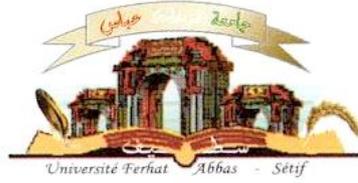


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2014

THÈSE

Présentée par

Boussoualim Naouel

Pour obtenir le diplôme de

Doctorat en Sciences

Option : Microbiologie

THÈME

**Activités biologiques de plantes médicinales: *Anchusa azurea Mill.*
et *Globularia alypum L.***

Soutenue publiquement le 25/06/2014

DEVANT LE JURY

Président : Zerroug Mohamed Mihoub

Pr. UFA Sétif 1

Directeur: Baghiani Abderrahmane

Pr. UFA Sétif 1

Examineurs: Zellagui Amar

Pr. U. Oum Bouaghi

Idoui Tayeb

MC. U. Jijel

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Liste des publications dans des revues:

- **Boussoualim N**, Trabsa H, Krache I, Arrar L, Khenouf S, Baghiani A. (2014). Anti-bacterial and β -Lactamase inhibitory effects of *Anchusa azurea* and *Globularia alypum* extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5(1): 742-749.
- A. Baghiani, **N. Boussoualim**, S. Boumarfeg, H. Trabsa, S. Aouachria, L. Arrar. 2013. *In vivo* Free Radical Scavenging, antihemolytic activity and antibacterial effects of *Anchusa azurea* extracts. *International journal of medicine and medical sciences*, 46, 2051-5731.

Liste des communications:

- Communication affichée pour les journées internationales de biotechnologie (JIB 2011) du 19 au 23 Décembre 2010 à Sousse (Tunisie). Antioxydant effects and antibacterial activity of *Anchusa azurea* Extracts. **Boussoualim N**, Trabsa H, Boumerfeg S, Aouachria S, Djermouni M, Charef N, Arrar L, Baghiani A.
- Communication orale pour le Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. 08-10 Mai 2012 à Sidi Bel Abbès, Algérie. **Boussoualim N**, Trabsa H, Aouachria S, Djermouni M, Boumerfeg S, Arrar L, Baghiani A. L'activité anti-hémolytique et anti-oxydante in vivo d'une plante médicinale *Anchusa azurea*
- Communication orale pour le Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. 08-10 Mai 2012 à Sidi Bel Abbès, Algérie. Trabsa H, **Boussoualim N**, Aouachria S, Djermouni M, Boumerfeg S, Arrar L, Baghiani A. Xanthine oxidase inhibition and antibacterial effects of *Globularia alypum*.
- Communication affichée pour le 2nd African congress on biology and health, 10-12 Novembre 2012 à Sétif, Algérie. **Boussoualim N**, Trabsa H, Krache I, Arrar L, Baghiani A. Protective effects of *Globularia alypum* L. extracts against xylene induced ear edema in mice.

Liste des publications dans des actes de proceedings:

- **Boussoualim N**, Trabsa H, Aouachria S, Djermouni M, Boumerfeg S, Arrar L, Baghiani A. L'activité anti-hémolytique et anti-oxydante *in vivo* d'une plante médicinale *Anchusa azurea*. Le Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. 08-10 Mai 2012 à Sidi Bel Abbès.
- Trabsa H, **Boussoualim N**, Aouachria S, Djermouni M, Boumerfeg S, Arrar L, Baghiani A. Xanthine oxidase inhibition and antibacterial effects of *Globularia alypum*. Le Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. 08-10 Mai 2012 à Sidi Bel Abbès
- **Boussoualim N**, Trabsa H, Krache I, Arrar L, Baghiani A. Protective effect of *Globularia alypum* L. extracts against xylene induced ear edema in mice. 2nd African congress on biology and health.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biochimie Appliquée et a été financé par des organismes (CNEPRU, ATRSS,) rattachés au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Pr. Baghiani A. qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de cette thèse en me prodiguant toute aide disponible, et en me consacrant de son temps précieux.

Ma vive reconnaissance va au Pr. Zerroug MM. professeur à l'université de Sétif 1 d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de thèse, ainsi qu'aux Pr. Idoui T. de l'université de Jijel et de Zellagui A. de l'université de Oum El Bouaghi d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Dr. Ouhida S. maitre assistante au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Sétif, ainsi que tous les techniciens et stagiaires du laboratoire pour leur aide précieuse dans la réalisation des coupes histologiques.

Je remercie Pr. Touabti A. responsable du laboratoire Central de l'Hôpital Universitaire de SETIF. Mes sincères remerciements vont également à tout le personnel de ce laboratoire pour leurs diverses contributions.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail et que je ne l'ai pas mentionné par son nom, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

RESUME

Anchusa azurea (AA) et *Globularia alypum* (GA) sont des plantes très utilisées dans la médecine traditionnelle en Algérie, connues sous le nom: Hamham et Tasselgha, respectivement. Empiriquement, elles semblent efficaces dans le traitement de diverses maladies. Dans la présente étude différents extraits ont été préparé par l'utilisation de solvant à polarité croissante. Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc) est le plus riche en polyphénols, alors que l'extrait chloroformique (ECh) est le plus riche en flavonoïdes pour AA et l'EAc pour GA. L'effet antibactérien des extraits est évalué par la technique de diffusion sur l'agar vis-à-vis 11 souches ATCC. L'ECh et EAc des deux plantes sont les plus actifs sur la plupart des bactéries. Dans le test de la synergie avec la Gentamicine, des effets additifs, potentiels, antagonistes et synergiques ont été remarqués. Les extraits aqueux EAq-AA, EAq-GA et méthanolique EBr-GA ont montré une activité inhibitrice sur les β -lactamases dont le pourcentage d'inhibition varie entre 38% et 50% à une concentration de 1.25 mg/ml. L'EAc-GA, l'EBr-GA et l'EAc-AA présentent une activité anti-radicalaire très importante en utilisant le test de piégeage du radical DPPH (IC_{50} = 38.15, 37.48 et 68.35 μ g/ml, respectivement). EAc-GA, EBr-GA et EAc-AA présentent la plus grande activité dans l'inhibition de l'oxydation de β -carotène/acide linoléique (84.33%, 84.05% et 76.21%, respectivement). Tous les extraits ont augmenté les temps de demie hémolyse, d' HT_{50} (Half-Hemolysis Time) de façon dose dépendante. La concentration 84.74 μ g/ml des extraits ECh-GA et EAc-GA a renforcé significativement le système anti-radicalaire érythrocytaire. L'activité antioxydante des extraits est confirmée chez les souris, l'administration de l'EBr-AA (100 et 200 mg/kg/jour) et de l'EBr-GA, EAc-GA et EAq-GA (100 mg/kg/jour) pendant 21 jours a entraîné une amélioration de la capacité antioxydante totale du sang et de la capacité antioxydante plasmatique. L'extrait EAc-GA révèle l'inhibition la plus puissante de la xanthine oxydase d'origine bactérienne. Les extraits EBr-GA, ECh-GA et EAq-GA renferment des inhibiteurs compétitif, les extraits EAc-GA, EAc-AA et ECh-AA sont des inhibiteurs non compétitifs alors que les extraits EBr-AA et EAq-AA renferment des inhibiteurs incompétitifs. Une étude *in vivo* réalisée sur des modèles hyperurécémiques a montré que les extraits EBr-AA et EAq-AA ont provoqué une diminution de 66% de l'acide urique plasmatique suivis par les extraits ECh-GA, EAc-GA. L'activité anti-inflammatoire chez les souris en utilisant le PMA a montré que les extraits bruts des deux plantes ont réduit le poids d'œdème de l'oreille. En conclusion, ces plantes possèdent un fort pouvoir pharmacologique, ce qui supporte leur introduction en pharmacie.

Mots clés : Flavonoïdes et polyphénols, Antibactérienne, Synergie, β -lactamase, Antioxydant, Anti-hémolytique, XO, Hyperurécémie, Anti -inflammatoire.

SUMMARY

Anchsa azurea (AA) and *Globularia alypum* (GA) are medicinal plants largely used traditionally in folk medicine in Algeria, locally named: Hamham and Tasselgha, respectively. They are effective in the treatment of various diseases. In this study, the preparation of various extracts from *Anchsa azurea* (AA) and *Globularia alypum* (GA) using solvent with increasing polarity were determined. The quantification of polyphenols and flavonoids showed that the extract ethyl acetate (AcE) contains the higher amount of polyphenols. However, chloroform extract (ECh-AA) and EAc-GA present the higher amount of flavonoids. The antibacterial effect was evaluated using the diffusion method on agar against 11 ATCC strains. The ECh, EAc were more active on the most bacteria. In synergy test with Gentamicin, additive, potential, antagonist and synergic effects were found. The aqueous extracts EAq-AA and EAq-GA and methanolic extract EBr-GA showed a good inhibitory activity on β -lactamase where the inhibition percentage vary between 38% and 50% using a concentration of 1.25 mg/ml. EAc-GA, EBr-GA et EAc-AA showed an important scavenging activity using the DPPH radical (IC_{50} = 38.15, 37.48 and 68.35 μ g/ml, respectively). The results showed that extracts EAc-GA, EBr-GA and EAc-AA exhibited very great inhibition on the oxidation of β -carotene/linoleic acid (84.33%, 84.05% and 76.21%, respectively). All extracts increased the HT_{50} values (Half-Hemolysis Time) in dose-dependent manner. The concentration 84.74 μ g/ml of ECh-GA and EAc-GA enhance significantly erythrocyte anti-radicalar system. The antioxidant activity of extracts was confirmed in mice. The administration of EBr-AA (100 and 200 mg/ kg/day) and of EBr-GA, EAc-GA and EAq-GA (100 mg/kg/day) for 21 days resulted in a significant amelioration in both blood and plasma antioxidant capacity. EAc-GA revealed a potent inhibitory activity on bacterial xanthine oxydase. The extracts EBr-GA, ECh-GA and EAq-GA contain a competitive inhibitor. Whereas, EAc-GA, ECh-AA and EAc-AA were non-competitive inhibitors, EBr-AA and EAq-AA were incompetitifs inhibitors. *In vivo* study was performed on hyperurecemic mice models. EBr-AA and EAq-AA caused a significant decrease (66%) in plasmatic uric acid followed by ECh-GA and EAc-GA. The anti-inflammatory effect using PMA on mice showed that the methanolic extract of both plants reduced the weight of the ear edema. In conclusion, these plants have a strong pharmacological power, which supports their medicinal traditional use.

Key words: Flavonoids and polyphenols, Antibacterial, Synergy, Antioxidant, Antihemolytic, XO, Hyperuricemia, Anti-inflammatory.

الملخص

بالجزائر، تدعى محليا Hamham و Tasselgha. تستعمل هذه النباتات في معالجة الكثير من الحالات المرضية. تمت في هذه الدراسة تحضير المستخلصات باستعمال مذيبات متزايدة القطبية بين تقدير عديدات الفينول والفلافونويدات للمستخلصات أن EAc يحتوي على أكبر كمية من عديدات الفينول في حين ECh هو الأغنى من حيث الفلافونويدات بالنسبة ل AA و EAc بالنسبة ل GA. تم تقدير نشاطية المستخلصات المضادة للبكتيريا على 11 سلالة بكتيرية ATCC بإستعمال تقنية الإنتشار على الأغار. أظهر كل من المستخلصات ECh و EAc نشاطية عالية ضد اغلبية البكتيريا. بين في اختبار التعاون مع المضاد الحيوي Gentamicine وجود فعل تكميلي, تحفيزي, خصمي و تعاوني. المستخلصات EAq-AA, EBr-GA و EAq-GA اظهروا نشاطية تثبيطية ل β -lactamase بنسب قدرت ب 38% و 50% عند تركيز 1.25 ملغ/مل. EAc-GA و EBr-GA و EAc-AA اظهروا أكبر تأثير إزاحي اتجاه جذر DPPH (IC_{50} = 37.48, 38.15 و 68.35 ميكروغرام/مل على الترتيب). EBr-GA و EAc-GA و EAc-AA يملكون نشاطية مضادة للأوكسدة جد معتبرة بنسبة 84.05%, 84.33% و 76.21% على الترتيب. كل المستخلصات زادت من قيم HT_{50} (Half-Hemolysis Time) بشكل يتناسب مع الزيادة في التركيز، حيث أن التركيز 84.74 ميكروغرام/مل لكل من ECh-GA و EAc-GA قام بتعزيز ذو دلالة إحصائية لنظام الكريات الحمراء المضاد للجذور الحرة. النشاطية المضادة للأوكسدة قدرت حيويًا على فئران معالجة بجرعات يومية لمدة 21 يوم (100-200 مغ/كغ/يوم بالنسبة ل EBr-AA و بتكرز 100 مغ/كغ/يوم بالنسبة ل EBr-GA و EAc-GA و EAq-GA). و أظهرت النتائج زيادة في النشاطية الكلية المضادة لأوكسدة الدم و النشاطية المضادة للبالزما. أعطى EAc-GA تثبيطا عاليا ضد إنزيم Xanthine oxydase ذات مصدر بكتيري. تحتوي المستخلصات EBr-GA و ECh-GA و EAq-GA على مثبطات من نوع تنافسي، بينما تحتوي كل من EAc-GA و GA و EAc-AA و ECh-AA على مثبطات من نوع اللا تنافسي، في حين كان تثبيط EBr-AA و EAq-AA تثبيطا غير تنافسي. بينت نتائج إختبار على نماذج حيوانية تعاني من إنتاج مفرط من اليوريا hyperurécémique أن EAc-GA و EBr-AA أدت إلى خفض حمض اليوريك في البلازما بنسبة 66% متبوعة ب ECh-GA و EAc-GA. أظهرت النشاطية المضادة للإلتهاب بإستعمال PMA عند الفئران أن المستخلص الميثانولي للنبتين قام بخفض وزن الودمة للأذن. في الختام، هذه النباتات لها قوة دوائية قوية، والتي تدعم الاستخدامات التقليدية الطبية الخاصة بهم.

الكلمات المفاتيح: مضادات البكتيريا، فعل تعاوني، β -lactamase، مضادات الإنحلال الدموي، مضادات الأوكسدة، hyperurécémie، XO، مضادات الإلتهاب، عديدات الفينول.

Liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection
AU	Acide urique
ANOVA	Analyse de variance
BHT	Hydroxytoluene butyle
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
EAc	Extrait d'acétate d'éthyle
EAG	Equivalent d'acide gallique
Eaq	Extrait aqueux
EBr	Extrait brut
ECh	Extrait du chloroforme
EQ	Equivalents de quercétine
EHx	Extrait d'hexane
ERO	Espèce réactive d'oxygène
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidant Power
GEN	Gentamicine
GPx	Glutathion réductase
HT ₅₀	Half-hemolysis time
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
INF	Interféron
IL	Interleukine
KDa	Kilodalton
LTh	Lymphocyte T helper
Mosm	Milliosmolarité
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
PMA	Phorbol myristate acétate
SD	Standard deviation
SEM	Erreur Standard du moyenne
SOD	Superoxyde dismutase
T-BHP	Tert-butyl hydroperoxide
XDH	Xanthine déshydrogénase
XO	Xanthine oxydase
XOR	Xanthine oxydoréductase

Sommaire

1	INTRODUCTION GENERALE.....	1
2	PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
2.1	L'activité antibactérienne	5
2.1.1	Les β -lactamines	5
2.1.2	Le mécanisme de résistance aux β -lactamines	6
2.1.3	L'inhibition des β -lactamases et résistance aux inhibiteurs	7
2.1.4	Les antimicrobiens naturels	8
2.1.5	La synergie.....	11
2.2	Le stress oxydant	12
2.2.1	Définition	12
2.2.2	Les types des radicaux libres	13
2.2.3	Les sources des ERO et ERA.....	13
2.2.4	Les rôles des ERO et ERA	17
2.2.5	Les antioxydants	19
2.3	L'inflammation	22
2.3.1	Définition et mécanismes.....	22
2.3.2	Les pathologies inflammatoires	24
2.3.3	Les anti-inflammatoires.....	24
2.4	Les plantes utilisées	26
2.4.1	<i>Globularia alypum</i>	26
2.4.2	<i>Anchusa azurea</i>	28
3	MATERIEL ET METHODES.....	31
3.1	Matériel.....	32
3.1.1	Matériels biologiques	32
3.1.2	Réactifs chimiques.....	33
3.2	L'extraction et analyse des extraits.....	33
3.2.1	La préparation et le fractionnement de l'extrait brut	33
3.2.2	Le dosage des composés phénoliques	34
3.2.3	Le dosage des flavonoïdes.....	35
3.3	L'activité antibactérienne	35
3.3.1	L'inhibition de la croissance bactérienne	36
3.3.2	L'activité antibactérienne synergique	36
3.3.3	Le test d'inhibition enzymatique des β -lactamases	37
3.4	L'activité antioxydante <i>in vitro</i>	38
3.4.1	L'effet scavenger du radical DPPH.....	38
3.4.2	Le test de blanchissement de la β -carotène/acide linoléique.....	39
3.5	L'activité anti hémolytique	39
3.6	L'activité antioxydante <i>in vivo</i>	40
3.6.1	La toxicité aigue « Détermination de la DL ₅₀ »	40
3.6.2	L'effet sur la capacité antioxydante totale du sang.....	41
3.6.3	L'effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH	43
3.6.4	Le pouvoir réducteur plasmatique évalué par la technique de FRAP	43

3.7	L'activité anti-inflammatoire utilisant PMA	44
3.8	Le test d'inhibition enzymatique de la XO.....	46
3.8.1	L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits sur l'activité du XO	46
3.8.2	La détermination du type d'inhibition	46
3.8.3	L'effet hypouricémique des extraits.....	47
3.9	Les analyses statistiques	48
4	RESULTATS ET DISCUSSION	50
4.1	L'extraction et l'analyse des extraits	51
4.2	L'activité antibactérienne	53
4.2.1	L'inhibition de la croissance bactérienne	53
4.2.2	L'activité antibactérienne synergique avec la Gentamicine.....	58
4.2.3	Le test d'inhibition enzymatique des β -lactamases	60
4.3	L'activité antioxydante <i>in vitro</i>	63
4.3.1	L'effet scavenger du radical DPPH.....	63
4.3.2	Le test de blanchissement de la β -carotène.....	66
4.4	L'activité anti-hémolytique	68
4.5	L'activité antioxydante <i>in vivo</i>	74
4.5.1	La toxicité aigue « détermination de la DL ₅₀ »	74
4.5.2	L'effet sur la capacité antioxydante totale du sang.....	75
4.5.3	L'effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH	77
4.5.4	Le pouvoir réducteur plasmatique évalué par la technique de FRAP	79
4.6	L'activité anti-inflammatoire utilisant PMA	81
4.7	Le test d'inhibition enzymatique de la xanthine oxydase d'origine bactérienne	85
4.7.1	L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits sur les activités du XO	85
4.7.2	La détermination du type d'inhibition	87
4.7.3	L'effet hypouricémique des extraits.....	90
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	97
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101
	ANNEXES.....	115

Liste des figures

Figure. 1 : Cycle d'un anneau β -lactame et les structures du noyau de base des β -lactamines	5
Figure. 2 : Mode d'action des β -lactamases à sérine.....	6
Figure. 3 : Localisation de la β -lactamase dans les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.....	7
Figure. 4 : L'inflammation aiguë.....	23
Figure. 5 : Aspect morphologique de <i>Globularia alypum</i>	27
Figure. 6 : Quelques photos d' <i>Anchusa azurea</i>	29
Figure. 7 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	35
Figure. 8 : Droite d'étalonnage de la quercétine.....	35
Figure. 9 : Les courbes d'étalonnage de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44
Figure. 10 : Activité antiradicalaire des extraits d' <i>Anchusa azurea</i> et <i>Globularia alypum</i>	64
Figure. 11 : Activité antioxydante en présence et en absence des l'extrait et du BHT à 24 h par le test de β -carotène / acide linoléique.....	66
Figure. 12 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) pour le groupe témoin et le groupe Vit C.....	69
Figure. 13 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) pour les différents groupes traités par <i>Anchusa azurea</i>	69
Figure. 14 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) pour les différents groupes traités par <i>Globularia alypum</i>	70
Figure. 15 : Estimation de la DL50 chez les souris mâles traitées par voie intra péritonéale par l'extrait brut méthanolique d' <i>Anchusa azurea</i>	74
Figure. 16 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) pour les différents groupes traités par les extraits d'AA et GA... ..	76
Figure. 17 : L'activité antiradicalaire des extraits d'AA et GA.....	78
Figure. 18 : L'activité anti-inflammatoire d' <i>Anchusa azurea</i> (AA) et <i>Globularia alypum</i> (GA).....	81
Figure. 19 : Coupes histologiques des oreilles des souris mâles témoin traité avec l'eau physiologique.....	83
Figure. 20 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitée avec le Diclofénac.....	83
Figure. 21 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitées avec une dose de 100 mg/kg d'extrait méthanolique d' <i>Anchusa azurea</i> (AA).....	84
Figure. 22 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitées avec une dose de 100 mg/kg d'extrait méthanolique de <i>Globularia alypum</i> (GA).....	84
Figure. 23 : Inhibition de la XO par les extraits d' <i>Anchusa azurea</i> (AA) et <i>Globularia alypum</i> (GA).....	85
Figure. 24 : L'activité antihypotensive des extraits d'AA et GA.....	92
Figure. 25 : L'évaluation de la fonction rénale par le dosage de l'urée et la créatinine.....	96

