pourcentage d'inhibition de 84.33%. De plus, l'extrait a révélé un effet inhibiteur intéressant à piéger le radical DPPH, ABTS et à réduire le fer. Quant aux HE, l'huile essentielle d'*O. elongatum* présente une activité antioxydante très élevée par les méthodes DPPH, FRAP et β -carotène avec une IC50 de l'ordre de 64 ± 0.08 , 30 ± 0.062 et 41 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ respectivement par rapport à l'HE de *T. broussonetti* (IC50 est 210 ± 0.3 , 84 ± 0.21 et 145 ± 0.1 $\mu\text{g/ml}$).

L'étude anti-inflammatoire et analgésique montrent que notre formulation de *S. vulgaris* est un anti-inflammatoire qui agit à la fois sur les symptômes inflammatoires aiguë et subaiguë, en plus d'un intéressant effet analgésique. L'étude de la toxicité aiguë, subaiguë pendant 28 jours, la dose létale de la crème et de l'extrait hydroéthanolique de *S. vulgaris*, n'ont montré aucun effet indésirable. De plus, les résultats obtenus pour l'essai clinique (Patch test humain) et le test OPI, montrent que la crème est dénuée de tout effet inducteur d'irritabilité ou de sensibilisation de la peau.

En conclusion, nos travaux présentent une avancée majeure dans la recherche d'innovoants conservateurs naturels pour l'industrie cosmétique. Nous avons pu développer un conservateur naturel à base d'un extrait hydro-éthanolique de *S. vulgaris* testé dans une crème formulée par nos soins, dotée d'un pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire et analgésique très intéressant.

En perspective, d'autres recherches sont nécessaires pour compléter ce travail, notamment développer d'autres essais sur l'extrait de *S. vulgaris* décoloré, étape nécessaire pour la commercialisation. Enfin, il restera à définir les concentrations d'utilisation puis à élargir les essais pour la conservation à d'autres formes de produits cosmétiques (lotions, gels, gels douches, shampoings, masques...). Quant aux huiles essentielles, il restera à mettre en place des mélanges afin de potentialiser leur effet conservateur.

BIBLIOGRAPHIE

A

Acuña U.M., Atha D.E., Ma J., Nee M.H., Kennelly E.J. 2002. Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytother. Res.* 16: 63-65.

Akindede AJ, Adeyemi OO. 2007. Anti-inflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia*, 78: 25-28.

Altundaga E, Ozturk M. 2011. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Social and Behavioral Sciences*; 19: 756–777.

Alzoreky, N.S., & Nakahara, K. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, *International Journal of Food Microbiology*, 80: 223-230.

Anderson J.M. 1994. Inflammation and the foreign body response. *Problems in General Surgery*. 11: 147-160.

Anelich, L.E. and Korsten, L. 1996. Survey of micro-organisms associated with spoilage of cosmetic creams manufactured in South Africa. *International Journal of Cosmetic Sciences* 18: 25–40.

Ali Z. 1998. Phytochemical studies of the chemical constituents of the *Silene conoidea* and *Stocksia conoidea*. Doctoral thesis, Univ of Karachi, Pakistan.

Arnetoli M., Montegrossi G., Buccianti A., Connelli C. 2008. Determination of organic acids in plants of *Silene paradoxa* L. by HPLC. *J Agric Food Chem.* 13: 789 - 795.

Atawodi S.E. 2005. Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotec.* 4 (2): 128-133.

Atbib M. 1985. Contribution à l'étude morphologique des origans (*Origanum* L.) du Maroc et leur utilisation médicinale. *Al biruniya, Rev.Mar. Pharm., Rabat.* Tome 1, 2 : 107- 120.

Adjanohoun E., Ake Assi L. 1979. Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Centre National de Floristique, Université d'Abidjan.

Ayoola G.A., Akpanika G.A., Awobajo F.O., Sofidiya v V.O. Osunkalu H.A.B. Coker and T.O. Odugbemi, 2009. Anti-inflammatory properties of the fruits of *Allanblanckia floribunda* Oliv. (Guttiferae). Bot. Res. Int. 2: 21-26.

B

Babayi H, Kolo I, Okogum JI. 2004. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Biochemistri, 16 (2): 102-5.

Bajpai, V. K., Shukla, S. and Kang, S. C. 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. Bioresource Technol. 99(18): 8903–8908.

Baker S., Nicklin J., Khan N. 2007. Microbiology, Ed. revue de: Microbiology / J. Nicklin, K. Graeme-Cook and R. Killington. 2nd ed. 2002, Taylor & Francis Group, New York.

Ballerio J., Fresu I. 1993. Le piante di uso officinale nella Barbagia di Seui (Sardegna Centrale). Fitoterapia 64: 141-150.

Bammi J., et Douira A. 2002. Les plantes médicinales dans la forêt de L'achach (plateau central, Maroc). Acta Botanica Malacitana 27: 131-145.

Barnes Peter J (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. Clinical Science, 94, 557-572.

Basset F. 1996. Quel futur pour les produits aromatiques de synthèse?, Parfums cosmétiques actualités. 130: 49–54.

Belaqziz R., Harrak R., Romane A., Oufdou K. and Ahmed El Alaoui ElFels M. 2010. Antimicrobial and Insecticidal Activities of the Endemic *Thymus broussonetti* Boiss. And *Thymus maroccanus* Ball. Rec. Nat. Prod. 4:4 230-237.

Bellakhdar J. 1997. The traditional Moroccan pharmacopoeia, medicine and Arabic popular knowledge. Ed Ibis Press, Paris.

Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J., Younos C. 1991. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. Journal of Ethnopharmacology. 35: 123-143.

Benabid A. Morocco flora and ecosystems. Evaluation and preservation of biodiversity, ed: Ibis Press, Paris. 2000. 359.

Benjilali B, Richard H MJ, Baritoux O. 1986. Etude des huiles essentielles de deux espèces d'Origan du Maroc: *Origanum compactum* Benth et *Origanum elongatum* Emb. Et Maire. Lebensm. Wiss. Technol. 19: 22-26.

Benjilali B., Hammouni M., Richard H. 1987. Polymorphisme chimique des huiles essentielles de thym du Maroc. Caractérisation des composants Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils 1-compounds characterization Sciences des aliments -7 77-91.

Benkhnigue O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A. et Douira A. 2011. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). Acta Botanica. 53: 191-216.

Benzie I.F.F., and Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239 (1): 70-76.

Bertomeu J.M. , Arrillaga I. , Segura J. 2007. Essential oil variation with in an damong natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas Biochemical Systematics and Ecology, 35: 479-488.

Bigendako-Polygenis M.J. & Lejoly J. 1990. La pharmacopée traditionnelle au Burundi. Pesticides et médicaments en santé animale. Pres. Univ. Namur: 425-442.

Blain, Jouzeau, Netter and Jeandel. 2000. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. Rev Méd Interne. 21: 978-88.

Bolzinger M.A. Extraits végétaux. Actifs et Additifs en Cosmétologie. Martini M.-C. & Seiller M. 3e Edition, Ed. Lavoisier. 2006. 163-188.

Borchardt J.R., Donald L. Wyse, Craig C. Sheaffer, Kendra L. Kauppi, R. Gary Fulcher , Nancy J. Ehlke, David D. Biesboer and Russell F. Bey. 2008. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. Journal of Medicinal Plants Research 2(5): 098-110.

Bos J.D. 2004. Skin immune system. Cutaneous immunology and clinical immunodermatology, 3rd ed.