Liste des tableaux

Tableau. 1 : Les différents types des espèces réactives.....	13
Tableau. 2 : Les principaux rôles physiologiques des radicaux libres.....	17
Tableau. 3 : Rôle des médiateurs chimiques impliqués dans l'inflammation.....	24
Tableau. 4 : Classification botanique d' <i>Anchusa azurea</i> et <i>Globularia alypum</i>	26
Tableau. 5 : Rendements des diverses fractions extraites en pourcentage par rapport au poids total.....	52
Tableau. 6 : Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.	52
Tableau. 7 : Activité antibactérienne des extraits d' <i>Anchusa azurea</i> (AA) et <i>Globularia Alypum</i> (GA) exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.	53
Tableau. 8 : Activité synergique des extraits d' <i>Anchusa azurea</i> (AA) et <i>Globularia alypum</i> (GA) exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.	58
Tableau. 9 : Les pourcentages d'inhibition des β -lactamases par les extraits d'AA et GA.	61
Tableau. 10 : Activité antiradicalaire des extraits d' <i>Anchusa azurea</i> et <i>Globularia alypum</i>	64
Tableau. 11 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) pour les différents groupes étudiés traités par AA.	70
Tableau. 12 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) pour les différents groupes étudiés traités par GA.....	71
Tableau. 13 : Détermination de la DL_{50} de l'extrait brut méthanolique d' <i>Anchusa azurea</i> et de <i>Globularia alypum</i>	74
Tableau. 14 : Détermination des différentes doses létales (DL) de l'extrait brut méthanolique d' <i>Anchusa azurea</i>	75
Tableau. 15 : Pouvoir réducteur (PR) des extraits d'AA et GA et un antioxydant standard « VIT C ».	80
Tableau. 16 : Effet des extraits d'AA et GA sur les activités de la XO.	86
Tableau. 17 : Type d'inhibition des extraits d' <i>Anchusa azurea</i> et <i>Globularia alypum</i>	88

1 Introduction générale

Les antibiotiques ont longtemps été considérés comme des armes efficaces pouvant éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. Toutefois, l'utilisation abusive de ces composés dans le domaine médical a eu pour conséquence l'apparition progressive d'une multitude de résistances chez les microorganismes. Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en clinique. La résistance bactérienne aux β -lactamines est due principalement à la production d'enzymes (β -lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau β -lactame commun à tous les molécules de cette classe d'antibiotiques. En plus, le traitement annuel des infections causées par les bactéries résistantes devient de plus en plus coûteux. Afin de faire face à ce problème de coût, les populations démunies se sont retournées vers la médecine traditionnelle d'un moindre budget.

Les ERO oxydent les lipides, les protéines et l'ADN. Les dommages oxydatifs qui en découlent sont considérés comme la cause principale de nombreuses maladies dégénératives allant de l'inflammation au cancer en passant parfois par des maladies cardio-vasculaires ou l'arthrite rhumatoïde. Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme utilise des systèmes de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes). Le système endogène comprend la glutathion peroxydase, la catalase et le superoxyde dismutase. Quant à l'alimentation riche en antioxydants exogènes, elle joue également un rôle très important. On en trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les flavonoïdes. Ces molécules sont reconnues pour leurs nombreuses activités biologiques attribuées à leur capacité à piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres (Fontaine, 2007).

Ce travail s'inscrit donc dans cet axe général Il consiste à rechercher d'autres molécules naturelles dotées d'activités biologiques et/ou pharmacologiques. Nous nous sommes

intéressés plus particulièrement à évaluer quelques activités biologiques de deux plantes médicinales: *Anchusa azurea* et *Globularia alypum*. Connues en Algérie sous les noms: Hamham et Tasselgha. Ces plantes sont, en effet, très utilisées en médecine traditionnelle.

Nous nous sommes fixé comme objectifs ce qui suit :

- Le dosage des polyphénols et flavonoïdes des différents extraits aqueux et organiques d'*Anchusa azurea* et *Globularia alypum*.
- L'étude antibactérienne, la synergie entre plusieurs extraits et l'activité inhibitrice des différents extraits vis-à-vis des β -lactamases.
- L'évaluation de l'activité anti oxydante *in vitro* (DPPH et β -carotène), *in vivo* (DPPH et FRAP) des différents extraits et la capacité antioxydante totale du sang.
- L'étude des effets des extraits sur l'hémolyse des globules rouges.
- L'activité anti-inflammatoire des extraits sur des souris comme modèle animal.
- L'effet des extraits sur les activités de la XOR génératrice de ERO, détermination du type d'inhibition et l'effet hypo-uricémique.

2 Partie bibliographique

2.1 L'activité antibactérienne

2.1.1 Les β -lactamines

Les β -lactamines sont une grande famille d'antibiotiques utilisés dans le traitement de plusieurs infections à Gram-positif et à Gram-négatif. Leurs structures ont en commun un cycle β -lactame à 4 sommets qui constitue la fonction chimique indispensable à l'activité antibactérienne de la β -lactamine (Finberg et Guharoy, 2012) (Figure. 1).

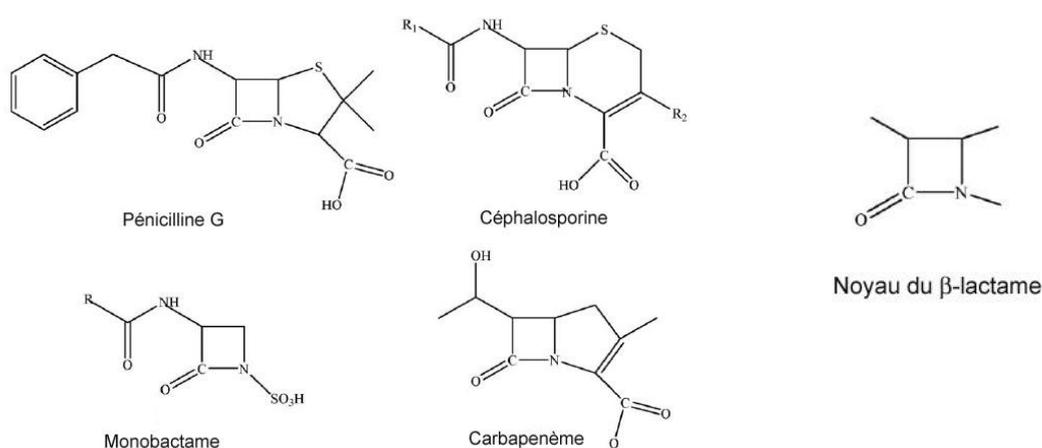


Figure. 1 : Cycle d'un anneau β -lactame et les structures du noyau de base des β -lactamines (Babic *et al.*, 2006).

Les β -lactamines comprennent cinq sous-classes : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, ainsi que les inhibiteurs des β -lactamases.

Les β -lactamines ont pour cible les enzymes de la synthèse de la paroi bactérienne ou le peptidoglycane. Cette synthèse s'effectue en trois étapes : une étape cytoplasmique, une étape membranaire et une étape périplasmique qui implique des réactions de transglycosylation et de transpeptidation catalysées par des enzymes appelées les protéines liant la pénicilline (PLPs) (Page, 2012).

2.1.2 Le mécanisme de résistance aux β -lactamines

Il n'est pas surprenant que la résistance bactérienne aux antibiotiques apparaisse étant donné l'usage intensif à titre préventif ou thérapeutique des antibiotiques. L'inactivation enzymatique par les β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu. Les β -lactamases sont des enzymes capables de cliver le cycle β -lactame et rendent l'antibiotique inactif (Yoneyama et Katsumata ; 2006 ; Bush, 2009). La résistance ne provient pas uniquement de l'augmentation de l'activité de l'enzyme vis-à-vis d'un substrat, mais parfois d'une augmentation de la synthèse de l'enzyme (Frère, 1995, Bush, 2009).

Certaines mutations dans les promoteurs provoquent des changements dans la régulation transcriptionnelle provoquant une surproduction des β -lactamases (Wu *et al.*, 1995). Les β -lactamases font partie de la grande famille des PLPs. Dans cette famille, la formation du complexe acyl-enzyme (étape d'acylation) est très stable. Tandis qu'en présence des β -lactamases, le complexe subit une réaction d'hydrolyse rapide, ce qui a pour conséquence l'inactivation de l'antibiotique (Figure. 2) (Frère, 1995, Bush, 2009).

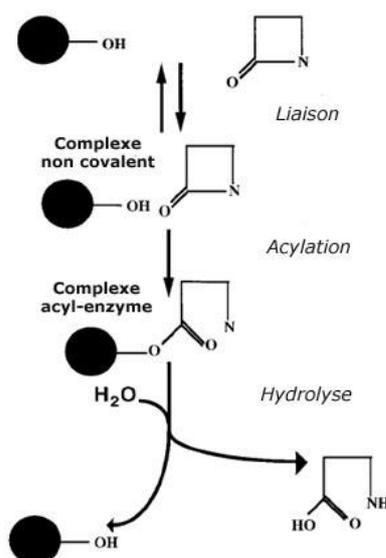


Figure. 2 : Mode d'action des β -lactamases à sérine. L'hydrolyse finale libère un antibiotique inactif (Livermore *et al.*, 1998).

Chez les bactéries à Gram-positif, l'inactivation de l'antibiotique s'effectue à l'extérieur de la cellule bactérienne grâce à des β -lactamases extra-cellulaires ou liées à la membrane externe, alors que chez les bactéries à Gram-négatif, l'inactivation a lieu dans l'espace périplasmique (Figure. 3) (Maiti *et al.*, 2006).

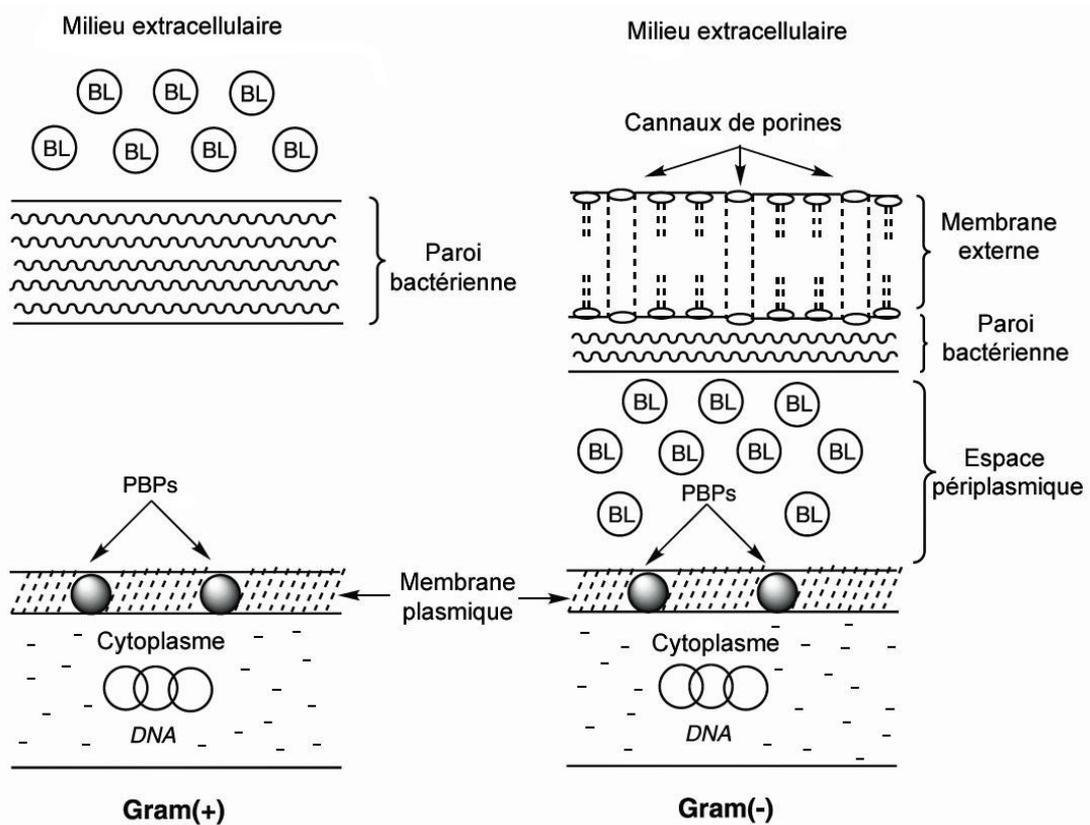


Figure. 3 : Localisation de la β -lactamase dans les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. (BL: β -lactamase, PBPs: protein binding penicillins) (Maiti *et al.*, 2006).

2.1.3 L'inhibition des β -lactamases et résistance aux inhibiteurs

Afin de prévenir l'hydrolyse des β -lactamines, deux approches sont utilisées. La première utilise la modification de l'antibiotique le rendant insensible à l'action des β -lactamases. La deuxième approche a été l'utilisation d'une combinaison d'un inhibiteur de β -lactamases avec une β -lactamine. L'antibiothérapie avec ce type de combinaison est basée sur l'effet synergique des deux molécules: l'inhibiteur supprime l'activité de la β -lactamases et protège

les β -lactamines qui peuvent alors se lier aux PLPs (Sandanayaka et Prashad, 2002 ; Page, 2012). L'inhibition la plus efficace et la plus spécifique est causée par des molécules ayant des structures analogues aux β -lactamines et dépourvues d'une activité antibactérienne (Chaïbi *et al.*, 1999).

Les inhibiteurs des β -lactamases se caractérisent par leur mécanisme d'action. Ces analogues structuraux subissent l'étape d'acylation, et en l'absence d'étape de désacylation, ils restent accrochés à l'enzyme formant des complexes très stables. Il existe trois inhibiteurs utilisés en clinique : l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam. Ces inhibiteurs sont des dérivés de la pénicilline et possèdent un anneau β -lactame avec une chaîne latérale modifiée (Maiti *et al.*, 2006 ; Brook, 2009). L'acide clavulanique, appelé également clavulanate, est le seul inhibiteur naturel, produit par *Streptomyces clavugerus*. C'est une β -lactamine qui inactive *in vitro* et *in vivo* les β -lactamases d'une grande variété de bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif, (*Staphylococcus*, *Hemophilus*, *E. coli* et *Klebsiella*) (Li et Townsend, 2006 ; Bassetti *et al.*, 2011). C'est un inhibiteur irréversible agissant sur les β -lactamases intra- et extracellulaires (Finberg et Guharoy, 2012).

2.1.4 Les antimicrobiens naturels

2.1.4.1 Les polyphénols

Les phénols simples et acide phénolique : sont les molécules, bioactives issues du métabolisme secondaire des plantes, les plus simples. Ces substances montrent, en effet, une importante toxicité envers les microorganismes par la modification des propriétés physiques en s'intercalant dans la bicouche membranaire (Taylor, 2013). Les sites et le nombre des groupements OH sur les phénols seraient en relation avec cette toxicité. Cet effet antimicrobien augmente avec le nombre des groupements OH. Il concerne probablement

l'inhibition de certaines enzymes via des réactions avec leurs groupements sulfhydriles ou par des interactions non spécifiques avec ces dernières (Cowan, 1999 ; Pistelli et Giorgi, 2012).

Les quinones : sont des substances extrêmement réactives, très répandues dans la nature et possèdent des cycles aromatiques avec des groupements cétones. Les protéines d'adhésion de surface, les polypeptides de la paroi et les enzymes membranaires de la cellule microbienne sont les cibles probables des quinones (Cowan, 1999).

Les flavonoïdes : Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyrone (anneaux A et C). Les flavonoïdes sont subdivisés en 14 classes différentes dont 6 sont les plus répandues et les mieux caractérisés. Ce sont les flavanones, les flavones, les flavanonols, les flavonols, et les isoflavones (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich, 2006). A l'exception des chalcones, ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques : deux cycles benzoïques A et B et un hétérocycle C (squelette carboné C6-C3-C6) (Yao *et al.*, 2004 ; Shankar *et al.*, 2012). Les flavonoïdes exercent leurs effets via trois mécanismes : l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, inhibition de la fonction des membranes cytoplasmiques et aussi l'inhibition du métabolisme énergétique (Tim Cushine et Lamb, 2005).

Certains flavonoïdes ont un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Harbonne et Williams, 2000). Plaper et ses collaborateurs (2003) ont démontré que la quercétine inhibe la synthèse de l'ADN en inactivant l'ADN gyrase. D'autres flavonoïdes comme le sophoraflavone G et l'epigallocatechin gallate inhibe la synthèse de la membrane cytoplasmique, et que les licochalcones A et C empêchent le métabolisme énergétique de certaines bactéries (Tim Cushnie et Lamb, 2005). D'autres études ont rapporté

que les flavonoïdes peuvent aussi interférer avec le métabolisme énergétique des bactéries (Pistelli et Giorgi, 2012).

Les tannins : Ils se trouvent pratiquement dans toutes les parties de la plante (bois, écorces, racines, feuilles et fruits). Ce sont des polymères phénoliques, ils forment des complexes avec les protéines et aussi les polysaccharides par des liaisons hydrogènes et hydrophobes (Cowan, 1999 ; Okuda et Ito, 2011). Ces composés sont caractérisés par une capacité à bloquer la membrane cytoplasmique par l'inactivation des adhésines de surface, les enzymes et les protéines de transport membranaires (Okuda, 2005).

2.1.4.2 Les alcaloïdes

Ce sont des composés azotés hétérocycliques. L'exemple typique est la berberine, un alcaloïde très actif sur les parasites. Il est potentiellement efficace contre les trypanosomes (Freiburghaus *et al.*, 1996) et plasmodium (Omulokoli *et al.*, 1997). Le mécanisme d'action est attribué à sa capacité à intercaler l'ADN.

2.1.4.3 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement complexe, renfermant des métabolites secondaires représentés par des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de leur extraction. Les huiles essentielles sont biosynthétisées par les végétaux supérieurs en réponse à des conditions de stress et surtout pour combattre les agents infectieux ou parasitaires. Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Billerbeck, 2007). Une caractéristique importante des huiles essentielles est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et celles des mitochondries, perturbant ces

structures en les rendant plus perméables. La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors être fatal à la cellule bactérienne. Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont: l'altération de la paroi cellulaire, la dégradation de la membrane cytoplasmique, l'altération des protéines membranaires, la fuite du contenu cellulaire, la coagulation du cytoplasme et l'épuisement de la force de mouvement des protons (Goetz et Ghedira, 2012).

2.1.4.4 Les polypeptides

Les peptides inhibiteurs de la croissance des microorganismes sont connus depuis longtemps (Brown et Hancock, 2006). La plupart de ces peptides inhibiteurs sont chargés positivement et comportent des ponts disulfures. Il semblerait qu'ils agissent par la formation de canaux ioniques dans la membrane microbienne ou par inhibition compétitive de l'adhésion des protéines microbiennes aux polysaccharides des récepteurs de la cellule hôte (Yang *et al.*, 2006).

2.1.5 La synergie

L'utilisation abusive des antibiotiques a induit le phénomène de résistance des bactéries infectieuses aux antibiotiques. Ce problème que rencontre la médecine actuelle, a relancé la recherche vers l'élaboration d'autres stratégies thérapeutiques visant à exploiter les propriétés antimicrobiennes des substances naturelles pouvant se substituer aux antibiotiques et/ou agir en synergie avec ces derniers (Ankli *et al.*, 2002; Newman et Cragg, 2007).

Selon Eaton et Klaassen (2001), le terme synergie signifie travailler ensemble. Il désigne l'interaction entre au moins deux « choses » dont les effets combinés sont beaucoup plus supérieurs à la somme de leurs effets singuliers (effets de type « un plus un est supérieur à

deux»). En plus du terme synergie, d'autres termes sont utilisés pour désigner les interactions entre deux molécules :

- **Additif** : phénomène qui survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux produits chimiques est égal à la somme des effets de chaque produit chimique pris individuellement (aucune interaction directe).
- **Potentialisation** : phénomène qui survient lorsqu'une substance qui n'a habituellement pas un effet est combinée à un produit chimique, ce qui a pour effet de rendre ce dernier beaucoup plus efficace.
- **Antagonisme** : ce phénomène est le contraire de la synergie. Il survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux composés est moins efficace que les effets individuels des substances.