- Bose A, Mandal S, et al., 2007. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia*. 78(7/8):515-520
- Bouayyadi L., El Hafian M., Zidane L. 2015. Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Maroc. *Journal of Applied Biosciences*. 93: 8760 – 8769.
- Bouhdid S., Abrini J., Zhiri A., Espuny M.J., Manresa A. 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *J. appl. Microbiol.*106: 1558-68.
- Boukhira S., EL Mansouri L., Bousta D., 2013. Ethnobotanical studies of some medicinal and cosmetic plants used in the province of Sefrou, Middle Atlas of Morocco. *The Journal of Ethnobiology and Traditional Medicine Photon* 120: 661-670.
- Boureau, Doubrère, « DOULEUR », *Encyclopædia Universalis*. (consulté le 12 Décembre 2016). URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/douleur/>
- Bourin M., Lèvre M., Hervé A. 1993. *Cours de pharmacologie*. Ellipses, 3ème édition, Paris. 351.
- Bousta D, Ennabili A. 2011b. L'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques au service du développement de la phytothérapie au Maroc, *Phytothérapie*, 9: 297-303.
- Bousta D, Farah A, Elyoubi-el Hamsas A , EL Mansouri L, Soidrou SH, Benjilali J, Adadi I, Greche H, Lachkar M, Alaoui Mhamdi M. 2013a.. Phytochemical screening, antidepressant and immunomodulatory effects of aqueous extract of *cistus ladanifer* L. From Morocco. *International Journal of Phytopharmacology*. 4(1): 12-17.
- Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. 2003. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 4 (6):7.(cited in Mohammedi Z, 2005).
- Brand-Williams W., Cuvelier MF., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol. Leb*. 1995. 28: 25–30.
- Brannan D.K. *Biology of microbes. Cosmetic Microbiology : A practical approach*, GEIS (P.A.), Ed., 2nd Edition, Taylor & Francis. 2006. 19-69.

Brantner, A., Males, Z., Pepeljnjak, S., Antolic, A., 1996. Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. *J. Ethnopharmacol.* 52, 119–122.

Brul S., Coote P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms, *Int. J. Food. Microbiol.* 50: 1–17.

Burits M., and Bucar F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phyto Res.* 14: 323–328.

C

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

Cao G., Sofic E., Prior R.L. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. *Free Radic Biol Med.* 22: 749–60.

Castro L., Freeman B.A. 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition.* 170: 161-165.

Charles N.S., Peter A.W., et Derek W.G. 2010. *Fundamentals of Inflammation.* Cambridge University Press: 2-3.

Chen HQ., Jin ZY., Wang XJ., Xu XM., Deng L., Zhao JW. 2008. Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci. Lett.* 448 (2): 175-9.

CIR (Cosmetic Ingredient Review), 1990. Final report on the safety assessment of phenoxyethanol. *Journal of the American College of Toxicology*, 9 : 259-278.

Circulaire N° 48 DMP20 Cadre relatif à l'enregistrement des produits cosmétique, Maroc : Annexe V : liste des agents conservateurs que peuvent contenir les produits cosmétiques en directive Européenne du conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des états membres relatives aux produits cosmétiques 76/768/CEE.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, Approved Standard, eleventh edition. CLSI document MO2-A11, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, ISBN1-56238-986-6. 2012.

CNRS. 2007. REACH - Exigences concernant les données toxicologiques. Prévention du risque chimique. http://www.prc.cnrs-gif.fr/reach/fr/toxicological_data.html (consulté 2017-04-10)

Coelho de Souza G., Haas A.P.S., Poser G.L.V., Elisabetsky E. 2004. Farmácias Caseiras Comunitárias do município de Maquiné (RS): uma avaliação etnofarmacológica. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (in press).

Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, vol. 17(10): 1195-1214.

Correges JP, Becha J, Abood E, André L, Lamarka R. 1998. Renal artery stenosis and chronic renal failure in NIDDM, *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux* 91: 1077-1088.

Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. 1994. Inflammation and Repair. Dans *Pathologic Basis of Disease* (Schoen F.J., Eds). 5ème édition: W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 51-92.

Cozzoli, O., 1996. The role of surfactants in self-preserving cosmetic formulas, *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker, p. 75-118.

Cristiani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. et Micieli D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 6300-6308

Cristina Figueiredo A. , Miguel M. G. , Duarte A. M. F. ., Barroso José G, and Pedro Luis G. 2001. Essential oil composition of *Thymus lotocephallus* G. Lopez and R. Morales, collected during flowering and vegetative phases *Flavour and Fragrance Journal*, 16: 417-421.

D

Le Bars D. et J.-C. Willer, «Physiologie de la douleur», EMC-Anesthésie Réanimation, 2004.

Dagdelen S., Bilenler T., Durmaz G., Gokbulut I., Hayaloglu A.A., And Karabulut I. 2014. Volatile composition, antioxidant and antimicrobial activities of herbal plants used in the

manufacture of van herby (otlu) cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*. 38: 1716–1725.

Bousta D., Boukhira S., Aafi A., Ghanmi M., El Mansouri L. Ethnopharmacological Study of anti-diabetic medicinal plants used in the Middle-Atlas region of Morocco (Sefrou region), *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 2014; 2 (1): 75-79.

Dandlen S.A., Lima A.S., Mendes M.D., Miguel M.G., Faleiro M.L., Sousa M.J., Pedro L.G., Barroso J.G. & Figueiredo A.C. 2010. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour Frag. J.* 25: 150–155.

Darbre P. 2008. The Paraben Debate.

Darmograi V N. 1977. Flavonoids of the plants of the Genera *Silene* and *Otites* Adans family *Caryophyllaceae*. *Chem Nat Comp.* 13: 102 – 103.

Davies M.J. 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 305 3: 761-770.

Davis ME et Berdt WD. 1994, Renal methods for toxicology, In Hayes, A.W. (eds) *Principles and methods of toxicology*, 3th Ed. New York Raven, pp 871- 894.

de Kossodo S., Cruz P.D., Dougherty I., Thompson P., Silva-Valdez M., and Beutler B. 1995. Expression of the tumor necrosis factor gene by dermal fibroblasts in response to ultraviolet irradiation or lipopolysaccharide. *J Invest Dermatol.* 104: 318-322.

Debete J.M. 2005. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat de l'université de Bamako, p. 136-140.

Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., 2010. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3):pp. 191-198.

Devulder B, Hatron PY, Hachulla E. 2002. *Physiologie de l'Inflammation*. Edition Cedex: Paris ; 15.

Diallo A. 2005. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineense* willd. (Myrtaceae). Thèse de pharmacie. 43.

Diallo A.M. 2005. Étude des plantes medicinales de niafunke (region tombouctou), phytochimie et pharmacologie de *maerua crassifolia* forsk. (Capparidacée). Thèse de pharmacie; 37.

Djahra A.B. 2014. Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse doctorat. Université Badji Mokhtar – Annaba; p.114.

Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C. 2006. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. Int. J. Aromather. 16: 95-100.

Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani LM., Badoc A., Gmira N. Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 2003. 142 : 61–78.

Dolai N., Karmakar I., Suresh kumar R.B., Kar B., Bala A. and Halder P.K. 2012. Free radical scavenging activity of *Castanopsis indica* in mediating hepatoprotective activity of carbon tetrachloride intoxicated rats. Asian Pac. J. Trop Biomed. 2: S242-S251.

Dorman H.J.D. & Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol., 88, 308-316.

Dotterl S., Wolfe LM., Jurgens A. 2005. Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. Phytochemistry. 66: 203 - 213.

Dunn K., Lutz P. 2003. Finding the balance. SPC. Soap, perfumery and cosmetics. 76: 43–46.

Dupond J. Inflammation et anti-inflammatoires : pour la pratique. Rev Prat. 2003. 53: 520-2.

Dweck A.C. Natural Preservatives – An Update. Formulating Natural Cosmetics, Dweck (A.C.), Ed., Allured Books. 2010. 107-130.

E

El Babili F., Bouajila J., Souchard J.P., Bertrand C., Bellvert F., Fouraste I., Moulis C. & Valentin A. 2011. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. J. Food Sci. 76(3): C512-C518.

El Bouzidi L., Alaoui Jamali C., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Ind. Crop. Prod.* 43: 450- 456.

EL Hamsas EL Youbi A, EL Mansouri L, Boukhira S, Daoudi, A and Bousta D. 2016. In vivo anti-inflammatory and Analgesic Effects of aqueous extract of *Cistus ladanifer* L. from Morocco. *American Journal of Therapeutics*, 23(6) : e1554–e1559.

El Hamsas El Youbi A, Bousta D, Jamoussi B, Greche H, El Mansouri L, Benjlali J, Soidrou SH. 2012. Activités antioxydante, apoptotique et antiproliférative de *Tetraena gaetula* (Emb. & Maire) Beier & Thulin et de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. *Phytothérapie*, 10, 151–160.

EL Mansouri L, Bousta D, Boukhira S, EL Hamsas EL Youbi A, Balouiri M, El Khanchoufi A, Akdime H, Bennani B, Achour S . 2016 . Phytochemical screening and anti-inflammatory property of one recipe from Moroccan traditional medicine. *International Journal of Phyto pharmacology*, 5(2), 2014, 76-84.

EL Rhaffari L. 2008. Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes. Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia., Equipe Environnement et Santé.

Elhabazi K., Ouacherif A., Laroubi A., Aboufatima R., Abbad A., Benharref A., Ziyad A., Chait A. & Dalal A. 2008. Analgesic activity of three thyme species, *Thymus satureioides*, *Thymus maroccanus* and *Thymus leptobotrys*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2: 262-267.

El-Hilaly J., Hmammouchi M., Lyoussi B. Ethnobotanical Studies and Economic Evaluation of Medicinal Plants in Taounate Province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*. 2003: 149–158.

Ostrosky E.A., CecilioMarcondes E.M., de Oliveira Nishikawa S., Lopes P.S., Costa Varca G.H., de Jesus Andreoli Pinto T., Olga Consiglieri T.V., Baby A.R., Velasco M.V.R., and Kaneko T.M.. 2011. *Rubus rosaefolius* Extract as a Natural Preservative Candidate in Topical Formulations. *AAPS PharmSciTech* 12(2): 732-737.

Emberger L. 1971. Considérations sur les genres de la flore Marocaine. In *Travaux de botanique et d'écologie, livre jubilaire*, Paris, Ed. Masson., 520p.

Ennabili A., Gharnit N., El Hamdaoui E. 2000. Inventory and social interest of medicinal, aromatic and honey-plants from Mokrisset region (NW of Morocco). *Stud Bot.* 19: 57 -74.

Ennabili A., Gharnit N., Maach Y., El Meskaoui A., Bousta D. 2006. Exploitation des plantes médicinales et alimentaires du bassin versant de l'oued Laou (nord-ouest du Maroc). *J bot Soc Bot France.* 36: 71-79.

Ertürk, Ö. 2006. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia Bratislava,* 61: 275-278.

Eshmirzaeva NE., Khidyrova NK., Khodzhaeva M., Mezhlumyan LG., Shakhidoyatov KhM. 2005. Chemical composition of *Silene viridiflora*. *Chem Nat Comp.* 41: 451- 453.

Essawi T. and Srour M. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 70: 343-349.

European Pharmacopoeia Commission 5.0 (E.P. 5.0). 2005. Efficacy of Microbial Preservation, Group of Experts no. 1CM (Microbial Contamination). Strasbourg: Council of Europe.

F

Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venâncio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G. & Pedro L.G. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 35–40. Fellah

Farber J.L., Kyle M.E., Coleman J.B. 1990. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest.*, vol. 62(6): 670-679.

Fattorusso W., Ritter O. 2001. *Vademecum cliniques, Du diagnostique au traitement.* 16ème édition Masson m, Italie. P 1915.

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

Fennane M. & Ibn Tatou M. 1998. «Catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc», *Bocconeia* 8, Palermo: 102-103.

Fennane M., Ibn Tattou M., Mathez J., Ouyahya A. & El Oualidi J. 2007. Flore pratique du Maroc, 2. Angiospermae (Leguminosae-Lentibulariaceae); Trav. Ins. Sci. Sér. Bot., n° 38. Institut Scientifique, UMV Agdal, Rabat: 636.

Fernandez X., Chemat F., and Do T.K.T. Les huiles essentielles – Vertus et Applications, Ed. Vuibert. 2012.

Fernandez, X., Merck, F., & Kerdudo, A., 2012. Conservateurs pour cosmétiques Généralités et conservateurs antimicrobiens. Formulation. Techniques de l'ingénieur, J2284.

Finco DR. 1997, Kidney function, In: Kanetto, J.J. Harvey, J.W., Bruce. M.L., editors. Clinical Biochemistry of domestic animal. 5th ed. San Diego, CA: Academic Press, pp 462 – 478.

FIP. 1980. The test for the effectiveness of antimicrobial preservation of pharmaceuticals. Committee of Official Laboratories and Drug Control Services and the Section of Industrial Pharmacists. Pharmaceutica Acta Helvetiae 55 (2): 40–49.

Fitzgerald K.A., Davies A., Russel A.D., 1992. Mechanism of action of chlorexidine diacetate and phenoxyethanol singly and in combination against gram-negative bacteria. Microbios, 70 (284-285) : 215-230.

Flanzy M., Aubert S. Evaluation des composés phénoliques des vins blancs. Ann. Technol. Agriculture. 1969. 18: 27-44.

Fleutentin J, Cabalion P, Balansard G, Dos Santos J. Younos C. 1990. Ethnopharmacologie sources, méthodes, objectifs. Proceedings of the 1st Européen Symposium on Ethnopharmacology. Ed. Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération et Société Française D'ethnopharmacologie; p. 440

Flipo R.M., Hatron P.Y., Devulder B. et al., Maladies inflammatoires. Paris : Masson, 1993.

Fourniat J. Conservateurs antimicrobiens. Actifs et Additifs en Cosmétologie, Martini M-C. & Seiller M., Ed., 3e édition, Lavoisier. 2006. 763-807.

Frederico AV, Higor FL, Elson AC, et al., 2009. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L., Brazil. J Pharmaceut Sci 45: 437–442.

G

Gaidi G., Miyamoto T., Laurens V., and Lacaille-Dubois M. A. 2002. New acylated triterpene saponins from *Silene fortunei* that modulate lymphocyte proliferation. *J Nat Prod.* 65: 1568-1572.

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

Garnero J. Huiles essentielles. *Techniques de l'ingénieur*, K345. 1996.

Garrison M. & Dayan N. Formulating cosmetics with natural oils, fats, butters, and waxes. *Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products*, Dayan N. & Kromidas L., Ed., Wiley. 2011: 215-238.

Gattoa M.A., Antonio Ippolitob, Vito Linsalataa, Nicholas A. Cascaranoa, Franco Nigrob, Sebastiano Vanadiaa, Donato Di Venerea. 2011. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 61 (1): 72–82.

Geis P.A. 2006. Preservation strategies. In: *Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook* 2nd edition (ed. P.A. Geis). CRC Press: 163-180.

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

Georgiev L. 2013. Anti-tyrosinase, antioxidant and antimicrobial activities of hydroxycinnamoylamides. *Med. Chem. Res.* 22: 4173–4182.

Glover, R.E., Smith, R.R., Jones, M.V., Jackson, S.K., & Rowlands, C.C., 1999. An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes, *FEMS Microbiology Letters* 177: 57-62.

Goetz P., Busser C. 2007. *La phytocosmétologie Thérapeutique*. Springer-Verlag France, Paris.13: 11-23.

Golovko VA., Bushneva OA. 2007. Stabilizing Effect of Silene Pectin Polysaccharide on Electrical Activity of the Sinoatrial Area in Frog Heart. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 143: 284 - 286.

Gómez-Sánchez A., Palou E. & López-Malo A. 2011. Antifungal activity evaluation of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on the growth of *Aspergillus flavus* by gaseous contact. *J. Food Prot.*, 74(12): 2192-8.

González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp.* 22(3): 287-93.

Gordon JR., Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature*. 1990. 346: 274-6.

Gorinstein S., Leontowicz H., Namiesnik J., Najman K., Drzewiecki J., Cvikrova M., Martincova O., Katrich E. & Trakhtenberg S. Comparison of the Main Bioactive Compounds and Antioxidant Activities in Garlic and White and Red Onions after Treatment Protocols. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2008. 56: 4418-4426.