2.2 Le stress oxydant

2.2.1 Définition

Le stress est défini comme un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres (caractère pro-oxydant) et la capacité du corps à les neutraliser, à réparer les dommages oxydatifs (système antioxydant) et à réguler leur production (Zweier et *al.*, 2006).

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires, qui lui confère une réactivité (demi-vie courte) vis-à-vis d'autres molécules, soit à capter un autre électron ; c'est alors un radical oxydant, soit à le céder ; c'est alors un radical réducteur. Il ne faut pas penser que tous les radicaux libres sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ces espèces radicalaires sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques (Favier, 2003 ; Fontaine, 2007).

2.2.2 Les types des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être dérivés de l'oxygène (Espèce réactive d'oxygène : ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (Espèce réactive d'azote : ERA). Il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires (Afanas'ev, 2009). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. D'autres espèces dérivées de l'oxygène ou l'azote ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Orban *et al.*, 2007) (Tableau.1).

Tableau. 1 : Les différents types des espèces réactives (Fontaine, 2009).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}	Acide hypochlorique	HOCl
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}	Oxygène singulet	O_2
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}	Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$

2.2.3 Les sources des ERO et ERA

Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux radicaux libres par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normale et parfois en réponse à un stimulus spécifique. Deux sources peuvent être citées :

2.2.3.1 Les sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Des toxiques telles que le monoxyde d'azote (NO) et le

dioxyde d'azote (NO_2) présents dans l'environnement. Le goudron, le tabac et les polluants industriels participent également à la genèse de radicaux libres (Münzel *et al.*, 2006, Důračková, 2008).

Les rayonnements X ou γ peuvent par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. Les polluants de l'air, comme la fumée des cigarettes et les contaminants industriels, constituent une source importante d'ERO, ils attaquent et causent des endommagements dans l'organisme que ce soit par interaction directe avec la peau ou après inhalation dans les poumons. Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, etc...) peuvent contribuer à la production des ERO qui se forment comme un des produits de leur métabolisme *in vivo* (Desikan *et al.*, 2003; Lykkesfeldt et Svendsen, 2007).

2.2.3.2 Les sources endogènes

À côté des sources exogènes des radicaux libres, les métabolismes intracellulaires (endogènes) sont des sources plus importants d'ERO et ERA. Ils sont produits en continu durant toute la vie de chaque cellule dans l'organisme.

L'une des sources physiologiques majeures de $\text{O}_2^{\cdot-}$ est représentée par la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle est une source permanente d'ERO, elle les produirait en deux sites de production: les complexes I et III (García, 2005).

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une enzyme qui génère les ERO en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électrons produisant ainsi l'anion superoxyde. La XOR joue un rôle cruciale dans la génération de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 (O'Mahony *et al.*, 2013).



Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires sanguins et de façon très importante dans le foie et les intestins. La localisation cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique (Quiney *et al.*, 2011).

L'hyperuricémie est la pathologie la plus citée impliquant la XOR, c'est un état pathologique qui résulte de la surproduction (par XOR) ou l'excrétion (troubles des tubules rénaux) d'acide urique qui forme des cristaux microscopiques insolubles dans les vaisseaux capillaires des articulations. Ces cristaux provoquent une inflammation et une douleur aiguë, caractéristique de l'arthrite goutteuse aiguë (Jetanalin et Lee, 2013 ; Newcombe, 2013). L'inhibiteur le plus important de la XOR est l'allopurinol qui a montré une activité inhibitrice de la XOR en réduisant les taux sériques et urinaires de l'acide urique. Il a été utilisé comme médicament de choix pour le traitement de la goutte et de l'hyperuricémie primaire et secondaire. L'allopurinol est un analogue de l'hypoxanthine, à faible concentration, est à la fois un substrat et un inhibiteur compétitif de la XOR (Hille, 2010 ; Chen *et al.*, 2011).

L'oxyde nitrique synthase (NOS) est une enzyme représentée par trois isoformes : neuronale (nNOS), inductible (iNOS) et endothéliale (eNOS). Les trois isoformes de NOS sont des générateurs importants du radical NO• (Dröge, 2002 ; Quiney *et al.*, 2011). Ce radical serait un médiateur utilisé par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (Del Rio *et al.*, 2002). Il permet la production d'autres RNS tel que le peroxy-nitrite ONOO (Favier, 2003).

La lipooxygénase présente une source importante de production d'ERO dans les parois vasculaires. Cette enzyme catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés ou des acides gras estérifiés comme les esters de cholestérol et celles trouvées dans les phospholipides pour

donner des dérivés d'acides gras hydroperoxydes toxiques pour la cellule (Madamanchi *et al.*, 2005 ; Maccarrone, 2008).

La NADPH oxydase (Nox) est une hémoprotéine formée du cytochrome b558, présent dans la membrane plasmique, et d'autres sous unités protéiques présentes dans le cytosol. Elle se trouve dans différents types cellulaires; les cellules phagocytaires, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules de muscles lisses. La NADPH oxydase phagocytaire joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes. En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes catalyse la formation d'O₂⁻ (Guzik, 2010 ; Touyz *et al.*, 2010).



Le peroxyosome est une source importante de production d'H₂O₂ cellulaire. cet organite contient de nombreuses enzymes qui le génèrent. Toutefois, il est utilisé comme substrat par la catalase peroxyasomale afin d'assurer des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein (Sandalio *et al.*, 2013).

Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leurs formes réduites, sont de remarquables promoteurs du processus radicalaires *in vitro*: ils transforment l'H₂O₂ en OH[•]. Les destructions cellulaires (hémolyse, cytolyse hépatique) pouvant donc engendrer un stress oxydant par la libération des métaux. La formation du OH[•], le radical libre le plus réactif, à partir du H₂O₂ en présence de fer ferreux est dite réaction de Fenton (Fontaine, 2007).



2.2.4 Les rôles des ERO et ERA

Le paradoxe des ERO et ERA en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie.

2.2.4.1 Rôles physiologiques des ERO

Selon Dröge (2002), les radicaux libres ont les fonctions physiologiques suivantes (Tableau.2):

Tableau. 2 : Les principaux rôles physiologiques des radicaux libres.

Espèce	Quelques rôles physiologiques
NO [•]	<ul style="list-style-type: none"> - Relaxation des muscles lisses ; - Autres fonctions GMPc dépendantes (modulation des fonctions des protéines kinases, phosphodiesterases, et des canaux ioniques) ; - Activation des MAPK des cellules endothéliales et monocytes ; - Protection contre l'apoptose par inhibition de certaines caspases.
O ₂ ^{•-} et dérivés	<ul style="list-style-type: none"> - Transduction du signal ; - Relaxation du muscle lisse ; - Activation du NF-κB responsable de l'expression du gène de l'IL-2 ; - Activation de la protéine kinase C ; - Amélioration des fonctions immunologiques par amplification du signal intracellulaire dans les lymphocytes T ; - Induction de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales ; - Induction et exécution du phénomène d'apoptose ; - Induction de l'expression de la p21; inhibiteur du cycle cellulaire.
¹ O ₂	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration des fonctions immunologiques des lymphocytes.

2.2.4.2 Rôles pathologiques des ERO (cibles des radicaux libres)

Lors d'un stress oxydant, les ERO non « détoxifiés » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines, l'ADN... directement à leur contact (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le HO[•]. Ce dernier est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction est appelée peroxydation lipidique qui aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques. Parmi ces dérivés, le malondialdéhyde ayant une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et qui diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène, et il provoque aussi une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (Fontaine, 2007; Miwa *et al.*, 2008).

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les radicaux libres sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels le OH[•] s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Schnackenberg, 2002). Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures. De nombreux enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydés et inactivés. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Důračková, 2008).

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. L'attaque radicalaire peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases

modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Fontaine, 2007; Orban, 2007).

2.2.5 Les antioxydants

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des ERO est particulièrement fragile. La production des ERO est strictement régulée par notre organisme qui a développé des moyens de défense antioxydants de protection contre les effets potentiellement destructeurs des ERO. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

2.2.5.1 Les antioxydants enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes ; (i) la superoxyde dismutase (SOD), (ii) la catalase (CAT) et (iii) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O^{2\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

Le Superoxyde dismutase (SOD) : la SOD est une enzyme primaire essentielle qui réagit contre les produits toxiques de métabolisme cellulaire, et catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H₂O₂ (Seib *et al.*, 2006).



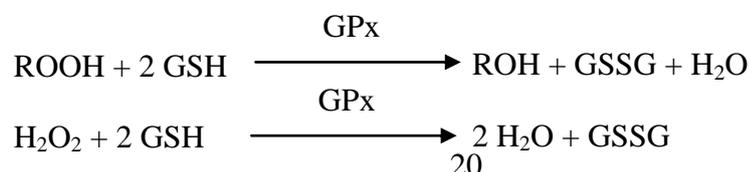
Cette enzyme existe sous trois formes selon sa localisation et son cofacteur métallique: une forme cytosolique et nucléaire associées aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (Comhair et Erzurum, 2002 ; Bartosz, 2005). La forme Cu/Zn-SOD se trouve aussi dans les peroxysomes et dans l'espace intermembranaire mitochondriales (Warner *et al.*, 2004).

La Catalase (CAT) : la catalase se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules (Kohen et Nyska, 2002). Cette enzyme catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Bartosz, 2005)



La Glutathion peroxydase (GPx) et la Glutathion réductase (GR) : Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂ et la réduction de divers hydroperoxydes lipidiques. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion disulfure (GSSG) (Sastre *et al.*, 2005; Jacquot, 2013).

Le glutathion disulfure (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) utilisant le NADPH comme donneur d'électron (Mates *et al.*, 1999. Foyer *et al.*, 2008).



2.2.5.2 Les antioxydants non enzymatiques

La Vitamine C est hydrosoluble et localisée dans le cytosol et le fluide extracellulaire, elle capte directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' OH^{\bullet} (Comhair et Erzurum, 2002). Elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase) (Foyer *et al.*, 2008). Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Evans, 2000 ; Limbach et Guillard, 2007)

La vitamine E est constituée de quatre isomères de tocophérol, α , β , γ et δ , avec une activité antioxydante variable (Limbach et Guillard, 2007). La forme α est la plus active, elle est liposoluble et se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxy (LOO^{\bullet}). Elle devient à son tour un radical moins actif que le LOO^{\bullet} et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Evans, 2000 ; Zelek *et al.*, 2010).

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles jaunes, orangée à rouge, synthétisés par les plantes et les microorganismes. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Yeum *et al.*, 2009 ; Tanumihardjo, 2013).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal, ont des propriétés antioxydantes, et en particulier la classe des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de

l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO comme la xanthine oxydase (Charles, 2013).

2.3 L'inflammation

2.3.1 Définition et mécanismes

L'inflammation est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression, son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. Ce processus comprend des phénomènes généraux, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement par de la fièvre et une altération de l'état général du tissu (Das *et al.*, 2011).

La réaction inflammatoire peut être aiguë (quelques minutes à quelques jours) ou chronique (semaines, années). Les maladies inflammatoires chroniques sont la troisième cause de mortalité, après les affections cardiovasculaires et les cancers. La réaction inflammatoire peut être locale (vasodilatation locale, exsudation plasmatique et afflux local de cellules inflammatoires au niveau cutané à la suite d'une plaie ou au niveau de la muqueuse bronchique dans l'asthme allergique par exemple) ou générale (signes généraux comme la fièvre, production hépatique des protéines de la phase) (Dorward *et al.*, 2012).

Au niveau cellulaire, elle se caractérise par une infiltration leucocytaire. Une inflammation aiguë est caractérisée par l'expression et la sécrétion de médiateurs solubles, telles les cytokines. Ces dernières activent l'endothélium, la monocouche de cellules en contact du

sang. Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë sont toujours les mêmes quelque soient le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé: roulement, adhésion et transmigration des leucocytes à travers l'endothélium (Vasson et Reimund, 2007) (Figure. 4).

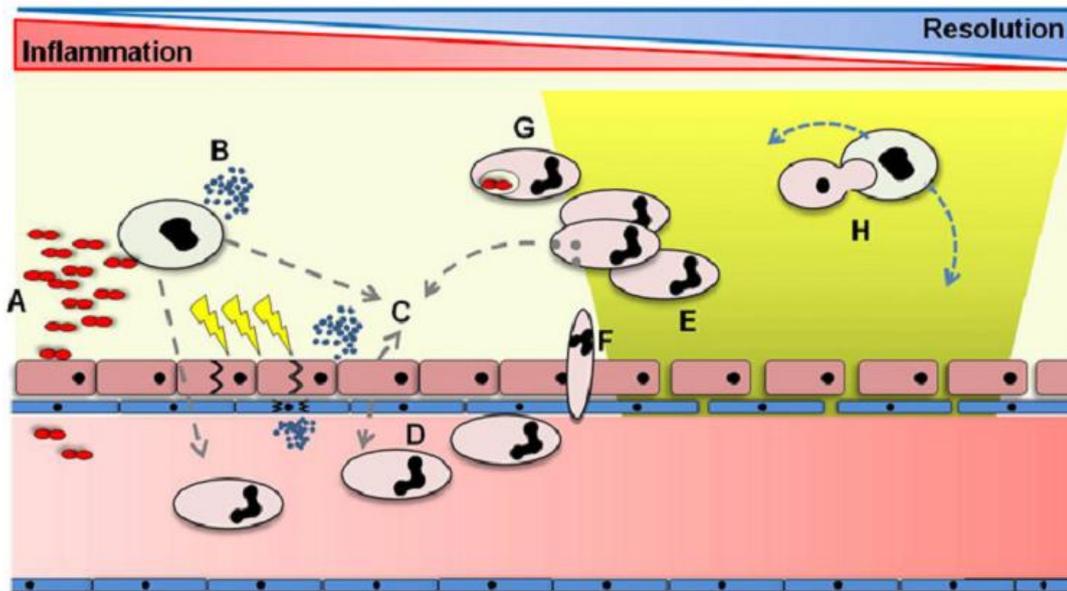


Figure. 4 : L'inflammation aiguë. Le processus inflammatoire aigu est déclenché par l'interaction d'organismes pathogènes (A), ou les produits tissulaires (B), avec des récepteurs de reconnaissance présents sur les cellules inflammatoires résidentes dans les tissus affectés et les cellules épithéliales environnantes. Cela conduit à la libération de différents médiateurs pro-inflammatoires (C) conduisant à l'activation des cellules endothéliales (D), de la perméabilité vasculaire (E), l'adhésion des neutrophiles, l'activation et la transmigration (F) ainsi l'activation des plaquettes et des monocytes, phagocytose (G) (Dorward et al., 2012).

Le déclenchement et le maintien de l'inflammation, ainsi que sa diffusion au niveau du foyer initial font appel à plusieurs médiateurs (Tableau 3) :

Tableau. 3 : Rôle des médiateurs chimiques impliqués dans l'inflammation (Cavaillon, 2005)

Les médiateurs	Le rôle
Les médiateurs chimiques	
Les amines (histamines et sérotonine)	libérées par les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes. Elles provoquent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire,
Les prostaglandines et leucotriènes	l'origine de la vasodilatation, de la douleur et de l'attraction locale des polynucléaires et de la fièvre.
Les molécules d'adhérences	permettent le ciblage du foyer inflammatoire par les cellules immunitaires.
Les cytokines	elles sont produites par les lymphocytes T et les macrophages. Elles agissent sur des récepteurs membranaires de manière autocrine (de la cellule productrice), paracrine (cellule proche) ou endocrine (cellule à distance). Elles peuvent être pro-inflammatoires (interleukine (IL) : IL-1 β , IL-6, ou le TNF α) ou encore anti-inflammatoires (IL-10).

2.3.2 Les pathologies inflammatoires

De nombreuses maladies inflammatoires sont liées à des mécanismes considérés comme dysimmunitaires. Ces affections récemment regroupées sous le terme d'IMID (Immune Mediated Inflammatory Diseases) comprennent trois grandes entités nosologiques : (1) les maladies auto-immunes systémiques (non spécifiques d'organe) et localisées (spécifiques d'organe), (2) les maladies auto-inflammatoires, (3) les affections inflammatoires de mécanisme indéterminé comprenant, notamment, des affections iatrogènes ou paranéoplasiques dont le mécanisme n'est pas auto-immun (Das, 2011).

2.3.3 Les anti-inflammatoires

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèses du type anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ou stéroïdien (corticoïdes), médicaments largement utilisés mais dont les effets secondaires sont parfois graves, en particulier la toxicité sur le système rénal et digestif (irritations digestives pouvant aller jusqu'à l'ulcération gastrique) (Das, 2011).

2.3.3.1 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (COX) (Bidaut-Russel, 2001). Les AINS traditionnels inhibent les deux enzymes capables de synthétiser des prostaglandines : la COX-1 et la COX-2. Les prostaglandines produites par la COX-1 jouent surtout un rôle physiologique (en particulier la protection gastrique), alors que celles produites par la COX-2 sont surtout produites dans des conditions inflammatoires (Vonkeman *et al.*, 2008).

2.3.3.2 Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes se sont des dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immune (Payne et Adcock, 2001). L'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables, le risque d'apparition de ces effets s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement. Conduisant à des troubles aigus tels que l'hypertension artérielle et d'ulcères gastro-duodénaux (Henzen, 2003).

2.3.3.3 Les anti-inflammatoires naturelles

Les effets anti-inflammatoires des polyphénols, qui peuvent être exercées au niveau moléculaire, sont dépendants de la structure spécifique des composés polyphénoliques. Les fonctions de macrophage, y compris la production de cytokines, peut également être affectée par certains flavonoïdes par la modulation de la cyclo-oxygénase inductible (COX-2) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Plusieurs études expérimentales ont rapporté les

effets immunomodulateur des composés polyphénoliques sur l'immunité humorale et cellulaire (Neyestani, 2008 ; Madhuri *et al.*, 2008).

2.4 Les plantes utilisées

2.4.1 *Globularia alypum*

2.4.1.1 L'aspect botanique et systématique

La plante *Globularia alypum* autrement appelée Globulaire est une plante classique appartenant à la famille des Globulariacées comprend deux genres dont *Globularia* et *Poskea* et d'environ trente espèces répartis en Europe et en Afrique du nord (Quezel et Santa, 1963). Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec alypon qui signifie calmer la douleur. *Globularia alypum* appelée communément Tasselgha (Beniston et Beniston, 1984) ; « Chebra », « Chelr'a », « Zerga », « zeriga », « zoutna », « alk », « haselra », « oulbarda » (Chograni *et al.*, 2011). Au Maroc elle est appelée Ein larneb (Jouad *et al.*, 2002). Le tableau 4 présente la classification botanique de la plante.

Tableau. 4 : Classification botanique d'*Anchusa azurea* et *Globularia alypum* (Quezel et Santa, 1963)

Classification	Répartition systématique	
	<i>Anchusa azurea</i>	<i>Globularia alypum</i>
Règne	Plantae	Plantae
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledone
Sous classe	Asteridae	Asteridae
Ordre	Lamiales	Scrophlariales
Famille	Borraginacea	Globulariaceae
Genre	Anchuza	Globularia
Espèce	<i>Anchusa azurea</i> Mill.	<i>Globularia alypum</i> L

Les plantes du genre *Globularia* sont vivaces arbustes rameux d'environ 60 cm de hauteur (30-60cm), à feuilles alternes, dont les fleurs groupées en capitules plus ou moins globuleux

entourés de bractées. Les fleurs ont une corolle à deux lèvres, la supérieure bilobée souvent atrophiée, l'inférieure trilobée. Elles sont en général bleues, à quatre étamines (Leporatti et Ghedira, 2009). Les feuilles toutes éparses sur les rameaux, coriaces, persistantes, glauques, de forme ovale ou oblongue, atténuées en court pétiole et disposées le long et au sommet des tiges très rameuses en buisson et ordinairement dressées (Figure. 5) (Beniston et Beniston, 1984)



A



B

Figure. 5 : Aspect morphologique de *Globularia alypum* (A : plan de la plante, B : sommités fleuries)(http://online.marburg.de/biologie/botex/mallorca05/bildgross/Globularia_alypum.jp)

2.4.1.2 La composition chimique et Activités biologiques

La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de plusieurs composés de genre *Globularia*. Ce sont essentiellement des flavonoïdes, des polyphénols, des tannins, des anthocyanines (Khlifi *et al.*, 2011), glucoside (globularine), résine, mucilages, tanin, choline, chlorophylle, acide-cinnamique, acide globularique (Chograni *et al.*, 2011).

Les iridoïdes glycosides constituent également des métabolites secondaires du genre *Globularia*. Ils comprennent un cyclopentane et des cycles pyranique. Ces structures sont connues pour leurs diverses activités biologiques (Es-safi *et al.*, 2006).

Les études montrent que la Globulaire est indiquée comme purgative, sudorifique, dépurative, antiseptique, antimycosique, cicatrisante, astringente et diurétique (Bellakhdar *et al.*, 1991; Fehri et Aiache, 2010). Des études bibliographiques confirment que les espèces du genre *Globularia* présentent des activités : antituberculose, cytotoxiques, antioxydantes et antidiabétique (Skim *et al.*, 1999 ; Jouad *et al.*, 2002; Es-safi *et al.*, 2006 ; Harzallah *et al.*, 2010).

2.4.2 *Anchusa azurea*

2.4.2.1 L'aspect botanique et systématique

Anchusa azurea est une plante d'un grand intérêt médical, elle se développe dans le sol profond, léger, riche, frais mais bien drainé. Elle est largement distribuée dans la région méditerranéenne: le sud de l'Europe et le nord de l'Afrique, en particulier en Algérie et au Maroc. Son appellation revient au mot Grec signifiant « visage maquillé » en raison d'un colorant rouge extrait de ses racines, qui pouvait servir de base de maquillage à l'époque Quezel et Santa, 1963 ; Bonnier et De Layens, 1985).

Anchusa azurea est une plante vivace à tiges rameuses dressées, de type végétal herbacée. La tige dressée est ramifiée plus ou moins abondamment et, comme les feuilles, pourvue d'une pilosité plus ou moins dense. Les feuilles sont de types alternes, simples, entiers ou peu sinués sur les bords. Les feuilles inférieures sont atténuées en pétioles alors que les feuilles supérieures sont sessiles. Leur nervation est simple, avec une seule nervure principale, centrale. La floraison a lieu d'avril à juillet, selon les régions. Les fleurs bleues, plates et à cinq pétales attachés, sont groupées à l'extrémité des rameaux. Les sépales, au nombre de cinq sont de couleur vert foncé (Figure. 6), fortement nervurés et relativement étroits, acérés ; ils sont indépendants les uns des autres. Les pétales bleus les plus fréquemment, sont liés les uns

aux autres. Les pétales portent des écailles saillantes découpées en lanières filiformes. Le fruit est un akène formé de quatre parties (une tétrade), renfermant chacune une graine (alors qu'il y a cinq carpelles : presque systématiquement, l'un d'entre eux avorte) (Quezel et Santa, 1963 ; Bonnier et De Layens, 1985).

La plante est connue encore par plusieurs appellations; (Arabe) : Hamham / Hmiah, (Français) : Bourrache bâtarde, Fausse bourrache, Langue-de-bœuf, Langue-d'oie, Buglosse azurée, Buglosse d'Italie, (Anglais): Garden Anchusa, Italian Bugloss, Large Blue Alkanet, (Espagnol) : Buglossa blava, Llengua bovina, Lengua de bue, Lenguaza, (Italien) : Buglossa azzurra, Lingua di bue, Lingua di manzo, Buglossa-volgare, le tableau 4 représente la classification botanique de cette plante.



Figure. 6 : Quelques photos d'*Anchusa azurea*.
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anchusa_azurea_flor.jpg

2.4.2.2 La composition chimique et activités biologiques

La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de plusieurs flavonols glycosylés: astragaline, isoquercitrine, rutine, kaempferol 3-O-a-rhamnopyranosyl et un acide phénolique: l'acide rosmarinique (Kuruüzüm-uz et *al.*, 2011)

Les applications de la plante entière sont très vastes, généralement *Anchusa azurea* est récoltée en fleurs et séchée pour une utilisation ultérieure comme ; antitussive, dépurative, diurétique et sudorifique, de plus les différentes parties de la plante ont été appliquées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de la variole et la rougeole. La poudre d'herbes séchées est appliquée comme cataplasme dans le traitement de quelques inflammations, alors que les racines fraîches de toutes les espèces *Anchusa* (souvent appelé orcanette) sont utilisés soit comme colorant rouge ou dans les pommades à usage externe pour le traitement des plaies et des brûlures. Au contre partie la plante contient des alcaloïdes qui peuvent avoir un effet paralysant et cancérigène (Little, 1984).

3 Matériel et Méthodes

3.1 Matériel

3.1.1 Matériels biologiques

Les souches bactériennes : Les souches bactériennes suivantes sont utilisées dans notre recherche :

- Les bactéries à Gram-négatif: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.
- Les bactéries à Gram-positif: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

Ces souches bactériennes proviennent du Laboratoire des Substances Naturelles de l'Université de Tlemcen. Elles sont conservées dans le milieu MHB (Muller Hinton Broth) additionné de 10% (V/V) de glycérol à -20°C.

Les animaux : L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles, Swiss albinos dont le poids varie entre 25 et 30 g, procurés aux prés de l'Institut Pasteur d'Alger. Ces souris sont utilisées après une période d'adaptation de 7 jours, elles ont eu accès libre à l'eau et à la nourriture standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

Les plantes: La récolte du *Globularia alypum* a été effectuée le mois de juin 2011 dans la commune de Ouled Si Ahmed (Sétif). La récolte d'*Anchuza azurea* a été effectuée le mois de juin 2011 dans la région de Ben Daoud (Wilaya de Bordj-Bou-Argeridj). L'identification d'*Anchuza azurea* a été faite par Pr. Laouer H, Laboratoire des Substances Naturelles, Université de SETIF.

3.1.2 Réactifs chimiques

Tous les produits chimiques utilisés proviennent de chez Sigma, Fluka et prolabo. La xanthine oxydase d'origine bactérienne et la β -lactamase de type pénicillinases de *Bacillus cereus* proviennent de Sigma.

3.2 L'extraction et analyse des extraits

3.2.1 La préparation et le fractionnement de l'extrait brut

Les parties aériennes des deux plantes utilisées sont préalablement nettoyées et broyées et additionnées dans un mélange méthanol/eau (85%), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur (BÜCHI), permettant ainsi d'obtenir un extrait brut (EBr). 50 ml de cet extrait sont séchés afin de déterminer leur valeur en matière sèche ainsi que le rendement d'extraction. Le volume restant sera fractionné ultérieurement. Selon la méthode de Markham (1982), en utilisant une série de solvants à polarité croissante, l'extrait brut est initialement mélangé avec l'hexane (1V/V), cette étape est refaite plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (EHx). La phase inférieure est soumise à un autre fractionnement par le chloroforme pour donner l'extrait du chloroforme (ECh), et enfin par l'acétate d'éthyle pour donner la fraction de l'acétate d'éthyle (EAc). Le raffinat qui en résulte représente la fraction aqueuse (EAq) résiduelle qui est également soumise à un séchage et conservés avec les autres extraits.

3.2.2 Le dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des différents extraits est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) de réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleu. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. En effet, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 200 μl d'extrait ou standard (préparé dans le méthanol ou l'eau distillée) avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 μl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 $\mu\text{g/ml}$) et est exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait) (Figure. 7).

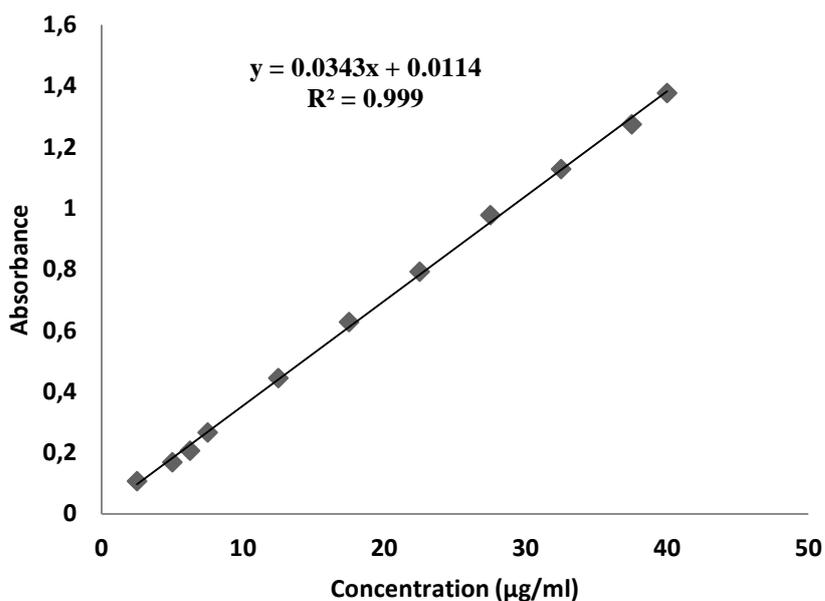


Figure. 7 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

3.2.3 Le dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Baharun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. La méthode consistait à ajouter 1 ml d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 $\mu\text{g/ml}$) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) (Figure. 8).

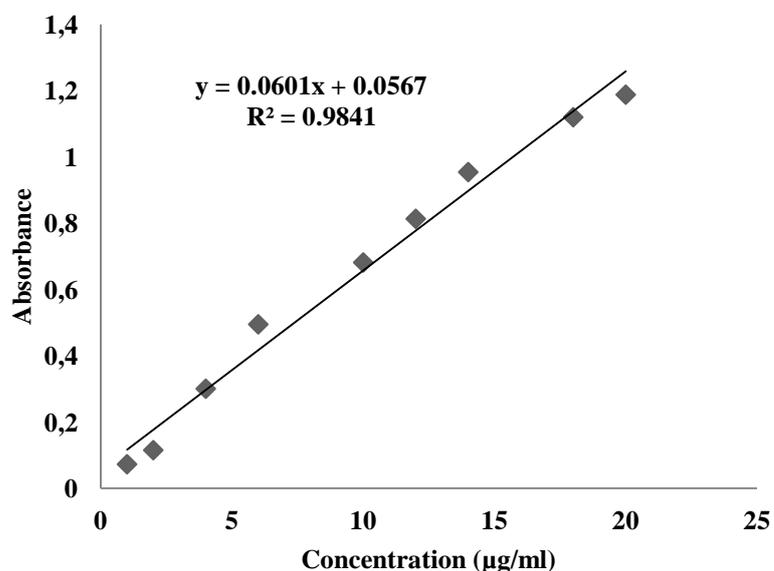


Figure. 8 : Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois essais).

3.3 L'activité antibactérienne

Cette partie vise à évaluer le potentiel antibactérien des extraits et leurs effet synergique avec un antibiotique "la Gentamicine" et enfin déterminer l'effet inhibiteur de ces extraits sur les β -lactamases.

3.3.1 *L'inhibition de la croissance bactérienne*

L'activité antimicrobienne des différents extraits obtenus a été déterminée sur plusieurs souches bactériennes en utilisant la méthode des disques, son principe est basé sur la diffusion des substances testées du disque vers le milieu de culture solide. Une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland (absorbance de 0.08-0.1 à 625 nm) est préparée à partir d'une culture jeune (18 heures). Un inoculum de cette suspension est ensemencé sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller Hinton. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, le frottement de l'écouvillon sur la même boîte de pétri a été répété à trois reprises en tournant à chaque fois la boîte d'un angle de 60°. Une fois l'ensemencement est effectué, des disques de 6 mm de diamètre sont déposés sur la surface de la gélose ensemencée et imprégnés de 10 µl de l'extrait (100 mg/ml). Deux autres disques imprégnés avec de l'eau distillée et le DMSO sont utilisés comme contrôle négatifs. La gentamicine « antibiotique de référence » est utilisée comme standard. Après une incubation de 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition produites par les extraits étudiés sont mesurés, plus le diamètre d'inhibition est grand, plus l'activité antimicrobienne est importante (Rahal, 2005).

3.3.2 *L'activité antibactérienne synergique*

En raison de la nature peu toxique des flavonoïdes, la combinaison des antibiotiques et des flavonoïdes est une nouvelle stratégie potentielle de développement d'une nouvelle thérapie anti-infectieuse. Il s'agit du même protocole décrit dans la partie 2.3.1 (Rahal, 2005), seulement les disques d'antibiotique de Gentamicine sont imprégnés avec 10 µl d'extraits des deux plantes (100 mg/ml).

3.3.3 Le test d'inhibition enzymatique des β -lactamases

Les flavonoïdes ont une fonction 4-oxo semblable à celle de l'acide clavulanique et la pénicilline. De ce fait, on a pensé d'évaluer l'effet inhibiteur des flavonoïdes et polyphénols extraites à partir des plantes sur une β -lactamase de type pénicillinases de *Bacillus cereus*. L'activité enzymatique est testée en présence de quatre concentrations croissantes de chaque extrait.

Les extraits des plantes sont traités avec l'albumine sérique bovine afin d'éliminer les tannins et donc éviter l'inhibition des β -lactamases suivant la méthode de Berboucha et ses collaborateurs (2010). Le mélange est préparé par 2 ml d'une solution de sérum albumine bovine et 1 ml (1 mg/ml) d'extrait. Le mélange est incubé pendant 24 heures à 4°C. Après centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes, le précipité est éliminé et le surnageant obtenu est utilisé pour les tests d'activité.

Les tests d'inhibition sont réalisés dans des plaques de 96 puits selon la méthode de Yang et ses collaborateurs (2010) avec quelques modifications. Les tests d'inhibition sont réalisés en présence de volume réactionnel final de 200 μ l dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7). 10 μ l d'enzyme est préincubée avec la solution d'inhibiteur pendant 10 minutes à 25°C. La réaction est initiée par l'addition de 10 μ l de nitrocéfine (250 μ M), puis l'augmentation de l'absorbance à 482 nm est suivie. Les vitesses initiales d'hydrolyse en μ mol/min sont calculées et le pourcentage d'inhibition est déterminé en suivant la formule: $(V_{it} - V_{ie} / V_{it}) \times 100$ (V_{it} : l'activité de l'enzyme dans le puits témoin, V_{ie} : la vitesse initiale de l'enzyme dans le puits contenant l'extrait de plante).

3.4 L'activité antioxydante *in vitro*

Les extraits sont testés pour évaluer leur capacité antioxydante, deux différents tests d'évaluation sont utilisés, à savoir le test du DPPH qui permet de déterminer l'effet scavenger, le système β -carotène/acide linoléique qui détermine le pouvoir réducteur.

3.4.1 *L'effet scavenger du radical DPPH*

L'activité anti-radicalaire des différents extraits est déterminée en utilisant le DPPH comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par Boumerfeg et ses collaborateurs (2009). Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrayl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. En effet, la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50 μ l des solutions d'extraits ou standards (quercétine, rutine, BHT) sont ajoutés à 1250 μ l DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs_{517} \text{ échantillon}) / Abs_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

Les concentrations des antioxydants standards (Quercétine, Rutine et BHT) sont comprises entre 0 à 400 μ g/ml. La concentration inhibitrice de 50% de l'activité du DPPH (IC_{50}) exprimée en μ g/ml de chaque extrait est calculée et comparée avec celle du BHT.

3.4.2 *Le test de blanchissement de la β -carotène/acide linoléique*

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif de la β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Aslan et ses collaborateurs (2006). L'émulsion de β -carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 0.5 mg de β carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur. Par la suite, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène est ajouté, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. 350 μ l de solution d'extraits ou d'antioxydants de référence (BHT) solubilisés dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2.5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 μ l de méthanol) est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers (1, 2, 3, 4, 6, 24 et 48 heures). Le pourcentage de l'activité antioxydante relative des extraits (AA%) est calculé selon l'équation suivante :

$$AA\% = \text{Abs}_{t=24h} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{t=24h} (\text{BHT}) * 100$$

3.5 **L'activité anti hémolytique**

La résistance des érythrocytes prétraités par les extraits des plantes et un attaque radicalaire est évaluée selon le protocole décrit par Takebayashi et ses collaborateurs (2010) avec quelques modifications en remplaçant le radical AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl] par le tert-butyle hydroperoxyde (T-BHP) (Dwight et Hendry, 1996). Le sang des souris utilisé dans ce test est obtenu par décapitation. Le sang est collecté dans un tube hépariné, puis dilué dans un tampon phosphate (300 mOs, pH 7.4) pour obtenir un hématocrite de 2%.

L'attaque radicalaire est induite par l'addition du T-BHP (166 μM) à la suspension érythrocytaire préalablement incubée (15 min) avec les extraits du l'EBr, ECh, EAc, et EAQ des deux plantes, pour chaque extrait, quatre concentrations ont été testées: 10.59, 21.18, 42.37, 84.74 $\mu\text{g/ml}$, la vitamine C est utilisée comme standard. Après trois heures d'incubation avec le T-BHP à 37°C, la cinétique de disparition progressive des hématies est suivie par la mesure dynamique de la diminution de l'absorbance à 620 nm, La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (Half-Hemolysis Time; HT₅₀). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne HT₅₀ \pm SEM (n= 5).

3.6 L'activité antioxydante *in vivo*

Dans le but de choisir une bonne dose thérapeutique non toxique, la DL₅₀ a été déterminée. Les activités antioxydantes des extraits par la suite sont confirmées *in vivo* chez les souris par l'administration d'extrait pendant 21 jours. La capacité antioxydante totale du sang a été évalué en déterminant les HT₅₀, la capacité antioxydante plasmatique a été également déterminée en utilisant le test de piégeage du radical DPPH et FRAP.

3.6.1 La toxicité aigue « Détermination de la DL₅₀ »

La toxicité aigue se manifeste rapidement après une prise unique d'extrait brute ou à court terme après plusieurs prises rapprochées. L'objectif recherché est de décrire les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux et fournis, l'indication de la DL₅₀. L'étude sur les souris de laboratoire est effectuée sur un nombre homogène d'animaux (n= 10), la durée de l'observation des animaux est déterminé par l'expérimentateur pendant 14 jours (Diallo, 2005).

La dose létale 50 (DL₅₀) est la dose d'une substance chimique qui, administrée aux souris, provoque la mort de la moitié d'entre eux; elle peut être déterminée selon plusieurs méthodes (Dupont, 1970). Dans notre approche, nous avons appliqué l'analyse par la méthode de probits (méthode des moindres carrés, Méthode de Finney) en utilisant le logiciel stat PLUS 5.8.0.0, 2009 (Abu sitta *et al.*, 2009) pour déterminer la DL₅₀ des deux extraits de plantes *Anchusa azurea* et *Globularia alypum*. Le principe de cette technique consiste à administrer des doses croissantes de substance à des lots de souris de masses uniformes, la dose administrée est exprimée en mg/kg de masse corporelle des animaux et la différence entre les doses voisines doit être constante. Pour chaque lot, on note le pourcentage de mortalité dans l'heure qui suit ou au bout du temps imparti.

La DL₅₀ permet de mesurer la toxicité d'une substance et d'établir des classes de toxicité. En général, plus la DL₅₀ est petite, plus la substance est toxique (Oduola *et al.*, 2007). Les souris préalablement mis à jeun pendant 24 heures sont regroupés par lot de 10 pesants entre 25-30 g. Les doses utilisées sont : 0, 300, 350, 400 et 450 mg/kg d'extrait brut méthanolique des deux plantes étudiées. Les extraits ont été administrés aux souris par voie intra péritonéale, le lot témoin n'a reçu que du NaCl 9 ‰. Par la suite, les symptômes possibles sont observés ainsi que le nombre de morts au bout du temps imparti (les premières 15 min ensuite la 1^{ère} h, 2h, 24h, 72h jusqu'au 14^{ème} jour).

3.6.2 L'effet sur la capacité antioxydante totale du sang

Des souris mâles, Swiss albinos, adultes de poids variant entre 25 et 30 g, sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en plusieurs lots expérimentaux de 9 à 10 animaux chacun.

L'administration des extraits s'est faite par injection intrapéritoniale quotidiennement durant trois semaines. Pour *Anchusa azurea* :

- Group témoin (CNTL) : ces souris ont reçu un volume d'une solution d'eau physiologique 9‰,
- Groupe (VIT C): ces souris ont reçu une dose de 50mg/kg de vitamine C,
- Groupe (EBr-D1): ces souris ont reçu une dose d'EBr de 100 mg/kg,
- Groupe (EBr-D2): ces souris ont reçu une dose d'EBr de 200 mg/kg.

Pour *Gobulria alypum*, les souris sont réparties en 5 groupes :

- Groupe témoin (CNTL): ces souris ont reçu un volume d'une solution d'eau physiologique 9‰,
- Groupe (VIT C): ces souris ont reçu une dose de 50 mg/kg de vitamine C,
- Groupes (EBr), (EAc) et (EAq) : ces souris ont reçu une dose de 100 mg/kg d' EBr, EAc et EAq, respectivement.