Gortzi O., Lala S., Chinou I. & Tsaknis J. 2007. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*. 12: 932–945.

Gouladis M., Tzakoy O., Verykokidoy E. & Harvala C. 2003. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. Res.* 17: 194–195.

Graham GG1., Scott KF. Mechanism of action of paracetamol. *Am J Ther.* 2005 Jan-Feb. 12(1): 46-55.

Grosso C., Figueiredo AC., Burillo J., Mainar AM., Urieta JS., Barroso JG., Coelho JA., Palavra AMF. 2010. Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *J. Sep. Sci.* 33: 2211–2218.

Guimaraes CM., Martinez SS., Pintado AI., Gião MS., Pintado ME., Bento LS. Antioxidant activity – including protective effect against DNA oxidative damage, of sugar molasses. *Journal Food Science*. 2007. 72: 39–43.

Gunter K. D. & Bossow H. 1998. The effect of etheric oil from *Origanum vulgare* in the feed ration of weaned pigs on their daily feed intake, daily gains and food utilization. Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham. 223.

Guo, T.; Wei, L.; Sun, J.; Hou, C.; Fan, L. 2011. Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Masee. Food Chem, 127, 1634-1640.

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

H

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Arnoma O.L. 1987. The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. Anal Biochem. 165: 215-219.

Hammiche Vand Maiza K. 2006. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. Journal of Ethnopharmacology. 105: 358–367.

Hanley, K.S., Schmidt, E., Schmidt, F.M. 1986. Enzymes in serum, their volume in diagnosis, Charles Thomas, Springfield Illinois. pp 70-81.

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

Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C., and Joris J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain. 32: 77-88.

Harrar A. 2012. Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. mémoire de magister, Biochimie et physiologie expérimentale.

Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo A.R., Faleiro M.L. & Miguel M.G. 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. Food Chem. 116: 714–721.

Helander IM, Kilpelainen I, Vaara M (1994) Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a ³¹P-NMR study. Mol. Microbiol. 11: 481-487.

Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem.* 173: 501–513.

Henzen C. 2003. Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum médical suisse.* 19: 442-446.

Hernandez-Perez M., and Rabanal R.M. 2002. Evaluation of the antiinflammatory and analgesic activity of *Sideritis canariensis* var. *pannosa* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 81: 43-47.

Hirst M. 1997. A river of metaphors: interpreting the Xhosa diviner's myth. In: McAllister, P., ed., *Culture and the commonplace: anthropological essays in honour of David Hammond-Took.* Witwatersrand University Press, Johannesburg, South Africa. <https://en.wikipedia.org/>

Horwath A.B., Grayer R.J., Michael Keith Lucas D., Simmonds M.S.J. 2008. Chemical characterization of wild populations of thymus from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical systematic and ecology* 36 117-133.

Huang W., Xue A., Niu H., Jia Z. & Wang J. 2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro.* *Food Chemistry.* 114: 1147–1154.

Hussain A.I. 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of *lamiaceae.* Doctorale thesis, Pakistan. 257.

I

Igarashi H., Northover AM. 1987. Increases in opacity and thickness induced by surfactants and other chemicals in the bovine isolated cornea. *Toxicol. Lett.* 39: 249-254.

Iinuma M., Tsuchiya H., Sato M., Yokoyama J., Ohyama M., Ohkawa Y., Tanaka T., Fujiwara S., and Fujii T. 1994. Flavanones with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus.* *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 892-895.

Ismaili H., Milella L., Fkih-Tetouani S., Ildrissi A., Camporese A., Sosa S., Altinier G., Della Loggia R. & Aquino R. 2004. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 91(1): 31-6.

Ismaili H., Sosa S., Brkic D., Fkih-Tetouani S., Ildrissi A., Touati D., Aquino R. & Tubaro A. 2002. Topical anti- inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettii*. J. Pharm. Pharmacol. 54: 1137–1140.

J

Jacques B., and André R. 2004. Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris: 217-219- 220-223-225.

Jaijoy K., Soonthornchareonnon N., Panthong A., and Sireeratawong S. 2010. Anti-inflammatory and analgesic activities of the water extract from the fruit of *Phyllanthus emblica* Linn. Int. J. Applied Res. Nat. Prod. 3: 28-35.

Jamali CA., El Bouzidi L., Bekkouche K., Lahcen H., Markouk M., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A. 2012. Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. Chem. Biodivers. 9(6): 1188-1897.

Janbaz KH et Gilani AH.1995. Evaluation of the protective potential of *Artemisia maritima* extraction acetaminophen and CCL4-induced liver damage, Journal of Ethnopharmacology 47, 43-47.

Jean B. Séméiologie clinique. 2009. Elsevier Masson. 8ème Edition.430-43.

Jeanmonod D., Gamisans J. Flora Corsica. 2007. Edisud, Aix en Provence.

Jordan M.J. , Martinez R. M., Goodner K. L, Baldwin. E. A, Sotomayor J. A. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. Essential oils composition .Industrial crops and products, 24: 253-263.

Jungkind DL. Antimicrobial resistance : a crisis in health care ; [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a Crisis in Health Care - Clinical Laboratory and Epidemiologic Considerations, held November 11-12, 1993, in Philadelphia, Pennsylvania]. Ed. Plenum Press, New York, NY [u.a.], 1995, p. 248.

K

Kabara J.J. 1996. Chelating agents as preservative potentiators. *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Kabara J.J. & Orth D.S., Ed., Marcel Dekker. 209-226.

Kabara J.J. 1996. Principles for Product Preservation. In *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, (Kabara J.J. & Orth D.S., ed.) . 1-14, Ed., Marcel Dekker, Phoenix.

Kabara J.J., 1984. Cosmetically acceptable phenoxyethanol. In: *Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 79-108, 630-2.

Kabara, J.J. 2006. Hurdle technology for cosmetic and drug preservation. *Cosmetic and Drug Microbiology*, Orth D.S., Kabara J.J., Denyer S.P. & Tan S.K., Ed., *Cosmetic Science and Technology Series 31*: 163-183.

Kang Y-H., Parker C.C., Smith A.C. & Waldron K.W. Characterization and distribution of phenolics in carrot cell walls, *Journal of Agricultural Chemistry*. 2008. 56: 8558-8564.

Kang D.G., Yun C.K., et Lee H.S. 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacol.* 87: 231-236.

Karagöz A., Doruöz N., Zeybek Z., Aslan A. 2009. Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(12): 1034-1039.

Karagözler A., Erdag C.S., Çalmaz Emek Y. 2008. Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*. 111: 400-407.

Karumi Y., Onyeyili P.A., and Ogugbuaja V.O. 2004. Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J. Medical Sci.* 4: 179-182.

Kayode Ajibesin N K. 2012. Ethnobotanical survey of plants used for skin diseases and related ailments in Akwa Ibom State. *Ethnobotany Research & Applications*. 10: 463-522.

Kerdudo A. 2014. Optimisation de la conservation des cosmétiques: impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation. Thèse de Doctorat, Nice.

Khabbach A, M. Libiad, A. Ennabili, D. Bousta 2012. Medicinal and cosmetic use of plants from the province of Taza, Northern Morocco. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11 (1), 46 - 60.

Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 9: 229–245.

Klis F.M. 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast*. 10: 851–869.

Koleva II., van Beek TA., Linszen JP., de Groot A., Evstatieva LN. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal.* 13(1): 8-17.

Krishnamurthi S., Chadha Y. 1972. *The Wealth of India*. CSIR: New Delhi, India. 177–183.

Kubena LF, Harvey RB, Huff WE, Elissalde MH, Yersin AG, Phillips TD et Rottinghaus GE. 1993. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol, *Journal of Poultry Sciences* 72: 51-59

Kucukboyaci N., Ozcelik B., Adiguzel N., Goren AC. 2010. Fatty acid compositions of *Silene vulgaris* and *S. cserei* subsp. *aeniopsis* seeds and their antimicrobial activities. *Chem Nat Comp.* 46: 188 - 191.