Le prélèvement sanguin est réalisé sur les souris anesthésiées par l'éther diéthylique. Au cours de chaque prélèvement, un aliquote de sang total est transféré immédiatement vers un autre tube contenant le tampon phosphate (300 mOs, pH 7.4) afin d'obtenir un hémocrite de 2%. Ce sang est utilisé pour évaluer la capacité anti oxydante totale. La quantité du sang restante est centrifugée à 1500 g pendant 5 min à 4°C. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour le test du DPPH et FRAP.

La capacité anti oxydante totale du sang est mesurée suivant le protocole décrit par Takebayashi et ses collaborateurs (2010) avec quelques modifications (Manna *et al.*, 2002). Le sang obtenu précédemment (hémocrite de 2%) est soumis à une attaque radicalaire par l'addition du T-BHP à la suspension érythrocytaire. La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie à 37°C par la mesure de la diminution de l'absorbance à 620 nm. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de

50% des érythrocytes (HT₅₀). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne HT₅₀ ± SEM.

3.6.3 *L'effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH*

Dans ce test, la capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de Hasani et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications, en se basant sur le même principe que celui du test de DPPH effectué précédemment *in vitro*. Brièvement, un volume de plasma est additionné à la solution méthanolique de DPPH (2.4 mg/100 ml de méthanol). Après 30 min d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation, l'absorbance à 517 est mesurée. Le pouvoir antioxydant plasmatique est ensuite calculé selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs_{517} \text{ échantillon}) / Abs_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

3.6.4 *Le pouvoir réducteur plasmatique évalué par la technique de FRAP*

L'essai Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) est réalisé selon la méthode décrite initialement par Benzie et Strain (1996) et modifiée par Pulido et ses collaborateurs (2000). Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe³⁺-TPTZ) en ferreux (Fe²⁺-TPTZ) à pH acide. Une solution fraîche du réactif FRAP est préparée par mélange de 2,5 ml de la solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) avec 2.5 ml du FeCl₃.6H₂O (20mM) et 25 ml du tampon acétate (300 mM d'acétate de sodium, pH conduit à 3,6 par l'acide acétique). 300 µl du réactif FRAP, préalablement incubé à 37°C, sont mélangés avec 30 µl d'eau bi-distillée et 10 µl de sérum. L'augmentation de l'absorbance à 593 nm est ensuite suivie pendant 30 minutes à 37°C. Une gamme du FeSO₄.7H₂O (étalon réducteur) entre 0 et 2000 µM est utilisée pour calculer les valeurs FRAP des extraits et des antioxydants standards (Figure. 9). La valeur FRAP est exprimée en mM du FeSO₄.7H₂O/ 10 µl de sérum.

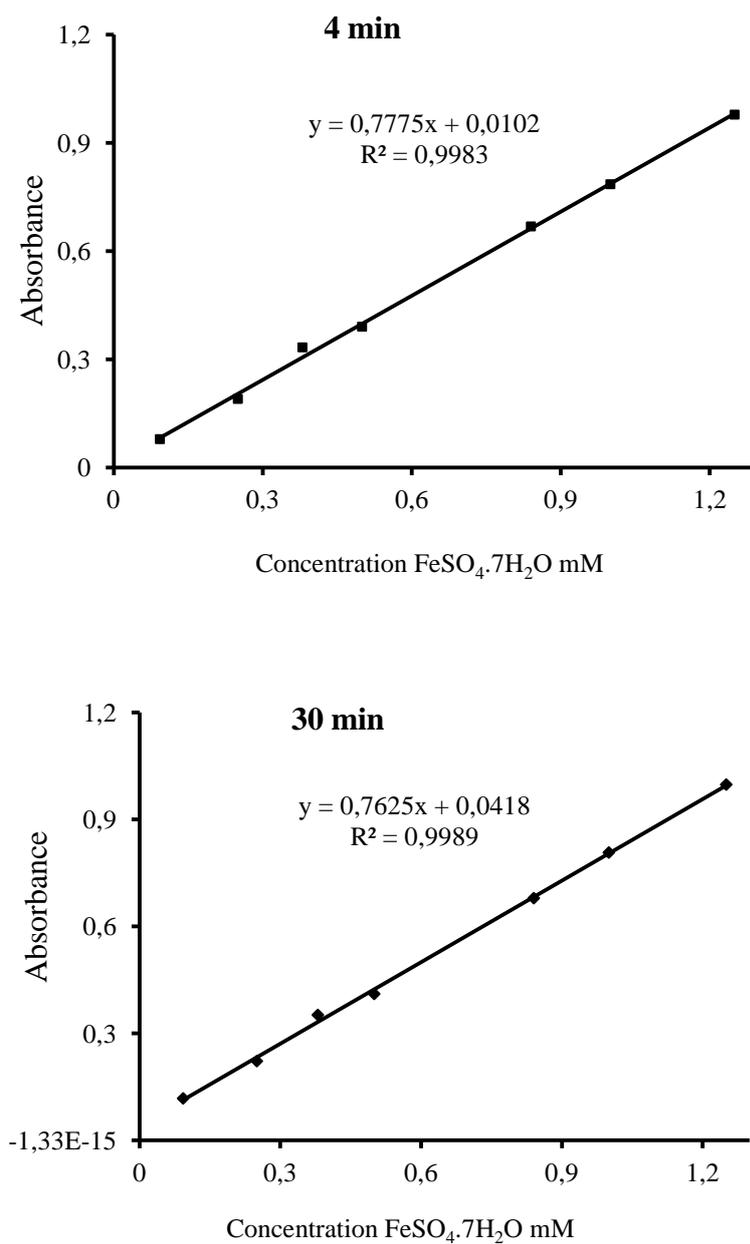


Figure. 9 : Les courbes d'étalonnage de FeSO₄·7H₂O.

3.7 L'activité antiinflammatoire utilisant PMA

L'effet anti-inflammatoire est évalué selon la méthode de Garrido et ses collaborateurs (2004) sur des souris mâles adultes (25-30 g). 4 mg/oreille des PMA (phorbol myristate acétate) dans 20 µl de DMSO, est appliqué sur la surface de l'oreille gauche de chaque souris. L'oreille

droite (contrôle) a reçu le véhicule (20 µl DMSO). L'EBr est administré 1 heure avant l'application du PMA. Les souris sont réparties en quatre groupes :

- Un groupe contrôle négatif « témoin »: ces souris ont reçu un volume d'une solution d'eau physiologique 9‰,
- Un groupe contrôles positif « le Diclofénac »: ces souris ont reçu une dose de (10 mg/kg) d'un anti-inflammatoire de référence « le Diclofénac »,
- Un groupe EBr-AA: ces souris ont reçu une dose de d'extrait méthanolique d'*Anchusa azurea* de 100 mg/kg,
- Un groupe EBr-GA: ces souris ont reçu une dose de d'extrait méthanolique de *Globulria alypum* de 100 mg/kg,

Six heures après l'application du PMA, les souris sont tués par dislocation cervicale et un disque de 6 mm de diamètre de chaque oreille est enlevé et pesé. L'œdème de l'oreille est calculé par la soustraction du poids de l'oreille gauche (véhicule) de l'oreille droite (traitée), et est exprimé en poids de l'œdème. Le pourcentage d'inhibition est exprimé comme une réduction en poids par rapport au groupe témoin.

Réalisation des coupes histologiques : Les disques de chacune des deux oreilles sont fixés dans le formol 10% pendant une semaine. Les étapes suivantes : inclusion, coupure et coloration sont effectuées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique, CHU de Sétif.

Les échantillons sont déshydratés par passage dans trois bains successifs d'éthanol (70 - 75°, 90 - 95° et 100°) pendant 30 min, puis éclaircies dans le toluène pendant 20 min et inclus dans la paraffine (deux bains de 2 heures pour chacun). Cette opération est automatisée à l'aide d'un appareil, TISSUE-TEK® II). L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques. Les blocs de paraffines obtenus sont ensuite coupés par microtome (LEICA RM

2145). Les coupes de 5 μm d'épaisseur sont étalées sur des lames et séchées pendant une heure à 37°C, réhydratées, colorées à l'hématoxyline-éosine (Bensalem-Bendjelloul, 1998).

3.8 Le test d'inhibition enzymatique de la XO

3.8.1 L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits sur l'activité du XO

L'activité de la xanthine oxydase (XO) est déterminée par méthode colorimétrique en suivant la production de l'acide urique à 295 nm ($\epsilon_{\text{acide urique}} = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Bray, 1975) en présence de 100 μM de xanthine dans le tampon phosphate (Baghiani *et al.*, 2003).

Les solutions des différents extraits sont préparées dans le DMSO (2% dans le volume réactionnel final). L'allopurinol est utilisé comme control positif. Les extraits ont été utilisés à des intervalles de concentrations différents. L'activité inhibitrice des différents extraits est exprimée en pourcentage d'inhibition calculé ainsi :

$$\% \text{ inhibition} = (A-B/A) \times 100 \text{ ((A): l'activité de l'enzyme en absence de l'inhibiteur, (B) l'activité de l'enzyme en présence de l'inhibiteur).}$$

Les IC_{50} (dose qui inhibe 50% de l'activité enzymatique) des extraits testés sont déterminées par la méthode du Logit à partir de la courbe de régression linéaire établie par la transformation linéaire dite « Logit-Log probit ».

3.8.2 La détermination du type d'inhibition

L'ensemble des cinétiques enzymatiques des substrats et inhibiteurs sont réalisées par une méthode spectrophotométrique utilisant un spectrophotomètre UV-visible (UV-visible 8500).

L'activité enzymatique est mesurée en suivant la production de l'acide urique à 295 nm ($\epsilon_{\text{acide urique}} = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en présence de concentrations croissantes du substrat et inhibiteurs.

Les paramètres cinétiques sont déterminés par la représentation de Lineweaver-Burk grâce au logiciel « SIGMAPLOT 12.5 » auquel le module « Enzyme Kinetics 1.1 » a été ajouté. Les tests d'inhibition sont réalisés en présence de concentrations croissantes de la xanthine (10 à 120 μM) et de concentration croissante d'inhibiteur. Le volume réactionnel final est de 500 μl dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7.4. Les vitesses initiales de la réaction en $\mu\text{mol}/\text{min}$ sont calculées et le type d'inhibition est déterminé. La valeur de l'activité enzymatique est la moyenne de trois mesures \pm SD. L'allopurinol, quercétine et catéchine sont utilisés comme contrôle positifs.

3.8.3 L'effet hypouricémique des extraits

Des souris mâles adultes et de poids variant entre 25 et 30 g sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en 7 lots expérimentaux de 8 à 9 animaux pour chacun. L'induction de l'hyperuricémie est faite par l'injection intrapéritoniale de 200 mg/kg de potassium oxonate. Après une heure, les extraits sont administrés par voie intrapéritonéale (100 mg/kg). Les souris sont réparties en 7 groupes :

- Groupe 1 (Témoin) : groupe normal non traité à qui on a injecté le véhicule (l'eau physiologique).
- Groupe 2 (OP): groupe a été injecté par l'oxonate de potassium.
- Groupe 3 (OP + allopurinol): groupe a été injecté par l'oxonate de potassium puis traité par 10mg/kg d'allopurinol.
- Groupe 4 (OP + EBr): groupe a été injecté par l'oxonate de potassium puis traité par 100 mg/kg d'EBr.
- Groupe 5 (OP + ECh): groupe a été injecté par l'oxonate de potassium puis traité par 100 mg/kg d'ECh.

- Groupe 6 (OP + EAc): groupe a été injecté par l'oxonate de potassium puis traité par 100 mg/kg d'EAc et
- Groupe 7 (OP + EAq): groupe a été injecté par l'oxonate de potassium puis traité par 100 mg/kg d'EAq.

Le prélèvement sanguin est réalisé après 1 heure de traitement sur des souris anesthésiées. Le sang est recueilli dans un tube hépariné, puis centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes. Le sérum obtenu est conservé à - 20°C jusqu'à usage.

Les foies de chaque groupe sont récupérés, rincés avec un tampon saliné et homogénéisé dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7.8) et centrifugé à 8000 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est utilisé pour le dosage d'acide urique (Shi-Fu *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2011).

Dosage de l'acide urique : La concentration de l'acide urique du sérum et le surnageant du foie est déterminée. Ces dosages sont réalisés au niveau du Laboratoire Central de l'Hôpital Universitaire de Sétif (CHU) en utilisant un automate Bechman et des kits achetés auprès de *spinreact Diagnostics*.

L'évaluation de la fonction rénale: Les sérums sont utilisés aussi pour l'évaluation de la fonction rénale, l'urée et la créatinine sont mesurés en utilisant un automate de et des kits achetés auprès de *spinreact Diagnostics*.

3.9 Les analyses statistiques

Les valeurs ont été en général exprimées en moyenne \pm SEM. Les résultats des différents tests sont analysés par le test *t* de *Student* pour les comparaisons simples, et ANOVA univariée suivie du test de *Dunnnett* et *Tukey* pour les comparaisons multiples et la détermination des

taux de signification. La comparaison des moyennes et des variances est déterminée grâce au logiciel « Graphpad Prism » version 5.0.

4 Résultats et discussion

4.1 L'extraction et l'analyse des extraits

La méthode d'extraction suivie (Markham, 1982) est recommandée pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes. L'extraction est effectuée en deux grandes étapes, la première est une extraction par un mélange hydroalcoolique (méthanol/eau) pour obtenir initialement l'extrait brut contenant les biomolécules totaux. La deuxième étape de fractionnement est réalisée par une série de solvants à polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle) permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction.

L'utilisation de différents solvants, à polarités différentes, a permis de séparer ces composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation. L'extrait méthanolique (EBr) peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins. L'extrait d'hexane (EHx) qui est en générale constitué de lipides et de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, l'extrait chloroformique (ECh) est plus riche en flavonoïdes aglycones, l'extrait d'éthyle acétate (EAc) contient les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés et l'EAq peut être constitué des flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tétra-glycosylés) (Andersen et Markham, 2006).

Le rendement de la méthode d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps de macération, la température, le solvant d'extraction et la nature chimique de l'échantillon (Su *et al.*, 2006). Le tableau 5 montre que l'EBr-GA représente le rendement le plus élevé en comparaison avec ECh et EAc suivi par EAq. Dans cette recherche, l'EBr-GA a donné un rendement plus élevé (35%) que celui obtenu avec le l'EBr-AA (7%) (Tableau 5). Cette différence est probablement due à la nature de la plante utilisée, car les conditions de l'extraction (solvant, température et temps) sont les mêmes pour les deux plantes. Il faut signaler également que l'EAc-GA et l'EAq-GA représente un rendement très élevé (24% et 19%, respectivement).

Tableau. 5 : Rendements des diverses fractions extraites en pourcentage par rapport au poids total.

Extraits	<i>Anchusa azurea</i>	<i>Globularia alypum</i>
EBr	7.58 ± 0.21%	35.52 ± 3.38%
ECh	0.108 ± 0.011%	12.91 ± 1.32%
EAc	1.07 ± 0.11%	24.77 ± 0.35%
EAq	3.61 ± 0.36%	19.19 ± 0.29%

Dans le but de caractériser les extraits préparés, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes est effectué. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). L'acide gallique est utilisé comme standard et la teneur en polyphénols totaux est exprimée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait). Le dosage des flavonoïdes est réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait). Les résultats sont représentés dans le tableau 6.

Tableau. 6 : Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.

Extrait	<i>Anchusa azurea</i>		<i>Globularia alypum</i>	
	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)
EBr	9.94 ± 0.008	1.88 ± 0.43	140.24 ± 4.18	2.64 ± 0.08
ECh	49.11 ± 0.17	8.98 ± 1.74	81.01 ± 1.91	1.12 ± 0.15
EAc	60.31 ± 0.70	3.78 ± 0.78	157.74 ± 5.27	8.56 ± 0.22
EAq	32.77 ± 0.59	1.32 ± 0.33	100.86 ± 0.76	2.20 ± 0.12

^(a) μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

^(b) μg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 à 4 mesures \pm SD.

Le dosage des polyphénols dans les différents extraits montre que l'extrait (EAc) est le plus riche en polyphénols pour les deux plantes suivi par l'ECh-AA et l'EBr-GA. La détermination des taux de flavonoïdes révèle que l'ECh-AA est le plus riche suivi par l'EAc-AA. Par contre, l'ECh-GA représente la fraction la plus pauvre, l'EAc-GA est le plus riche en flavonoïdes suivis par l'EBr-GA et l'EAq-GA.

4.2 L'activité antibactérienne

4.2.1 L'inhibition de la croissance bactérienne

L'effet antibactérien des extraits d'*Anchusa azurea* et *Globularia alypum* est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur l'agar. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 7.

Tableau. 7 : Activité antibactérienne des extraits d'*Anchusa azurea* (AA) et *Globularia Alypum* (GA) exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm, GEN : Gentamicine. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

Souches	Zone d' inhibition (mm)								
	EBr-	ECh-	EAc-	EAq-	EBr-	ECh-	EAc-	EAq-	GEN
	AA	AA	AA	AA	GA	GA	GA	GA	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	12	0	15	09	16	10	25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	08	0	0	0	09	10	0	21
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	11	11	08	8.5	11	11	12	09	15
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	07	07	08	09	09	12	09	11	11
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	0	08	09	0	09	08	08	09	13
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	0	08	11	0	10	09	12	-	24
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	08	09	-	-	-	-	15	09
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10	11	-	-	16	13	20	12	33
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	07	09	09	-	08	11	09	-	18
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	-	07	10	-	-	09	10	-	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	07	09	-	-	07	09	-	11

Les extraits ECh-AA et EAc-AA semblent avoir l'effet inhibiteur le plus élevé. Ces extraits ont une activité inhibitrice sur presque la totalité des souches. En effet, ces deux extraits ont induit des zones d'inhibition d'un diamètre qui varie entre 8 mm et 12 mm. Ces effets sont plus faibles que ceux obtenus avec l'antibiotique standard utilisé, à savoir la Gentamicine (GEN), qui a donné des diamètres d'inhibition de 11 à 33 mm (Tableau.7). De ces résultats, il ressort également que l'EBr-AA a induit des effets inhibiteurs entre 07 mm et 11 mm envers quatre souches testées (Tableau.7). L'EAq-AA a montré une activité inhibitrice envers uniquement la croissance de *Salmonella typhimurium* et *Acinetobacter baumannii*. Les extraits les plus actifs sont l'EAc sur *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 12 mm, l'ECh-AA sur les souches de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 11 mm et l'EBr-AA sur *Salmonella typhimurium* avec une bonne zone d'inhibition de 11 mm. Ces différences peuvent être expliquées par le taux élevé en principe actif antibactérien.

L'évaluation de l'effet antibactérien des extraits du GA a montré que l'activité antibactérienne exhibée par l'EAc-GA et ECh-GA est plus importante que celle obtenue avec les autres extraits. Cependant, l'EBr a inhibé plus de souches bactériennes que l'EAq, qui a donné quand même une inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (zone d'inhibition de 15 et 16 mm, respectivement).

Ces différences semblent indiquer que les extraits ECh et EAc ont un taux plus élevé ou plus de principes actifs antibactériens que les autres extraits. Il est à noter que dans la présente recherche, les extraits les plus actifs sont: l'EAc-GA et EBr-GA sur *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 16 et 20 mm, respectivement), l'ECh-GA sur la souche *Acinetobacter baumannii*. Cet effet est plus considérable que celui obtenu avec l'antibiotique standard à savoir la Gentamicine qui a donné un diamètre d'inhibition de 11 mm. L'EAq-GA a présenté

une forte activité antibactérienne sur *Klebsiella pneumoniae* (15 mm) en comparant à la Gentamicine qui donne une zone de 09 mm.

Selon Loziene et ses collaborateurs (2006), l'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs à savoir : l'espèce de la plante, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, et la sensibilité des bactéries.

Les résultats obtenus dans cette recherche ont montré que les extraits EAc et ECh ont un effet inhibiteur de la croissance de la plupart des souches bactériennes testé, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii*. La polarité du solvant utilisé pourrait être à l'origine de ces résultats.

En effet, Fernandez-Lopez et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne peuvent être les diterpénoïdes phénoliques, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes. Ces composés sont hautement lipophile est par conséquent sont extraits par des solvants de faible polarité tel que le chloroforme (Albano et Miguel, 2010). Hailu et ses collaborateurs (2007) ont confirmé ces résultats, ils ont montré que les fractions non polaires d'extraits de plantes (l'éther de pétrole et le chloroforme) ont une forte activité antibactérienne par rapport aux fractions relativement polaires (l'acétone et le méthanol). Dans d'autres études, parmi les vingt différents solvants évalués: le chloroforme est le meilleur solvant pour l'extraction des composés biologiques actifs non polaires (Harmala *et al.*, 1992 ; Das *et al.*, 2010).

Il a été rapporté que cette activité inhibitrice de la plante pourrait être due à la présence et à la nature chimique des polyphénols et flavonoïdes. Des études effectuées sur l'activité antibactérienne de ces molécules ont montré qu'il n'existe pas une relation claire entre le degré d'hydroxylation des flavonoïdes et leur efficacité sur les microorganismes. Selon ces études, les flavonoïdes qui n'ont pas un groupement hydroxyle sont plus actifs contre les

micro-organismes. Cette constatation appuie l'idée que leur cible microbienne est la membrane cytoplasmique, donc le caractère lipophile de ces composés perturbant cette structure (Chabot *et al.*, 1992). Cependant, d'autres chercheurs ont mentionné que plus le degré d'hydroxylation est élevé, plus l'activité antimicrobienne est remarquable (Sato *et al.*, 1996).

La modeste activité des extraits aqueux envers la plupart des souches utilisées pourrait être expliquée par le fait que les substances hydrosolubles ne peuvent pas accéder aux substances non hydrosolubles des cellules bactériennes. En effet, l'eau est un solvant utilisé pour extraire les principes végétaux ayant une activité antimicrobienne plus au moins importante. En médecine traditionnels, on utilise principalement l'eau mais l'extraction à partir des solvants organiques donne une activité antimicrobienne plus significative (Parekh *et al.*, 2005 ; Das *et al.*, 2010). Selon Candan et ses collaborateurs (2003), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Elles n'ont pas la même capacité des molécules liposolubles qui s'intercalent dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

Dans la présente recherche, le profil d'activité antimicrobienne des extraits contre les souches testées a indiqué que *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus sensible de toutes les souches. Autrement dit, les bactéries à Gram-positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram-négatif. Cette différence peut être attribuée à des différences dans les constitutions morphologiques entre ces micro-organismes; les bactéries à Gram-négatif ayant une paroi phospholipidique externe portant les composants de lipopolysaccharide. Cela rend la paroi cellulaire imperméable à plusieurs substances chimiques antimicrobiennes. Les bactéries à Gram-positif sont plus sensibles, ces bactéries ont une couche externe de peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace, elle est perméable. Par contre, les paroi des bactéries à Gram-

négalif plus complexes que celle des bactéries à Gram-positif agissent comme une barrière diffusionnelle et rendent les cellules moins sensibles aux agents antimicrobiens (Nostro *et al.*, 2000 ; Hailu *et al.*, 2007). Cette différence de sensibilité peut-être due aussi à l'inhibition de la pompe à efflux des bactéries à Gram-positif (Hsieh *et al.*, 1998 ; Tegos *et al.*, 2002).

Plusieurs Recherche (1987-2004) ont suggéré que l'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être due à ces mécanismes suivant (Tim Cushnie et Lamb, 2011) :

- L'endommagement de la membrane cytoplasmique causée par la perforation et / ou une réduction de la fluidité membranaire,
- L'inhibition de la synthèse d'acide nucléique provoquée par l'inhibition de la topoisomérase,
- L'inhibition du métabolisme énergétique causée par l'inhibition de l'enzyme NADH-cytochrome c reductase.

Récemment (2005-2010), d'autres mécanismes ont été proposé. Plusieurs chercheurs qui travaillent sur les flavonols, flavane-3-ols et les classes flavolan suggèrent qu'ils endommagent la membrane cytoplasmique en générant le peroxyde d'hydrogène, ils ont montré que ces molécules inhibent le métabolisme de l'énergie (l'inhibition de l'ATP synthétase). Ils ont suggéré que les molécules flavane-3-ols et les isoflavones inhibent la topoisomérase et/ou dihydrofolate réductase responsable de la synthèse des acides nucléiques. Deux nouveaux mécanismes ont été également proposés: il s'agit de l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (provoquée par l'inhibition D-alanine-D-alanine ligase) et l'inhibition de la synthèse de la membrane cellulaire provoquée par l'inhibition de la FabG, FabI, FabZ, Rv0636 et KAS III (Tim Cushnie et Lamb, 2011).

4.2.2 L'activité antibactérienne synergique avec la Gentamicine

Dans la présente recherche, les effets antibactérien des combinaisons extraits et antibiotique sont présentés dans le tableau 8.

Tableau. 8 : Activité synergique des extraits d'*Anchusa azurea* (AA) et *Globularia alypum* (GA) exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

Souches	Zone d' inhibition (mm)								
	EBr- AA	ECh- AA	EAc- AA	EAq- AA	EBr- GA	ECh- GA	EAc- GA	EAq- GA	GEN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
ATCC 27853	29(P)	27.5(P)	29(A)	27.5(P)	27(A)	27.5(A)	26(A)	27.5(A)	25
<i>Escherichia coli</i>									
ATCC 25922	24.5(P)	23.5(P)	21.5(P)	21(A)	23.5(P)	25(P)	22.5(A)	22(P)	21
<i>Salmonella typhimurium</i>									
ATCC 13311	22(P)	21(P)	18(P)	19(P)	20.5(P)	20.5(P)	19(A)	18(Ad)	15
<i>Acinetobacter baumannii</i>									
ATCC 19606	12.5(P)	12(P)	13(A)	11(A)	13(A)	11.5(A)	10(A)	11(A)	11
<i>Citrobacter freundii</i>									
ATCC 8090	20.5(S)	18.5(P)	17(P)	17.5(P)	20(S)	16.5(P)	16.5(P)	16.5(P)	13
<i>Proteus mirabilis</i>									
ATCC 35659	28.5(P)	27.5(A)	29(Ad)	28.5(P)	26(A)	25(A)	26(A)	25.5(A)	24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>									
ATCC 700603	10(P)	9.5(A)	9(A)	9(Ad)	11(P)	8.5(Ad)	9(Ad)	8.5(A)	09
<i>Staphylococcus aureus</i>									
ATCC 25923	36(Ad)	36(Ad)	36.5(P)	35.5(P)	37.5(A)	36(A)	36.5(A)	35(A)	33
<i>Enterococcus faecalis</i>									
ATCC 49452	32(P)	33.5(P)	31(A)	30(Ad)	30(Ad)	31.5(A)	30(A)	30(Ad)	30
<i>Lysteria monocytogenes</i>									
ATCC 15313	11.5(A)	12.5(A)	16(P)	11.5(A)	13.5(P)	13.5(P)	12.5(A)	11.5(A)	11

GEN : Gentamicine. **(S):** synergique, **(Ad):** additive, **(P):** potentielle, **(A):** antagoniste.

Pour *Anchusa azurea*, presque 60% d'extraits ont un effet potentiel sur des souches à Gram-négatif et 41% sur des souches à Gram-positif. 21% des extraits sont antagonistes sur des souches à Gram-négatif et 33% sur des souches à Gram-positif. Cependant, seulement 15% des extraits ont présenté un effet additif sur l'ensemble des souches. L'effet le plus

remarquable est observé sur l'extrait EBr-AA qui a provoqué une combinaison synergique envers la souche *Citrobacter freundii* avec un diamètre de 20.5 mm.

Concernant *Globularia alypum*, presque 54% des extraits ont eu un effet antagoniste sur les souches à Gram-négatif et 16% sur les souches à Gram-positif. Seulement 32% d'extrait ont eu un effet potentiel sur les souches à Gram-négatif et 25% sur les souches à Gram-positif. 12.5% d'extraits ont un effet additif sur l'ensemble des souches. L'effet le plus remarquable est observé aussi par l'extrait EBr-GA qui a provoqué une combinaison synergique envers la souche *Citrobacter freundii* avec un diamètre de 21 mm. En effet, cet extrait a augmenté la zone d'inhibition de 7 mm. Il est à noter que les extraits du GA, ont induit des effets inhibiteurs importants envers la croissance de la souche *Staphylococcus aureus*. Ces extraits ont produit des zones d'inhibition dont le diamètre varie de 12 à 25 mm. Cependant, ces extraits en combinaison avec la Gentamicine sont moins efficace et sont devenus des antagonistes. De ce fait, il est fort probable que l'antibiotique a annulé l'effet de l'extrait ou le contraire.

L'exemple le plus connu d'une combinaison est l'association entre la pénicilline avec l'acide clavulanique, qui inhibe avec succès les pénicillinases résistantes. Le mécanisme exacte pour la réduction de la résistance aux antibiotiques par les antimicrobiens naturels n'est pas connu. il est probablement dû à quelques changements structurales au niveau des bactéries résistantes. En effet, les antimicrobiens naturels facilitent la pénétration de l'antibiotique à travers la paroi bactérienne, ils bloquent l'effet inhibiteurs des enzymes protectives ou interfèrent avec les cibles métaboliques uniques ou multiples de l'antibiotique, ils sont capables aussi de bloquer la pompe à efflux développée par les bactéries dans le but d'inhiber la pénétration des agent antimicrobiens (Hemaiswarya *et al.*, 2008 ; Palaniappan et Holley, 2010 ; Wagner, 2011). Plusieurs études ont rapporté l'interaction inhibitrice synergique de β -

lactamines avec des composés naturels contre des bactéries résistantes (Shiota *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2000 ; Shimizu *et al.*, 2001). En effet, le gallate d'épigallocatechine, un flavonoïde extrait à partir du thé, est un produit naturel adéquat pour le maintien de l'activité de la pénicilline contre *Staphylococcus aureus*. Des résultats similaires ont été rapportés par Hu et ses collaborateurs (2002), qui ont montré que ce flavonoïde renforce de manière synergique l'activité des carbapénèmes contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM). Shiota et ses collaborateurs (2000) ont rapporté que tellimagrandin extraite à partir de *Rosa canina* L. a fortement réduit la CMI d'une β -lactamine contre le SARM. De même, corilagine, un composé actif extrait de *Aretostaphylos Uvaursi* a réduit la CMI de deux β -lactamines (oxacilline et cefmétazone) contre le SARM (Shimizu *et al.*, 2001).

Suite à ces résultats obtenus, d'autres études s'avèrent nécessaires pour élucider le mécanisme d'action de l'association synergique rapportée. À cet égard, il faut tenir compte du fait que la combinaison entre les extraits et des antibiotiques peut affecter plusieurs cibles à la fois (Hemaiswarya *et al.*, 2008).

4.2.3 Le test d'inhibition enzymatique des β -lactamases

L'objectif de cette partie de notre travail est d'évaluer l'effet inhibiteur des polyphénols et flavonoïdes extraites à partir des plantes sur une β -lactamase de type pénicillinase de *Bacillus cereus*. L'activité enzymatique a été testée en présence de quatre concentrations croissantes de chaque extrait. Ces extraits avaient subi un traitement par l'albumine pour éliminer les tannins et donc éviter l'inhibition des β -lactamases par la précipitation. Cette enzyme a pour substrat spécifique la nitrocéfine dont l'interaction enzyme-substrat se traduit par la transformation de la couleur du milieu réactionnel de jaune en rose. L'acide clavulanique a été utilisé comme inhibiteurs spécifique de référence des β -lactamase.

La mesure de l'activité de la β -lactamase en présence de la nitrocéfine et de différentes concentrations (1.25, 2.5, 5 et 10 mg/ml) d'extraits de plante a montré que ces derniers inhibent l'activité enzymatique de manière dose-dépendante. Le pourcentage d'inhibition est déterminé pour chaque concentration. Dans l'intervalle de concentrations de 1.25 à 10 mg/ml, l'inhibition est passé de 8% jusqu'à 68% pour *Anchusa azurea* et de 19% jusqu'à 70% pour *Globularia alypum* (Tableau.9).

Tableau. 9 : Les pourcentages d'inhibition des β -lactamases par les extraits d'AA et GA.

Plantes	[C] mg/ml	EBr	ECh	EAc	EAq
% d'inhibition (<i>Anchusa azurea</i>)	1.25	22.65 \pm 3.46	8.470 \pm 1.69	26.22 \pm 3.00	50.37 \pm 12.93
	2.5	58.27 \pm 15.71	20.95 \pm 1.13	37.83 \pm 1.83	52.59 \pm 11.31
	5	59.78 \pm 14.86	24.55 \pm 0.84	46.36 \pm 6.61	62.44 \pm 3.64
	10	58.17 \pm 4.91	48.57 \pm 10.47	63.44 \pm 3.12	68.91 \pm 3.39
% d'inhibition (<i>Globularia alypum</i>)	1.25	38.64 \pm 6.75	19.40 \pm 2.41	22.01 \pm 4.25	38.66 \pm 6.7
	2.5	44.66 \pm 7.12	25.81 \pm 6.88	61.04 \pm 8.28	42.47 \pm 8.52
	5	nd	31.17 \pm 5.50	66.91 \pm 6.68	nd
	10	63.02 \pm 5.29	46.31 \pm 3.62	70.57 \pm 14.28	54.16 \pm 7.22

nd: n'est pas déterminé

Les extraits EBr-AA, EAc-AA et EAq-AA ont montré une très bonne activité inhibitrice, à une concentration de 10mg, le pourcentage d'inhibition est entre 58% et 68%. Les extraits EAc-GA et EBr-GA ont montré une bonne activité inhibitrice (Tableau.9) à une concentration de 10 mg/ml, les pourcentages d'inhibition sont respectivement de 63.02% et 70.57%. Quant à l'ECh, son activité inhibitrice est de 46.31%. 50% de l'activité inhibitrice est obtenue par 1.25 mg/ml de l'extrait EAq-AA. L'acide clavulanique a exhibé le même pourcentage d'activité inhibitrice à moindre dose (0,2 mg/ml seulement). De ce fait, les données indiquent que les extraits ne sont pas aussi puissants que les inhibiteurs spécifiques.

En effet, il existe une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'inhibition des β -lactamases (AA: $R^2 = 0.987$, GA: $R^2 = 0.839$). EAc-GA et EBr-GA sont les plus riches en polyphénols et flavonoïdes, ces extraits ont montré une très bonne activité inhibitrice. Bien que l'ECh-AA soit riche en flavonoïdes, il présente une activité inhibitrice très faible. De ce fait, l'inhibition des β -lactamases pourrait être liée non seulement de la concentration des polyphénols et flavonoïdes, mais aussi liée à la nature de ces composés. Certaines études ont également montré que les flavonoïdes peuvent être en relation avec l'activité inhibitrice des β -lactamases observée. En effet, il a été rapporté que le flavonoïde épigallocatechine gallate inhibe l'activité d'une pénicillinase, rétablissant ainsi l'activité antibactérienne de la pénicilline contre *S. aureus* (Zhao *et al.*, 2002). Une autre étude réalisée par Denny et ses collaborateurs (2002) sur des métallo- β -lactamases partiellement purifiée à partir de *Stenotrophomonas maltophilia*, a montré que les flavonoïdes étudiés ont une activité inhibitrice moyenne.

Les polyphénols et flavonoïdes ont montré une modeste activité sur les β -lactamases en les comparant aux inhibiteurs spécifiques. Des études antérieures ont montré des résultats semblables. Yang et ses collaborateurs (2010) ont testé l'effet inhibiteur de l'acide salicylique sur une β -lactamase extraite à partir d'une souche nosocomiale de *Pseudomonas aeruginosa* G19. Cette molécule a montré une IC_{50} de 71.77 mM. Il s'agit d'un inhibiteur légèrement puissant en le comparant aux inhibiteurs spécifiques des β -lactamases. Nous avons testé (Boussoulim *et al.*, 2011) l'effet inhibiteur de 17 flavonoïdes sur une β -lactamase type TRI; β -lactamase résistante à l'acide clavulanique isolé d'une souche clinique *E. coli*. Les résultats ont montré que le type l'inhibition des flavonoïdes est incompétitif et non compétitif. Les polyphénols ne présentent aucun effet inhibiteur. Les constantes d'inhibition (K_I) sont pour la plupart des molécules supérieures à 100 μ M, c'est-à-dire 200 fois moins efficaces que l'acide clavulanique ($K_I = 0.5 \mu$ M). Cependant, Gangoué-Piéboj et ses collaborateurs (2007) ont

étudié 16 plantes camerounaises et ont évalué leur activité anti- β -lactamase. L'enquête a montré qu'il y a quelques extraits qui présentent une activité inhibitrice importante sur TEM-1, OXA-10, IMP-1 et P99 avec des pourcentages d'inhibition de 90%.

Les informations phytochimiques sur les plantes testées sont limitées. Peu d'étude sur l'activité inhibitrice des β -lactamases par des composés issus des plantes ont été publiées. En conclusion, les molécules testées ont une activité inhibitrice relativement faible et la découverte d'une molécule candidate doit passer inévitablement par l'évaluation d'un grand nombre de produits purifiés. L'isolement et l'élucidation de la structure des constituants actifs de ces extraits peuvent fournir des pistes utiles pour le développement d'un nouvel inhibiteur de β -lactamase. La détermination des principes actifs de ces deux plantes serait un point de départ pour le développement des inhibiteurs ou inactivateurs des β -lactamases.

4.3 L'activité antioxydante *in vitro*

4.3.1 L'effet scavenger du radical DPPH

Le test de réduction du radical DPPH est largement utilisé pour l'évaluation des activités antioxydantes. Le DPPH est un radical libre qui accepte un électron ou un atome d'hydrogène pour devenir une molécule stable non radicalaire. La capacité de réduire ce radical est déterminée par la diminution de l'absorbance à 517 nm induite par la substance étudiée. Les profils d'activité antiradicalaire obtenus (Figure. 10) révèlent que les extraits d'*Anchusa azurea* et *Globularia alypum* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante. Les IC₅₀ de chacun des différents extraits ont été déterminées (Tableau.10).

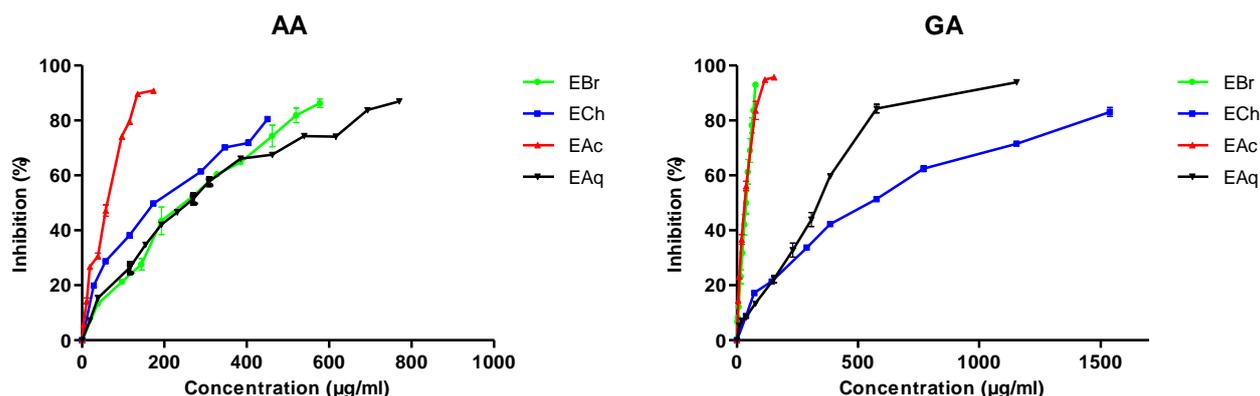


Figure. 10 : Activité antiradicalaire des extraits d’*Anchusa azurea* et *Globularia alypum* (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Tableau. 10 : Activité antiradicalaire des extraits d’*Anchusa azurea* et *Globularia alypum*.

Les extraits	IC_{50} ($\mu\text{g ml}$)	
	<i>Anchusa azurea</i>	<i>Globularia alypum</i>
EBr	$267.77 \pm 6.26^{***}$	$38.15 \pm 0.003^{***}$
ECh	$204.09 \pm 1.98^{***}$	$554.87 \pm 0.008^{***}$
EAc	$68.35 \pm 0.29^{***}$	$37.48 \pm 0.001^{***}$
EAq	$261.63 \pm 1.73^{***}$	$336.58 \pm 0.008^{***}$

La comparaison est réalisée contre le BHT, *** : $p \leq 0.001$, ** : $p \leq 0.01$.