Kunicka-Styczyńska A, Sikora M and Kalemba D. Lavender, tea tree and lemon oils as antimicrobials in washing liquids and soft body balms. *Int J CosmetSci*, 2011; 33: 53-61.

L

Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M. & Hseini S. *Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental)*. Ed. LEJEUNIA, Belgique; p. 13.

Lamaison J.L., Carnat A. 1991. Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC., en fonction de la période de végétation. *Plantes Med. Phytother.* 25: 12-16.

Lambert, R.J.W., Hanlon, G.W., & Denyer, S.P. 2004. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Applied Microbiology* 96: 244-253.

Lambert RJW and Skandamis PN. 2001. A Study of the Minimum Inhibitory Concentration and Mode of Action of Oregano Essential Oil, Thymol and Carvacrol. *Journal of applied Microbiology* 91(3): 453–62.

Latte LP, Kolodziej H. 2000. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch* 55(5-6): 467-72

Le Bolzer V. *Phytocosmétologie: description de 40 plantes d'usage courant*. 2004.

Lee JY., Chang EJ., Kim HJ., Park JH., Choi SW. 2002. Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Arch. Pharm. Res.* 25(3): 313-9.

Lee T.Y., Mai L.M., Wang G.J., Chiu J.H., Lin Y.L., Lin H.C. 2003. Protective mechanism of *salvia miltiorrhiza* on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 91: 202–210.

Leitao DP, Polizello AC, Ito IY, Spadaro AC. 2005. Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J. Med. Food* 8 (1): 36-40.

Lemhadri A., Zeggwagh N.A., Maghrani M., Jouad H. & Eddouks M. 2004. Anti-hyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. *J. Ethnopharmacol.* 92 : 251–256.

Liang LV., F.H., Yuan Q., and Li C., *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*. 2011. 44: 3057-3064.

Lien E.J., Ren S.J., Bui H.Y.H. and Wang R.B. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine.* (26) 285-294.

Lonjon J.B. 2015. Intérêt de la résolution de l'inflammation dans le traitement des maladies parodontales. *Médecine humaine et pathologie*; p. 7.

Loziene K., Venskutonis P. R. 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides* *Biochemical systematic and ecology*, 33 517-525.

M

Maccioni AM, Anchisi C, Sanna A, Sardu C, Dessi S. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. *Int J CosmetSci*, 2002; 24: 53–59

Mahesh, B. & Satish, S. 2008. Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant against Plant and Human Pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, Vol.4, No.4(S), pp. 839-843, ISSN 1817-3047

Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K. 2011. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology* 133 (2):261-277.

Maire R. 1952–1987. *Flora de l’Afrique du Nord* 16 vols. P. Lechevalier, Paris.

Male D., Roitt Y., Brostoff J., Roth D.B. 2007. Mécanisme de l’immunité innée. In: *Immunologie*. Eds, Masson (France): 155.

Mamadalieva N.Z., Rene Lafont and Michael Wink. 2014. Diversity of Secondary Metabolites in the Genus *Silene* L. (Caryophyllaceae)—Structures, Distribution, and Biological Properties. *Diversity* 6, 415-499.

Mamadalieva NZ., Saatov Z., Kachala VV., Shashkov AS. 2002. Phytoecdysteroids of plants of the *Silene* genus. 2- Deoxyecdysterone 25-acetate from *Silene wallichiana*. *Chem Nat Comp*. 38: 179-181.

Mamadalieva NZ., Zibareva LN., Saatov Z. 2002. Phytoecdysteroids of *Silene linicola*. *Chem Nat Comp*. 38: 268 - 271.

Mann C.M., Cox S.D. & Markham J.L., 2000.-The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30: 294-297.

Manou I, Bouillard L. 1998. Devleeschouwer MJ, Barel AO. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *J Appl Microbiol*. 84:368-378.

- Marc F, Davin A, Deglène-Benbrahim L, Ferrand C, Baccaunaud M et Fritsch P. 2004. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S : médecine sciences*; 20 (4): 458-463.
- Marchand G., Barrette MC., Lesage J., Larue M. Méthodes de laboratoire, dénombrement des bactéries et moisissures cultivables de l'air prélevées sur filtre de polycarbonate. Publié par IRSST. 2011.
- Marnett LJ. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.*, vol. 21(3): 361-370.
- Martinez-Cayuella M. 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.*77: 147- 161.
- Martini M.C, Seiller M.2006 .actifs et additifs en cosmétologie.
- Martins, N.; Barros, L.; Henriques, M.; Silva, S.; Ferreira, I.C.F.R. 2015. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Ind. Crops Prod.* 74: 648–670.
- McEver R.P., Beckstead J.H., Moore K. L., Marshall-Carlson L., and Bainton D. F. 1989. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 84: 92-99.
- McKenzie R.C., and Sauder D. N. 1990. The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J Invest Dermatol.* 95: 105S-107S.
- Mehdioui R., Kahoudji A. 2007. Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène : cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). *Bull Inst Scient (Rabat), section Sciences de la Vie.* 29: 11 - 20.
- Mheen (van der) H. 2006. Selection and production of oregano rich in essential oil and carvacrol. *Acta Hort.* 709: 95–99.
- Mila I., Scalbert A. 1994. Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: A new hypothesis. *Acta Horticulturae.* 381 (2): 749-755.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinatan V. & Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clinic Science.* 84: 407-412.
- Miquel-Becker E., Niessen L.R. & Skibsted L.H. 2004. Antioxidant evaluation protocols: foods quality or health effects. *Food Research and Technology.* 219: 561-571.

Miraliakbari H., and Shahidi F. 2008. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem.* 111: 421–427.

Miura K., Kikuzaki H. & Nakatani N. 2002. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1851–1854.

Mogosanu GD., Grumezescu AM., Mihaiescu DE., Istrati D., Mogosanu DE., Alice Buteica S. 2011. Identification of sugars from *Silene albae* herba using GC–MS technique. *U.P.B. Sci Bull Series B.* 73: 101 - 108.

Molyneux P., 2004. Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2): 212.

Moon J-K., and Shibamoto T. 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* 57 (5): 1655-1666.

Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Nojnov R. 2006. Antioxydant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Rad Res:* 40(2): 223-31.

Mun FY., Lee FA., Omar ZA., Ibrahim MS., Hesham AA., Mohd ZA. Anti-inflammatory and Analgesic Effects of *Elephantopus tomentosus* Ethanolic Extract. *J Acupunct Meridian Stud.* 2009. 2(4): 280–287.

Murphy Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 1999. 564-582.

Mussard J. Les parabens, des conservateurs omniprésents: un risque pour la santé, dissertation doctorale, 2006. Brannan, 1995.

N

Nakiboglu M., Urek R.O., Kayali H.A. & Tarhan L. 2007. Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. *Food Chem.* 104: 630–635.

Nastro, A., Cannatelli, M.A., Morelli, I., Cioni, P.L., Bader, A., Marino, A., & Alonzo, V. 2002. Preservative properties of *Calamintha officinalis* essential oil with ant without EDTA, *Letters on Applied Microbiology*, 35: 385-389.

Nathan C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature*, 19-26,420, 846-852.

Nazer, a. I., a. Kobilinsky, J. L. Tholozan, and F. Dubois-Brissonnet. 2005. "Combinations of Food Antimicrobials at Low Levels to Inhibit the Growth of *Salmonella* Sv. Typhimurium: A Synergistic Effect" *Food Microbiology* 22(5):391–98.

NCCLS, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard — Eleventh Edition. CLSI document M02 A11 Wayne, PA, Clinical and laboratory standards institute.

Ng A., Parker M.L., Parr A.J., Saunders P.K., Smith A.C. & Waldron K.W. Physicochemical Characteristics of Onion (*Allium cepa* L.) Tissues. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2000. 48: 5612–5617.

N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traore D. and Ake-Assi L. 2009. [Phytochemical screening of some ivorian medicinal plants used by the Krobou people (Agboville, Cote-d'Ivoire)]. *Sci. Nat.* 6: 1-15, (In French).