À des fins comparatives, plusieurs antioxydants standards ont été utilisés : l’acide gallique, la quercétine, la rutine et le BHT. Ils ont montré une activité antiradicalaire très puissante avec des IC_{50} de 1.267 $\mu\text{g/ml}$, 2.565 $\mu\text{g/ml}$, 5.58 $\mu\text{g/ml}$ et 87 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Les extraits d’*Anchusa azurea* et *Globularia alypum* ont présenté une importante activité anti-radicalaire envers le DPPH. L’EAc-AA présente l’extract le plus actif avec une IC_{50} de l’ordre 68.35 $\mu\text{g/ml}$. Cet effet obtenu est bien meilleur que celui produit par le BHT. L’ECh-AA, l’EBr-AA et l’EAq-AA présentent une activité antiradicalaire plus au moins faible (IC_{50} de l’ordre de

200 µg/ml). Ils sont 3 à 4 fois moins actifs que l'EAc-AA. L'EBr-GA et EAc-GA présentent une importante activité anti-radicalaire en vers le DPPH (les valeurs de l'IC₅₀ est 38.15 et 37.48 µg/ml, respectivement). Ces derniers ont montré en effet, une grande activité inhibitrice, qui est supérieure même à celle obtenue par l'antioxydant de référence BHT (IC₅₀ = 87 µg/ml). L'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'ECh-GA avec une IC₅₀ = 554.87 µg/ml. Dans notre recherche, l'ordre croissant d'activité antiradicalaire d'*Anchusa azurea* est de EAc > ECh > EAq > EBr et pour les extraits de *Globularia alypum* est de EAc > EBr > EAq > ECh.

Les résultats obtenus dans le présent travail indiquent qu'il existe une relation linéaire entre le pouvoir antiradicalaire et la teneur en polyphénol (AA: R² = 0.914, GA: R² = 0.9445). Des études antérieures ont montré des résultats semblables pour les extraits du *Globularia alypum*. Il a été montré qu'il existe une grande corrélation entre la concentration en polyphénols et l'activité antioxydante du GA mesuré le radical DPPH et ABTS (Khlifi *et al.*, 2011).

Du fait que l'EBr-GA, l'EAc-GA et l'EAc-AA sont très riche en composés phénoliques et que ces derniers sont dotés d'une grande activité antioxydante, l'effet des extraits obtenus avec ce test serait probablement dû à ces molécules. Il est par ailleurs connu que les polyphénols auraient des propriétés scavenger envers différents types de radicaux, ce qui leur confère une grande capacité antioxydante. Plusieurs études ont rapporté que l'activité antiradicalaire des extraits des plantes dépend de la quantité de composés polyphénoliques dans ces derniers (Surveswaran *et al.*, 2007). Il a été rapporté que les composés phénoliques extraits à partir du *Globularia alypum* ont, pour la plupart produit une activité inhibitrice très puissante supérieure même à celle du BHT. L'étude de la relation structure/activité a montré aussi que l'action antioxydante augmente avec la présence des groupement 6-hydroxyl et caffeyl (Es-Safi *et al.*, 2006).

4.3.2 Le test de blanchissement de la β -carotène

La capacité antioxydante des extraits étudiés a été également évaluée par le système β -carotène/acide linoléique. Les radicaux libres provenant de l'oxydation de l'acide linoléique attaquent la β -carotène et induisent sa décoloration. La présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de la β -carotène (Naidu *et al.*, 2011). Les cinétiques de blanchissement du β -carotène en absence et en présence de 2 mg/ml d'extraits et du BHT (antioxydant standard) sont représentées dans l'annexe 1.

D'après ces résultats, tous les standards et les extraits testés inhibent d'une manière efficace et significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation (Figure. 11).

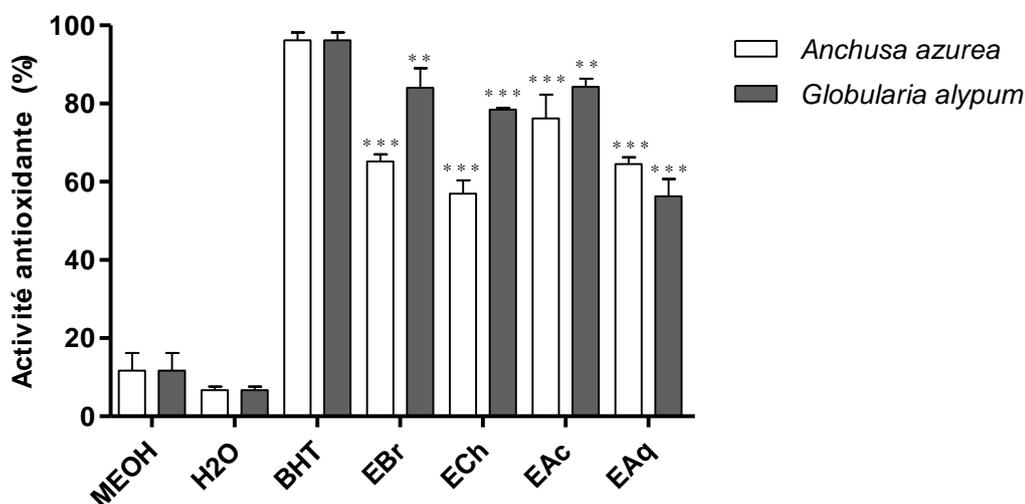


Figure. 11 : Activité antioxydante en présence et en absence des extraits et du BHT à 24 h par le test de β -carotène / acide linoléique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n= 3). ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, comparant avec le contrôle positif BHT.

D'après ces résultats, les extraits d'*Anchusa azurea* ont inhibé l'oxydation du système β -carotène/acide linoléique (entre 57% et 76%). L'ECh représente l'extrait le moins actif avec

une activité antioxydante égale à 57 %, Les deux autres extraits EBr et EAq ont également engendré des inhibitions semblables ($\approx 65\%$). L'EAc présente la plus grande activité dans le test de blanchissement du β -carotène (76.21%). On peut donc résumer l'ordre décroissant des extraits testés en terme d'activité antioxydante comme suit : $EAc > EBr = EAq > ECh$, on constate d'une part que l'extrait apolaire ou moyennement apolaire (EAc) est plus actif que l'extrait polaire (EBr, EAq). D'autre part, l'extrait le plus riche en composés phénoliques est l'extrait le plus actif (EAc).

L'EBr-GA et l'EAc-GA ont produit un effet important (84.05% et 84.33%, respectivement) en comparant à celui du BHT qui a donné une inhibition égale à 96%. Par contre, l'ECh est moins efficace et l'inhibition induite n'était que de 78%. On constate que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs (EBr et EAc). En comparant avec les antioxydants de référence, l'EBr-GA et l'EAc-GA sont 1.1 fois moins actifs que le BHT 1.4 suivis par l'ECh-GA qui est 1.2 fois moins actifs que le BHT, L'EAq-GA est 1.7 fois moins actif. L'EAc-AA est 1.2 moins actif que le BHT, l'EBr-AA et l'EAq-AA sont 1.5 moins actifs. Cependant, l'ECh-AA est 1.7 fois moins actif.

Le test de blanchissement du β -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau. Les antioxydants apolaires se concentrent à l'interface lipide-eau ce qui prévient la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène, donc ils exposent des propriétés antioxydantes importantes, alors que les antioxydants polaires sont moins efficaces dans la protection des lipides car ils restent dans la phase aqueuse (Frankel et Meyer, 2000). D'autres chercheurs ont montré aussi que les différences de solubilité des flavonoïdes et la répartition des composés entre les deux phases dans un système eau-lipidique influencent la protection des lipides (Burda et Oleszek, 2001).

4.4 L'activité anti-hémolytique

L'activité antihémolytique des extraits est mesurée selon le protocole décrit par Takebayashi et ses collaborateurs (2010). Il s'agit de soumettre des hématies à une agression de type oxydatif dans des conditions strictement contrôlées et standardisées. Dans ces conditions, les hématies mettent en jeu tout leur équipement enzymatique et moléculaire pour résister à cette agression jusqu'à ce que la membrane cellulaire soit modifiée au point de laisser échapper le contenu cellulaire. L'analyse réalisée dans des microplaques de 96 puits permet le traitement d'un nombre important d'échantillons. La mesure de la diminution de l'absorbance à 620 nm permet de suivre la disparition progressive des cellules. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (HT_{50}). Ce test permet le suivi du pouvoir anti-radicalaire de molécules naturelles à usage pharmaceutique *in vitro* et *in vivo*. Il permet par exemple de connaître l'effet positif ou négatif des substances naturelles extraites à partir des plantes sur le système antiradicalaire des hématies. Théoriquement, la résistance antiradicalaire érythrocytaire doit conduire à une courbe avec un temps de demi-lyse plus élevé chez les supplémentés comparativement à des témoins. Une valeur d' HT_{50} élevée veut donc dire que l'extrait a efficacement renforcé le système anti-radicalaire érythrocytaire.

Dans notre recherche, nous avons essayé d'évaluer l'effet des extraits de deux plantes sur les érythrocytes ainsi que mettre en évidence l'effet de la concentration d'extrait sur la résistance anti radicalaire. À partir des cinétiques d'hémolyses obtenues (Figure. 12, Figure. 13 et Figure. 14), il ressort que le traitement par tous les extraits a augmenté les valeurs d' HT_{50} par rapport au témoin ($HT_{50} = 56.01 \pm 5.93$). Un effet dose dépendant de l'extrait sur l'accroissement des défenses antioxydants globales a été remarqué à l'exception de l'EAq-GA, qui a donné une valeur d' HT_{50} presque stable (≈ 69 min) même en augmentant la concentration de cet extrait (Figure. 14 et Tableau. 12).

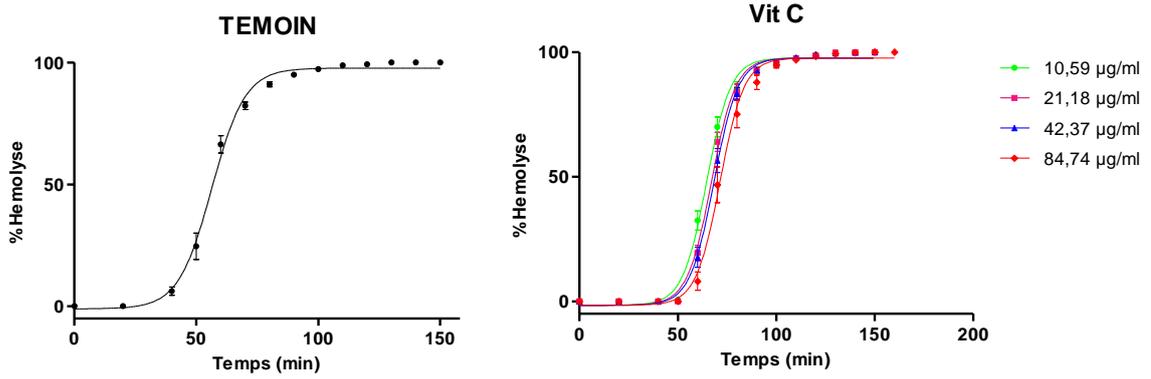


Figure. 12 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) pour le témoin et le standard la Vitamine C. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n= 5).

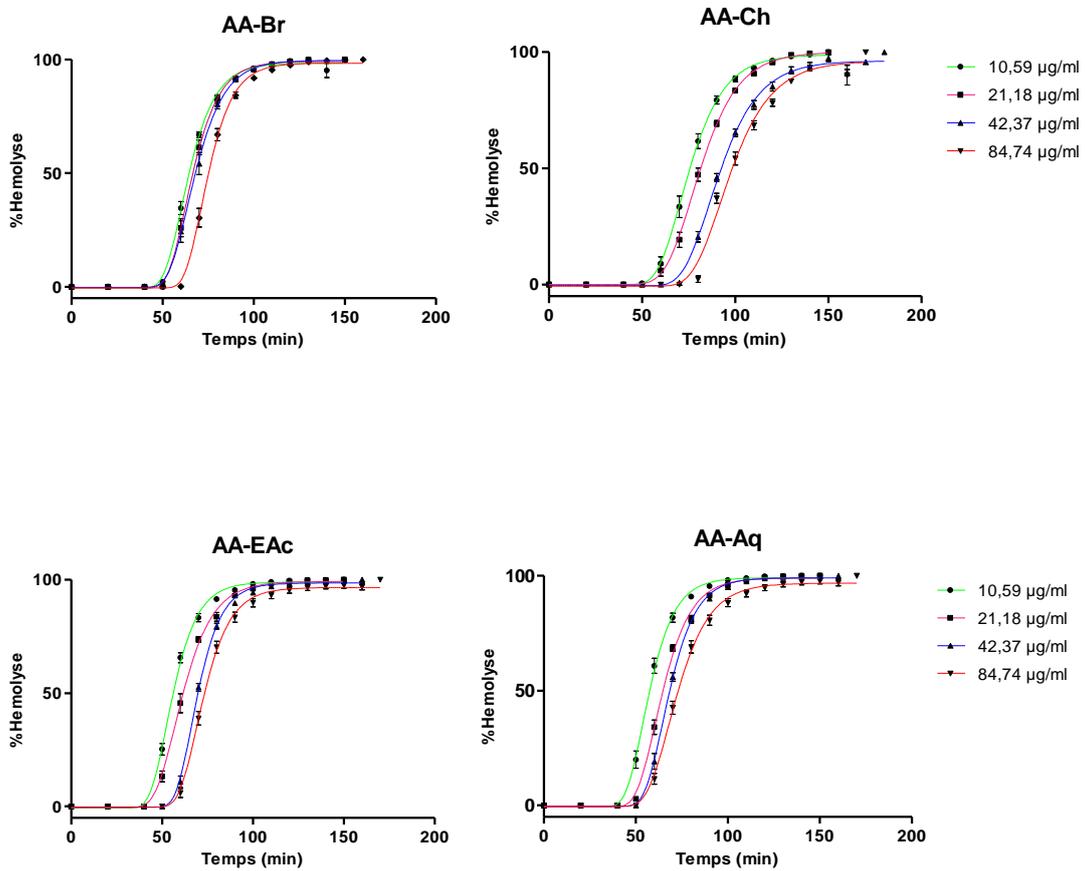


Figure. 13 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) obtenues après traitement avec les extraits d' *Anchusa azurea*. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n= 5).

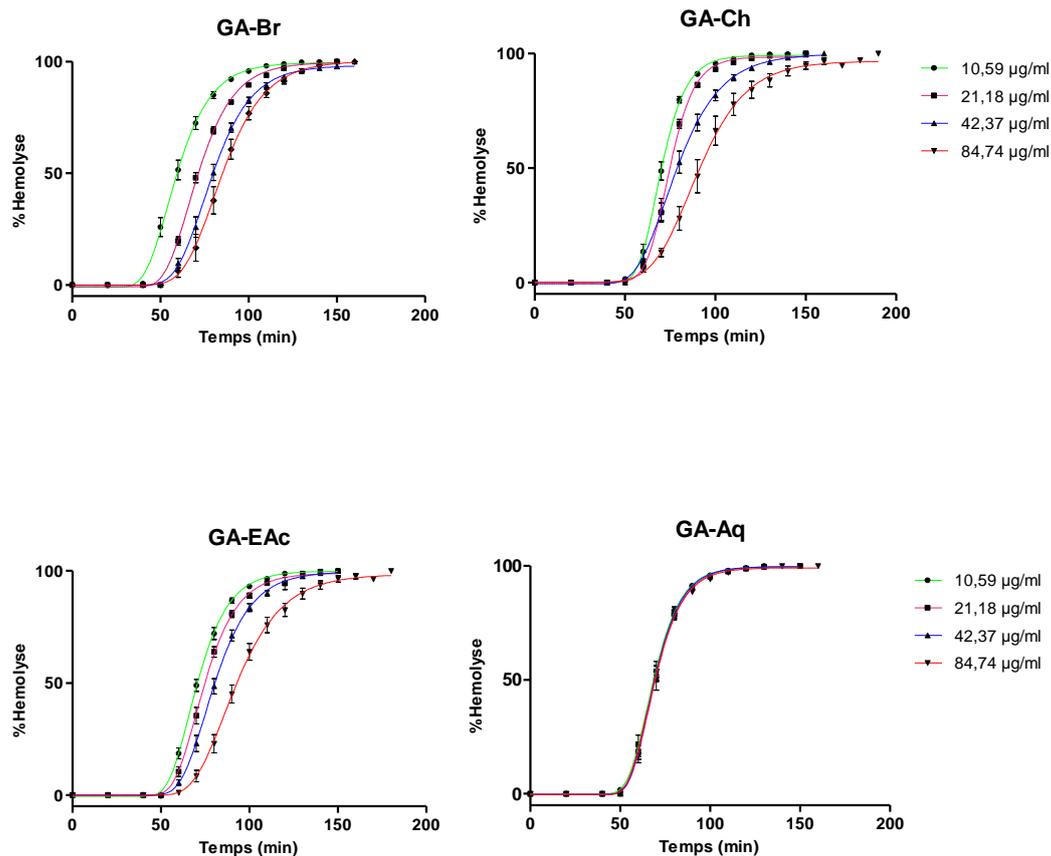


Figure. 14 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) obtenues après traitement avec les extraits du *Globularia alypum*. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n= 5).

Tableau. 11 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) obtenues après traitement avec les extraits du AA. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n= 5). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle positif « VIT C ». *: $p \leq 0.05$, ***: $p \leq 0.001$, ns: non significatif.

[C] µg/ml	EBr-AA	ECh-AA	EAc-AA	EAq-AA	Vit C
10.59 µg/ml	64.64 \pm 2.25 ^{ns}	74.99 \pm 6.77 ^{ns}	57.91 \pm 4.58 ^{ns}	58.00 \pm 4.90 ^{ns}	64.99 \pm 4.46
21.18 µg/ml	66.73 \pm 4.89 ^{ns}	80.59 \pm 5.03 [*]	63.36 \pm 3.90 ^{ns}	64.80 \pm 3.00 ^{ns}	67.50 \pm 3.91
42.37 µg/ml	68.01 \pm 6.44 ^{ns}	92.52 \pm 0.64 ^{***}	69.81 \pm 1.33 ^{ns}	68.24 \pm 1.71 ^{ns}	68.57 \pm 4.43
84.74 µg/ml	75.09 \pm 3.50 ^{ns}	97.70 \pm 1.80 ^{***}	73.56 \pm 3.25 ^{ns}	72.83 \pm 3.29 ^{ns}	71.99 \pm 7.79

Tableau. 12 : Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) obtenues après traitement avec les extraits du GA. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n= 5). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle positif « VIT C ». *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ns: non significatif.

[C] $\mu\text{g/ml}$	EBr-GA	ECh-GA	EAc-GA	EAq-GA	Vit C
10.59 $\mu\text{g/ml}$	59.44 \pm 6.61 ^{ns}	70.09 \pm 3.60 ^{ns}	70.97 \pm 3.56 ^{ns}	68.36 \pm 4.90 ^{ns}	64.99 \pm 4.46
21.18 $\mu\text{g/ml}$	71.32 \pm 2.55 ^{ns}	74.51 \pm 2.16 ^{ns}	74.64 \pm 4.62 ^{ns}	69.48 \pm 4.51 ^{ns}	67.50 \pm 3.91
42.37 $\mu\text{g/ml}$	78.90 \pm 6.99 ^{ns}	78.77 \pm 9.25 ^{ns}	80.3 \pm 5.93 ^{ns}	69.04 \pm 3.51 ^{ns}	68.57 \pm 4.43
84.74 $\mu\text{g/ml}$	84.55 \pm 9.66 ^{ns}	94.37 \pm 13.75 [*]	95.37 \pm 12.60 ^{**}	69.23 \pm 2.49 ^{ns}	71.99 \pm 7.79

Les concentrations de 10.59 $\mu\text{g/ml}$ de l'EBr-AA, EAc-AA, EAq-AA ont provoqué un retardement d'hémolyse par rapport au témoin, cependant cette augmentation reste statistiquement non significative. Les autres concentrations (21.18, 42.37 et 84.74 $\mu\text{g/ml}$) ont décalé d'une manière très considérable les sigmoïdes d'hémolyse vers la droite et donc l'augmentation de l' HT_{50} est statistiquement significative par rapport au témoin. Les trois concentrations les plus élevées du l'ECh ont entraîné un retardement très significatif ($p \leq 0.001$) de l'hémolyse en les comparant au contrôle négatif « témoin » et au contrôle positif « VIT C » (Tableau.11).

Le traitement avec la concentration 10.59 $\mu\text{g/ml}$ de l'EBr-GA, ECh-GA a exhibé un retardement statistiquement non significatif d'hémolyse si on le compare avec le témoin. Cependant, toutes les concentrations des extraits EBr, ECh, EAc et EAq ont également entraîné un retardement significatif de l'hémolyse comparant au témoin (Tableau.12). Confronté au contrôle positif « VIT C », seule la concentration 84.74 $\mu\text{g/ml}$ du ECh-GA et EAc-GA a renforcé d'une manière significative le système anti radicalaire érythrocytaire ($HT_{50} = 94.37 \pm 13.75$ ($p \leq 0.05$), $HT_{50} = 95.37 \pm 12.60$ ($p \leq 0.01$), respectivement) (Tableau.12).