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. *L'essentiel en microbiologie*, Ed Berti. 2000. 365p., Paris. Baker S., Nicklin J., Khan N. 2007. *Microbiology*, Ed. revue de: *Microbiology* / J. Nicklin, K. Graeme-Cook and R. Killington. 2nd ed. 2002, Taylor & Francis Group, New York. Beveridge, 2001

Nordine A, Hmamouchi M, El Meskaoui A. *In vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis of *thymus broussonetii* – a vulnerable aromatic and medicinal plant species. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science* 2014; 3(1): 425-439

Nordine A, Tlemcani Chendid R and EL Meskaoui A. Micropropagation of *Thymus satureioides* Coss. an endangered medicinal plant of Morocco. *Journal of Agricultural Technology* 2013, Vol. 9(2):487-501.

Nostro A, Cannatelli MA, Morelli I, Cioni PL, Bader A, Marino A and Alonzo V. Preservative properties of *Calamintha officinalis* essential oil with and without EDTA. *Lett Appl Microbiol*, 2002b; 35: 385-389.

Nostro A, Cannatelli MA, Morelli I, Musolino AD, Scuredi F, Pizzimenti F, Alonzo V. Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. *J Appl Microbiol*, 2004a; 97: 395–401.

Nourshargh S., Fritz K., et Elisabetta D. 2006. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of Leukocyte Biology*. 80: 714-718.

O

OCDE, 1981. Ligne Directrice De L'OCDE Pour Les Essais De Produits Chimiques. « Toxicité Cutanée à Doses Répétées : Étude à 21/28 Jours », Essai n° 410.

OCDE, 1987. Ligne Directrice De L'OCDE Pour Les Essais De Produits Chimiques « Toxicité Cutanée Aiguë » Essai n° 402.

OCDE, 2002. Ligne Directrice De L'OCDE Pour Les Essais De Produits Chimiques. « Toxicité orale aiguë » Essai n° 420.

Odriozola-Serrano I., Soliva-Fortuny R. & Martin-Belloso O. 2008. Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*. 228: 239-248.

OECD n°438. 2013. OECD Guideline for the testing of chemicals No 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development.

Okazaki K., Kawazoe K., Takaishi Y. 2002. Human platelet aggregation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Phytother. Res.* 16(4): 398–399.

Oludemi Taofiq, Ana M. González-Paramás, Maria Filomena Barreiro and Isabel C. F. R. Ferreira. 2017. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules* 22: 281-304.

Ostrosky EA, Maria E, Marcondes C, Nishikawa SDO, Lopes PS, Henrique G, Kaneko TM. *Rubus rosaefolius* Extract as a Natural Preservative Candidate in Topical Formulations. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2011; 2: 732–737.

Ouedraogo M., Baudoux T., Stévigny C., Nortier J., Colet J.M., Efferth T., Qu F., Zhou J., Chan K., Shaw D., Pelkonen O., Duez P. 2012. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *Journal of Ethnopharmacology*. 140: 492–512.

Ovodova R.G., Bushneva O.A., Shashkov A.S., Ovodov Yu., Russ S.2000. Structural studies and physiological activity of lemnan, a pectin from *Lemna minor* L. J. Bioorg. Chem. 26: 616–622.

Oyedemi S.O., Okoh A.I., Mabinya L.V., Pirochenva G., and Afolayan A.J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology. 2009. 8: 1280-1286.

Ozkan G., Sagdic O., Ekici L., Ozturk I. & Ozcan M.M. 2007. Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. Extract, and its antioxidant and antibacterial activities. J. Food Lipids. 14: 157–169.

P

Panikov N.S. 1995. Microbial growth kinetics. Springer Science & Business Media, Chapman & Hall, London.

Parada M., Bonet M.À., Carrió E., Vallès J. 2009. Ethnobotany of the Alt Empordà region (Catalonia, Iberian peninsula). Plants used in human traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology. 124 : 609–618.

Pauli A. 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. Int. J. Aromather. 11: 126-133.

Pederneraa AM , Guardiaa T, Calderonb CG, Rotelli AE, de la Rochaa NE, Di Genaroc S, Pelzer LE. 2006. Anti-ulcerogenic and anti-inflammatory activity of the methanolic extract of *Larrea divaricata* Cav. in rat. Journal of Ethnopharmacology 105: 415–420.

Pei, K.; Ou, J.; Huang, J.; Ou, S. 2016. p-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. J. Sci. Food Agric. 96: 2952–2962.

Pittet D., Boyce J.M. 2001. Hand hygiene and patient care: pursuing the Semmelweis legacy. Lancet Infect. Dis. 1: 9–20.

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. 2001. Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN. 185573-463X.

Porracchia J.F. Microbiological limit testing: microbial specifications for finished products. *Cosmetic and Drug Microbiology*, Orth D.S., Kabara J.J., Denyer S.P. et Tan S.K., Éd. *Cosmetic Science and Technology Series*. 2006. 31: 233-242.

Portes E. 2008. Synthèse et Etudes de étrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse de doctorat. N° 3695. Université Bordeaux I. 244p.

Pourmorad F., Hosseinimehr S.J., Shahabimajd N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5(11): 1142.

Prakash A., 2001. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories analytical progress*. 19 (2): 2.

Prior R. L., Wu X. L. & Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290–4302.

Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *J Agric Food Chem.* 48 (8): 3396 -3402.

Q

Quezel P., Santa S. *Nouvelle flore de l'Algérie*, Tome II. 1963. Edition CNRS, Paris. 11.

R

Ramadan A., Soliman G., Mahmoud S.S., Nofal S.M. and Abdel-Rahman R.F. 2012. Evaluation of the safety and antioxidant activities of *Crocus sativus* and Propolis ethanolic extracts. *J. Saudi Chem. Soc.* 16: 13-21.

Rankin JA. 2004. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues*. 15: 3 -17.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.

Refsgaard H.H., Tsai L., Stadtman E.R. 2000. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 97(2): 611-616.

Règlement (CE) N° 1223/2009 du parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques, Journal officiel de l'Union Européenne.

Règlement (UE) No 2016/1121 de la commission du 11 juillet 2016 modifiant l'annexe V du règlement (CE) no 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

Revillard J.-P. 2001. Immunologie, 4e edition edn, De Boeck & Larcier.

Rigat M., A`ngels Bonet M., Garcia S., Garnatje T., Valle`s J. 2007. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Journal of Ethnopharmacology. 113: 267–277.

Rivero-Pérez MD., Muniz P., Gonzalez-Sanjósé ML. 2007. Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. J. Agric. Food Chem. 11: 5476-5483.

Rongping Z., Cheng Z., Yineng H., Ninghua T., Jun Z. Three new cyclopeptides from *Silene szechuensis*. Acta Bot. Yunnanica. 1997: 304–310.

Rousselet M C, Vignaud, J M, Hofman P, Chatelet F P. 2005. Inflammation et pathologie inflammatoire AFECAP, 1-57.

Ruberto G., Baratta M.T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chem. 69: 167–174.

S

Janakat S., and Al-Merie H., 2002. Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*, Journal of Ethnopharmacology 83: 135-138.

Sahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., et al., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control. 15: 549–557.

Saint-Mezard P., Bosset S., Cousin F., Ionesco M.A., and Nicolas J. F. 2002. Mast cells and the skin. Rev Fr Allergol Immunol Clin. 42: 193-198.

Salhi S., Fadli M., Zidane L., Douira A. 2010. "Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc), "Lazaroa. 31: 133-146.

Sangita C., priyanka C. Evaluation of in-vitro ant-inflammatory 2012. 2(suppl1):s. 178- s180.

Sarneckis C., Dambergis RG., Jones P., Mercurio M., Herderich MJ., Smith P. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. Australian Journal of Grape and Wine Research. 2006. 12(1): 39-49.

Scherrer A.M., Motti R., Weckerle C.S. 2005. "Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy), "Journal of Ethnopharmacology. 97: 129-14.

Schlumbaum A., Maueh F., Vogeli V., Boller V. 1986. Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth, Nat. 324: 365-367

Seo SB, Ryu CS, Ahn GW, Kim HB, Jo BK, Kim SH, Lee JD and Kajiuchi T. Development of a natural preservative system using the mixture of chitosan-*Inula helenium* L. extract. Int J of cosmetic Sc, 2002; 24: 195-106.

Shimamoto T. & Hiroyuki M. A model for the evaluation and prediction of preservative activity in oil-in-water emulsions. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1979. 27: 2743-2750.

Siddhuraju P., Becker K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. Food Chem. 101: 10-19.

Siegert W. 2006. The benefit of using synergistic mixtures of preservatives. SÖFW-journal, 132.

Singleton VL., Rossi JA. 1995. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16: 144–158.

Sircar D., Roychowdhury A., Mitra A. Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota*. Journal of Plant Physiology. 2007. 164: 1358-1366.

Sivakumaran S, Molan AL, Meagher LP, Kolb B. 2004. Variation in antimicrobial action of pranthocyanidins from *Dorycrum rectum* against rumen bacteria. Phys Chem: 5(3):106-111

Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 18: 463–470.

Sobiecki JF. 2008. A review of plants used in divination in southern Africa and their psychoactive effects. *Southern African Humanities.* 20: 333-351.

Sözmen F., Uysal B., Köse E.O., Aktaş O., Cinbilgel I. & Oksal B.S. 2012. Extraction of the essential oil from endemic *Origanum bilgeri* P.H.Davis with two different methods: comparison of the oil composition and antibacterial activity. *Chem. Biodivers.* 9(7): 1356-63.

Stossel H., Koch F., Kampgen E., Stoger P., Lenz A., Heufler C., Romani N., and Schuler G. 1990. Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 172. 1471-1482.

Sundberg A., Appelkwist E.L., Dallner G. et Nilsson R. 1994. Glutathione transferase in the urine: sensitive methods for detection of kidney damage induced by nephrotoxic agents in humans, *Environ Health Perspect* 102: 293- 296

Swain T., Hillis WE. The phenolic constituents of *prunus domestica* L. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the science of food and and agriculture.* 1959. 10: 63-68.

T

Tantaoui El araki A., Errifi A., Benjlali B. , Lattaoui N. 1992. Antimicrobial activity of four chemically different essential oils *Rivista Italiana Eppos Sesto Numero-Aprile.*92.

Teodoro, G.R.; Ellepola, K.; Seneviratne, C.J.; Koga-Ito, C.Y. 2015. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: A review. *Front. Microbiol.*, 6: 1–11.

Tepe B., Daferera D., Soğkmen M., Polissiou M. & Soğkmen A. 2004. The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origanum syriacum* L. var. *bevanii*. *J. Sci. Food Agric.* 84: 1389–1396.

Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M. & Sokmen A. 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var.

sipyleus and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *roslans*, *Journal of Food Engineering*. 4: 447-454.

Terrab A., Garcia-Castano JL., Romero JM., Bergano R., De Vega C., Talavera S. 2007. Analysis of amino acids in nectar from *Silene colorata* Poiret (Caryophyllaceae). *Bot J Linnean Soc.* 155: 49 - 56.

The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (Colipa), cosmetic Toiletry and Fragrance Association. *Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products*. 2004. p. 1-8.

The SCCP's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 6th revision December 2006 link.

Theisen-Popp P, Muller-Psddinghaus R. 1994. Antirheumatic drug profiles evaluated in adjuvant rats by multiparameter analysis. *Agents Actions*; 42:50.

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

Timbo B. 2003. Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* vahl (meliaceae) . Thèse de pharmacie; 47-50.

Tizard, I.R., 1996. Inflammation. In: Tizard, I.R. (Ed.), *Veterinary Immunology: An Introduction*, 5th Ed., W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 43-54.

Touitou Yvan. 1993. *Pharmacologie Diplôme d'Etat d'Infirmier (e)*, 7eme édition Paris. 407p.

Traboulsi A.F., Taoubi K., El-Haj S., Bessiere J.M. & Rammal S. 2002. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 58: 491–495.

Trombetta D. et al., 2002. Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant, β -unsaturated aldehydes. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 285-290.

U

Ulanowska K .2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbial.* 184 (5): 271-8.

Ultee, A., M. H. J. Bennik, and R. Moezelaar. 2002. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food- Borne Pathogen *Bacillus Cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4):1561–68.

Ultee, Annemieke, Edwin P. W. Kets, Mark Alberda, Folkert A. Hoekstra, and Eddy J. Smid. 2000. “*Bacillus Cereus*.” 233–38.

Uyen T., Clare B., Guo W. & Martinac B. The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. *European Biophysics Journal*. 2005. 34: 389-395.

V

Van Luyn M.J.A., Plantinga J.A, Brouwer L.A, Khouw I.M.S.L., De Leij L.F.M.H., et Van Wachen P.B. 2001. Repetitive subcutaneous implantation of different types of (biodegradable) biomaterials alters the foreign body reaction. *Biomaterials* 22: 1385-1391.

Venkateswaran S, Pari L, Viswanathan P et Menon V.1995. Protective effect of livex, an herbal formulation against erythromycin estolate induced hepatotoxicity in rats, *Journal of Ethnopharmacology* 57: 161-167.

Vigan M. 2009. Lecture des tests épicutanés. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*. 136: 606-609.

Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M., Jang J. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem*. 43: 2800–02.

W

Wallace M, Staats P.S. 2004. *Pain medicine and management: just the facts*. McGraw-Hill (New York), p: 48.

Wantana R, Tassanee N, Subhadhirasakul S. 2009. Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals. *J Nat Med* 63: 290–296

Weill B., Batteux F. Immunopathologie et réactions inflammatoires. Bruxelles : De Boeck. 2003.

Willey J.M. 2008. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology-7th international ed., Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton. New York, McGraw-Hill Higher Education.

Williams I.R., and Kupper T. S. 1996. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci.* 58: 1485-1507.

Winter C.A., Risley E.A. and Nuss G.W. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Exp. Biol. Med.* 111: 544-547.

Wiseman H. & Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role of inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal.* 313: 17–29.

Woodruff J. 1999. Exploiting synergies in preservatives. *Manuf. Chemist.* 70: 18–20.

Woodward S.C. (1999). Evaluation by light microscopy. Dans *Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials* (Von Recum A.F., Anderson J.M., Ash S.R., Cooke F.W., Gross U.M., La Berge M., et Lawrence W.H., Eds). 2ème édition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 599-612.

Wu J., Lin L., Chau FT. 2001. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochem.* 8: 347–52.

X

Xiang Z.B., Tang C.H., Chen G. & Shi Y.S. 2001. Studies on colorimetric determination of oleanolic acid in Chinese quince. *Natural Product Research and Development.* 13(4): 23–26.

Xie, L., Hettiarachchy, N.S., Jane, M.E., & Johnson, M.G. 2003. Antimicrobial activity of Ginkgo biloba leaf extract on *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Science*, 68: 268-270.

Y

Yam M.F., Ang L.F., Ameer O.Z., Salman I.M., Aziz H.A. and Asmawi M.Z. 2009. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Elephantopus tomentosus* ethanolic extract. J. Acupuncture Meridian Stud. 2: 280-287.

Yang, W.S.; Jeong, D.; Yi, Y.; Park, J.G.; Seo, H.; Moh, S.H.; Hong, S.; Cho, J.Y. 2013. Targeted Anti-Inflammatory Action of Caffeic Acid. Mediat. Inflamm., 2013: 518183.

Yann-Olivier Hay, Miguel Antonio Abril Sierra, Mayra Tellez, Luis G. Sequeda C., alba N. Tellez A., Catherine Bonnafous, Christine Raynaud. 2015. Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Parameters of Essential Oils and Hydrosols of Colombian Thyme and Rosemary Obtained Using Two Different Steam Distillation Methods International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients 2:7.

Z

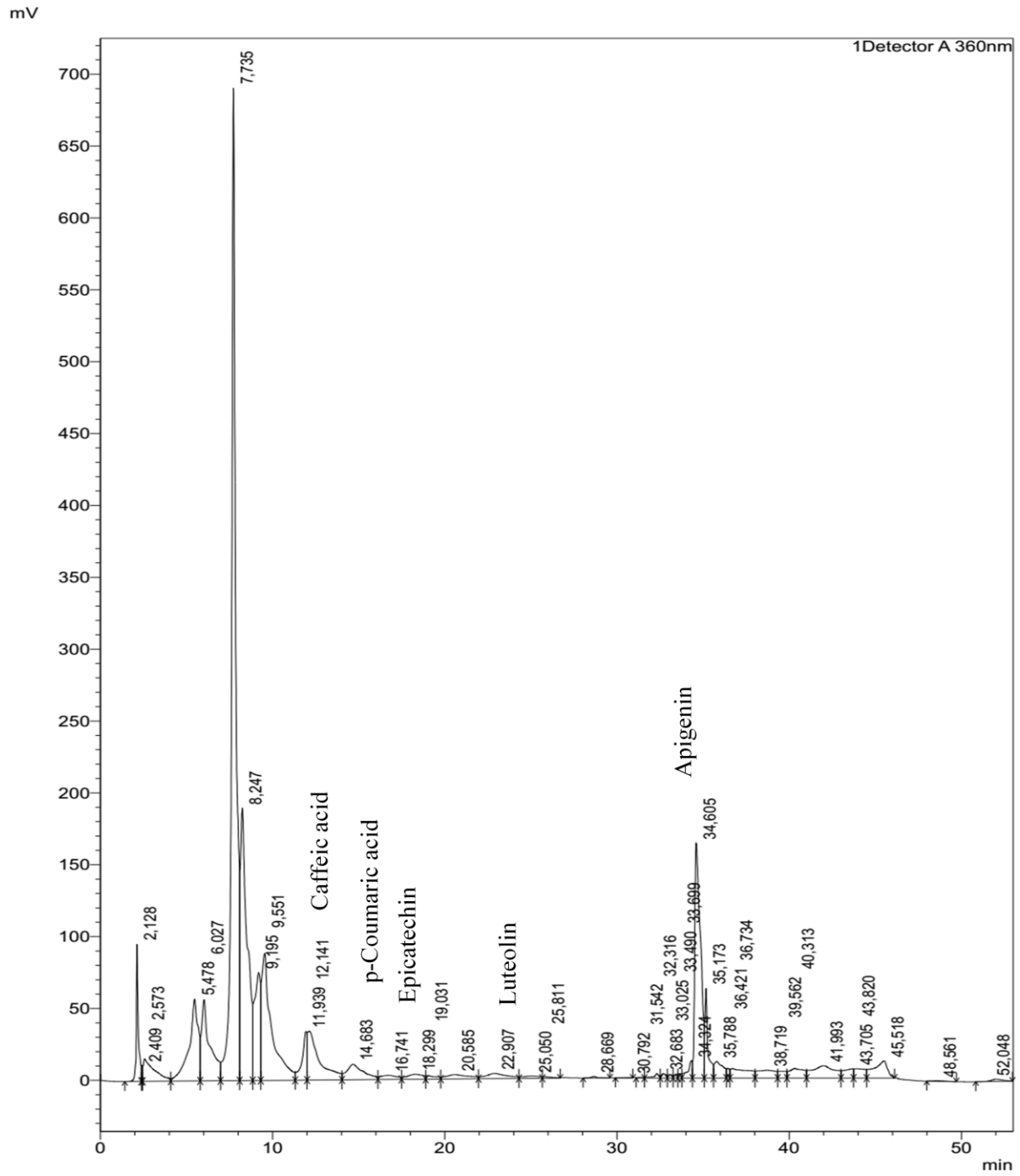
Zenasni L. 2014. Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth et du genre *Nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne. Thèse doctorat, Université Mohammed V rabat; p.5

Annexes

Annexe N°01:

Chromatogramme d'analyse par HPLC

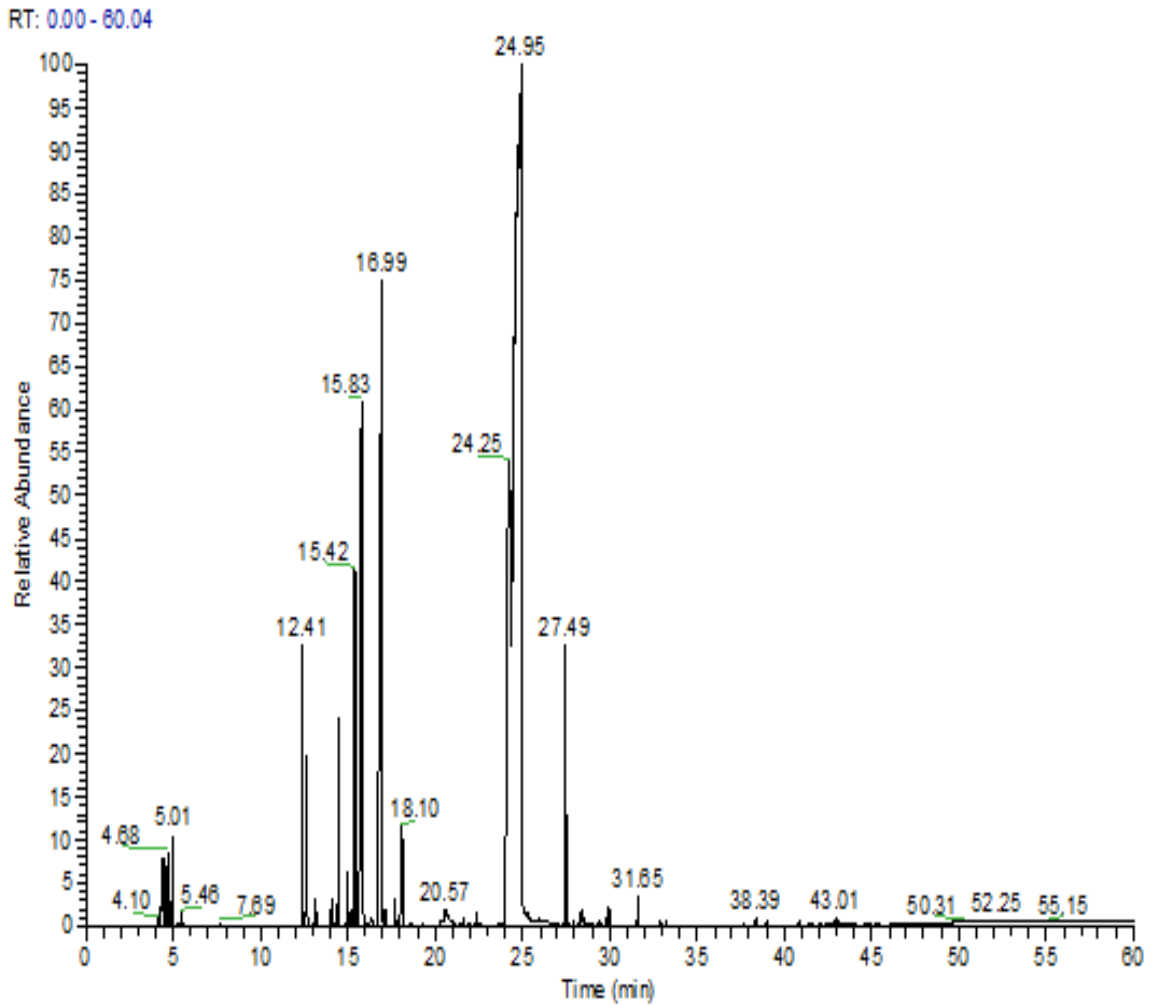
Chromatogramme de l'extrait de *S. vulgaris* (Moench) Garcke par HPLC :



Annexe N°02:

Chromatogramme d'analyse par CPG/SM

Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Origanum elongatum* Emb. Et Maire. :



Annexes N°03:

Chromatogramme d'analyse par CPG/SM

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus broussonetii* Boiss. :

RT: 0.00 - 60.01