Pour voir s'il existe une corrélation linéaire entre la concentration de l'extrait et le temps de demi-hémolyse (HT_{50}), les valeurs de Δt sont été relevées; $\Delta t = HT_{50}$ (extrait) - HT_{50} (témoin),

la relation entre Δt et les concentrations d'extraits est montrées dans l'annexe 2. Une bonne linéarité est observé pour l'extrait ECh-GA, EAc-GA et EBr-AA ($R^2 = 0.989$, $R^2 = 0.996$, $R^2 = 0.976$, respectivement). Pour l'extrait EAc-GA, la durée d'inhibition supplémentaire produite par cet extrait est: 14.96, 18.63, 24.29 et 39.36 min. La même constatation est enregistrée avec l'extrait ECh-GA (14.08 jusqu'au 38.36). les extraits EAc-GA et ECh-GA à une concentration de 84.74 $\mu\text{g/ml}$ ont retardé l'hémolyse presque 40 min. Ces extraits ont augmenté la durée d'inhibition supplémentaire significativement en comparant à l'antioxydant standard, la vitamine C dont le pouvoir d'inhibition de l'hémolyse varie entre 8.98 et 15.98 min. On peut classer l'efficacité anti-hémolytique avec GA comme suit : EAc > ECh > EBr > EAq < VIT C. La durée d'inhibition supplémentaire produite par l'extrait ECh-AA est 18.98, 24.58, 36.51 et 41.69 min, respectivement pour les quatre concentrations testées. Le classement de l'efficacité anti-hémolytique est: ECh > EBr > EAc = EAq > VIT C.

En effet, les extraits ECh et EAc sont des fractions assez complexes dans leur composition et peuvent contenir différents composés agissant indépendamment ou en synergie. Ces deux extraits constituent une bonne source d'antioxydants du fait que leur activité antiradicalaire est meilleure que celle de l'acide ascorbique, l'antioxydant de référence. Il est connu que les polyphénols ont des propriétés anti-hémolytique (Blasa *et al.*, 2007 ; Tabart *et al.*, 2009), Dai et ses collaborateurs (2006) ont testé l'activité de plusieurs flavonols et leurs flavonols glycosylés. Ils ont montré que ces flavonols arrêtent d'une manière très significative l'hémolyse et que les flavonols qui ont une fonction ortho-dihydroxyl sont plus efficaces.

La décomposition thermique du T-BHP dans une suspension érythrocytaire produit un radical libre qui attaque les lipides polyinsaturés dans la membrane ce qui provoque la peroxydation lipidique (Dwight et Hendry, 1995). De ce fait, si les antioxydants, tels que la vitamine E, la vitamine C et les flavonoïdes, sont ajoutées à une suspension érythrocytaire, ils réagissent

avec les lipides membranaires pour mettre fin à la peroxydation, par conséquent l'inhibition de l'hémolyse (Tabart *et al.*, 2009). Takebayashi ses collaborateurs (2010) ont comparé les résultats d'hémolyse avec les résultats du DPPH. Ils ont montré que les antioxydants qui ne scavengent pas rapidement le radical DPPH ou ABTS ^{•+} ne sont pas toujours des faibles antiradicalaires érythrocytaires. Ces résultats sont en accord avec les résultats que nous avons obtenues. L'extrait ECh-GA présente une activité antiradicalaire très faible vis-à-vis du radical DPPH ($IC_{50} \approx 0.5$ mg/ml). Ce même extrait est considéré comme un puissant anti radicalaire érythrocytaire. Néanmoins, l'extrait EAc-GA a présenté une bonne activité antiradicalaire contre le radical DPPH et également une bonne activité anti radicalaire érythrocytaire. Takebayashi et ses collaborateurs (2010) ont montré aussi que les extraits lipophiles sont les meilleurs protecteurs contre les dommages de la membrane cellulaire induite par les radicaux libres ce qui renforce les résultats obtenus dans notre recherche. Les ECh et EAc selon Andersen et Markham (2006) contiennent les flavonoïdes les moins polaires comme : les isoflavones, les flavanones, les flavones méthylés, et les flavonols.

Le test de l'inhibition de l'hémolyse provoqué par un oxydant est considéré comme un bon test pour estimer l'activité antioxydante des systèmes biologiques. Cependant ce test reste insuffisant car il existe plusieurs types de dommages oxydatifs *in vivo*, pour cela les chercheurs ont toujours conseillé d'utiliser plusieurs combinaison de différentes méthodes pour l'évaluation de l'activité antioxydante. En plus, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) d'antioxydants affectent considérablement l'activité antioxydante *in vivo*. Par conséquent, l'efficacité antioxydante doit d'être évaluée par des tests *in vivo* (Takebayashi *et al.*, 2010).

4.5 L'activité antioxydante *in vivo*

4.5.1 La toxicité aiguë « détermination de la DL_{50} »

Les résultats de la DL_{50} chez les souris traitées par voie intrapéritonéale d'EBr-AA sont présentés dans le tableau 13. La DL_{50} est estimée de 563.58 ± 52.85 mg/kg comme le montre le tableau 14 et la courbe dose/réponse (Figure. 15). Cependant, jusqu'à la dose 400 mg/kg de traitement aigu à base d'extrait EBr-GA de *Globularia alypum*, nous n'avons pas observé de mortalité importante, la DL_{50} est supérieure à 400 mg/kg de poids corporel des souris traitées.

Tableau. 13 : Détermination de la DL_{50} de l'extrait brut méthanolique d'*Anchusa azurea* et de *Globularia alypum* par l'Analyse par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés (Distribution Normale).

Dose (mg/kg)	Nombre de souris (n)	(%) de morts par <i>Anchusa azurea</i>	(%) de morts par <i>Globularia alypum</i>
0 (NaCl 9‰)	10	0	0
250	10	0	0
300	10	0	0
350	10	0	0
400	10	20	0

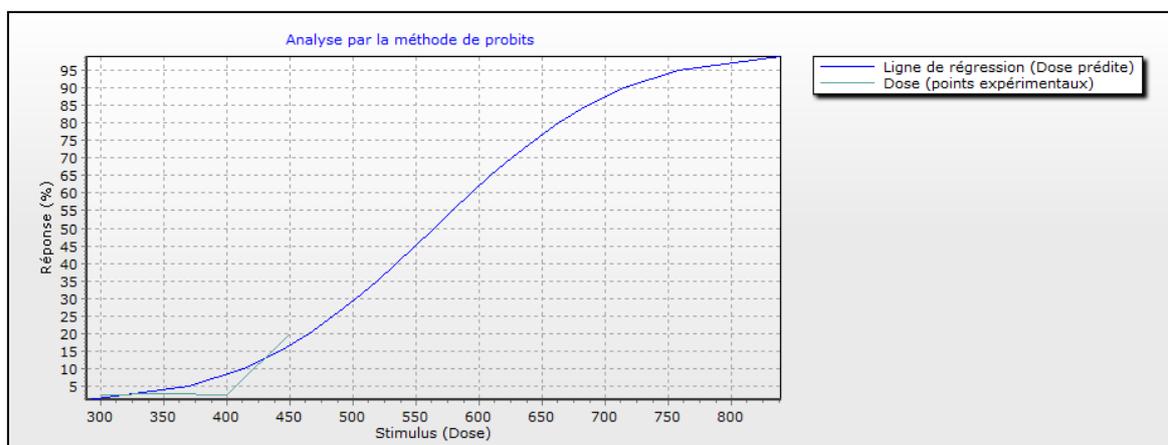


Figure. 15 : Estimation de la DL_{50} chez les souris males traitées par voie intra péritonéale par l'extrait brut méthanolique d'*Anchusa azurea*.

Tableau. 14 : Détermination des différentes doses létales (DL) de l'extrait brut méthanolique d'*Anchusa azurea* par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés (Distribution Normale).

DL ₁₀	412.10
DL ₈₄	681.76
DL ₁₀₀	740.85
DL ₁₆	445.39
DL ₉₀	715.05
DL ₅₀	563.58

Dans le présent travail, les souris traitées par l'extrait EBr-GA de différentes doses pour déterminer la DL₅₀ ne présentent aucune létalité jusqu'à la dose 400 mg/kg. D'autres travaux réalisés par Fehri et ses collaborateurs (2012) ont estimé une DL₅₀ de 2550 mg/kg par l'administration de l'extrait du GA par voie intrapéritonéale. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par El Amri et ses collaborateurs (1998) qui ont montré que la DL₅₀ de l'extrait aqueux est plus de 1000 mg/kg. Ces résultats sont en concordance avec ceux d'Eddouke et ses collaborateurs (2002) qui ont estimé une DL₅₀ dans les environs de 14.5 g/kg après administration orale de l'extrait aqueux de GA. Dans ce cas, l'extrait aqueux de GA semble d'avoir un effet minimum concernant la DL₅₀ puisque il n'y a pas de mortalité ou morbidité dans les comportements. Toutefois, vu l'échelle de classification de toxicité selon Hodge et Stener (Frank, 1992), la plante est modérément toxique.

4.5.2 L'effet sur la capacité antioxydante totale du sang

À partir des cinétiques d'hémolyses obtenues (Annexe 3), il paraît que le traitement par l'EBr-AA et EBr-GA entraîne un décalage des sigmoïdes d'hémolyse vers la droite et donc un retardement de l'hémolyse. Les valeurs d'HT₅₀ calculées révèlent un prolongement du temps de demi hémolyse chez tous les groupes traités par rapport au groupe contrôle (CNTL) (Figure. 16). Pour les souris du groupe D1 (traités par 100 mg/kg d'EBr-AA), l'augmentation

de l'HT₅₀ (HT₅₀= 62.26 ± 3.58 min) reste statistiquement non significative, le traitement avec une dose plus élevée D2 (200 mg/kg) provoque un retardement significatif ($p \leq 0.01$) de l'hémolyse (HT₅₀= 76.17 ± 1.85 min) en comparant au groupe contrôle (HT₅₀= 61.7 ± 1.79 min). Cela peut mettre en évidence un effet dose dépendant de l'extrait sur l'accroissement des défenses antioxydantes globales. Parallèlement, le traitement des souris avec une dose de l'EBr-GA (100 mg/kg) a provoqué un retardement très significatif ($p \leq 0.001$) de l'hémolyse où l'HT₅₀= 112.8 ± 2.42 min. L'EAc-GA et EAq-GA (100 mg/ml) provoquent un retardement non significatif avec des HT₅₀ (69.16 ± 8.82 min et 72.35 ± 2.49 min, respectivement).

L'EBr-GA présente une activité moyenne *in vitro*. cependant, c'est le meilleur antiradicalaire érythrocytaire *in vivo* avec une HT₅₀= 112.8 min. *In vitro*, l'EAc-GA est un bon antiradicalaire érythrocytaire mais *in vivo* il est considéré comme un faible antiradicalaire. Deux explications à ces résultats peuvent être citées: la structure des biomolécules a changé pendant les étapes d'absorption, la distribution et le métabolisme et est devenu plus active et plus lipophile ce qui renforce la membrane des érythrocytes. L'administration d'une forte dose d'extrait durant trois semaines entraîne une amélioration très significative du statut antioxydant total plasmatique ou cytoplasmique.

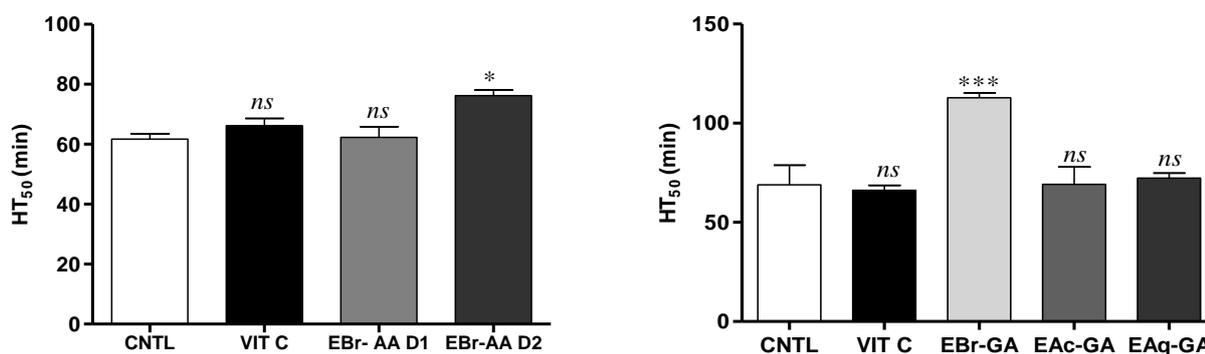


Figure. 16 : Temps de demi-hémolyse (HT₅₀) pour les différents groupes traités par les extraits d'AA et GA. Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n= 9-10). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe CNTL. * : $p \leq 0.05$, *** : $p \leq 0.001$, ns: non significatif.

Il semble que l'augmentation de la capacité antioxydante plasmatique est probablement attribuée à un taux élevés d'antioxydants exogènes: les composés phénoliques et les flavonoïdes, acquis après le traitement avec les extraits d'*Anchusa azurea* et *Globularia alypum*, dont les propriétés antioxydantes sont déjà démontré dans notre étude *in vitro*. En effet, plusieurs chercheurs ont signalé que les flavonoïdes sont des antioxydants très puissants qui peuvent protéger les cellules des globules rouges et inhibent très efficacement l'hémolyse oxydative induite par les radicaux libres. Il a également été montré aussi que l'effet protecteur des flavonoïdes peut être lié à leur fixation à la membrane plasmique et leur capacité de pénétrer dans la bicouche lipidiques. Ils inhibent donc de manière significative la peroxydation des lipides et favorisent leur intégrité contre la lyse (Kitagawa *et al.*, 2004 ; Dai *et al.*, 2006 ; Blasa, 2007).

La synthèse des résultats obtenus dans la présente étude montre que le traitement par ces extraits améliore significativement la capacité antioxydante totale chez les souris. Cependant, le comportement de ces extraits contre l'attaque radicalaire est toujours difficile à expliquer car le sang est une matrice complexe dans laquelle les substances pharmacologiques évaluées pourraient être impliquées dans de nombreuses réactions dans le cytoplasme cellulaire, la membrane cellulaire et/ou au niveau extracellulaire (plasma) (Stocker *et al.*, 2003 ; Djeridane *et al.*, 2007).

4.5.3 L'effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH

La capacité antioxydante plasmatique (CAP) est l'un des biomarqueurs les plus utilisés. En raison du grand nombre d'antioxydants présents dans le plasma, plusieurs méthodes ont été développées ; (i) le pouvoir antioxydant de réduction ferrique (FRAP), (ii) la capacité

antioxydante équivalente de Trolox (TEAC), (iii) méthode des potentiels d'absorption totale du radical (TRAP).

Pour évaluer l'efficacité d'un traitement antioxydant, l'effet scavenger du radical DPPH est mesuré, cette dernière méthode est largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes et des aliments. Elle est également utilisée pour évaluer la capacité antioxydante plasmatique exprimée en pourcentage d'inhibition de décoloration du mélange réactionnel en présence du plasma par rapport à la solution méthanolique contenant uniquement le DPPH.

L'administration de D1 et D2 de l'EBr-AA entraîne une augmentation de la capacité antioxydante plasmatique ($19.1 \pm 1.31\%$, $22.54 \pm 0.60\%$), cependant cette augmentation est statistiquement non significative par rapport au groupe contrôle ($18.59 \pm 1.76\%$) (Figure. 17). Par contre, le groupe EBr-GA entraîne une augmentation très significative ($p \leq 0.001$) du pouvoir scavenger plasmatique ($38.41 \pm 2.76\%$) en comparant au groupe CNTL ($18.74 \pm 1.73\%$), suivis par le groupe EAq-GA et EAc-GA avec capacité antioxydante plasmatique ($30.54 \pm 4.33\%$ et $31.79 \pm 1.65\%$, respectivement) (Figure. 17).

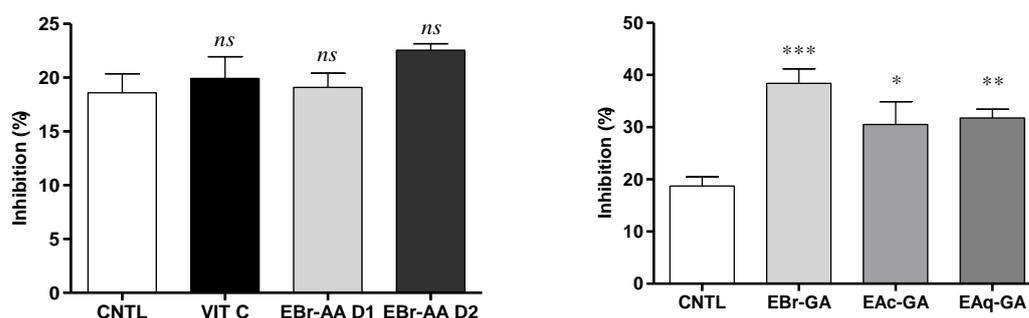


Figure. 17 : L'activité antiradicalaire des extraits d'AA et GA. La comparaison contre le groupe CNTL. *: $p \leq 0.05$, *** : $p \leq 0.001$; ns: n'est pas significatif.

La comparaison de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* des extraits a indiqué que l'EBr-GA a gardé les mêmes propriétés *in vitro* et *in vivo*, l'EAc-GA a présenté une bonne activité radicalaire *in vitro* vis-à-vis le radical DPPH, cet extrait a présenté une activité moyenne *in vivo*. Pour l'EAq, il a montré une faible activité scavenger *in vitro* mais *in vivo* il présente une activité similaire à l'EAc. L'EBr-AA a présenté une activité scavenger moyenne *in vitro* et *in vivo* même en augmentant la concentration de 100 mg/kg vers 200 mg/kg *in vivo*.

En comparant la capacité anti-oxydante plasmatique en utilisant le radical DPPH avec le test de la capacité antioxydante totale du sang, on constate que la dose de 100 mg/kg de l'extrait EBr-GA a un effet significatif sur l'augmentation de la capacité antioxydante plasmatique (≈ 113 min) et la capacité antioxydante totale du sang ($\approx 48\%$) suivis par les autres extraits EAc et EAq avec des activités presque similaires. Cependant, pour l'extrait EBr-AA, on remarque une augmentation significative de la capacité antioxydant totale du sang sans changer la capacité anti-oxydante plasmatique pour la dose 200 mg/ml.

4.5.4 Le pouvoir réducteur plasmatique évalué par la technique de FRAP

Un autre aspect a été visé pour mieux évaluer l'effet antioxydant *in vivo* des extraits: la technique FRAP décrite initialement par Benzie et Strain (1996). L'absorbance ne se stabilise pas après 4 min, donc les mesures sont poursuivies pendant 30 min, en accord avec Pulido (2000). La technique FRAP permet de mesurer la réduction du Fe^{3+} (fer ferrique) en Fe^{2+} (fer ferreux) en présence d'antioxydants. Cette réduction est rapide avec tous les réducteurs ayant des potentiels de la demi réaction de réduction supérieur à celui du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$.

Comme on peut l'observer (Tableau.15), le pouvoir réducteur (PR) continue à augmenter après 4 minutes de réaction et double même à 30 minutes pour tous les extraits. Par contre, la réaction de l'acide ascorbique (VIT C) n'a pas subi un changement apparent après les premières quatre minutes ($\text{PR}_{4\text{min}} = 0.42 \pm 0.023$; $\text{PR}_{30\text{min}} = 0.55 \pm 0.0174$).

Tableau. 15 : Pouvoir réducteur (PR) des extraits d'AA et GA et un antioxydant standard « VIT C ». Les comparaisons effectuées contre le groupe CNTL. * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, ns : non significatif. (n= 8-10).

	FRAP mmol/10 μ l (4min)	FRAP mmol/10 μ l (30min)
<i>Anchusa azurea</i>		
CNTL	0.21 \pm 0.04	0.39 \pm 0.029
EBr D1	0.38 \pm 0.049 ^{ns}	0.59 \pm 0.076 ^{ns}
EBr D2	0.56 \pm 0.081 ^{***}	0.88 \pm 0.12 ^{***}
<i>Globularia alypum</i>		
CNTL	0.20 \pm 0.011	0.40 \pm 0.029
EBr	0.30 \pm 0.028 ^{ns}	0.57 \pm 0.053 ^{ns}
EAc	0.32 \pm 0.064 ^{ns}	0.56 \pm 0.14 ^{ns}
EAq	0.32 \pm 0.023 ^{ns}	0.63 \pm 0.14 ^{ns}

Tous les extraits du *Globularia alypum*, ont presque le même pouvoir réducteur avec des PR à 4 minutes très proches même à la fin de la réaction (30 minutes) (Tableau.15). La comparaison des pouvoirs réducteurs de ces extraits avec ceux du groupe VIT C montre qu'il n'y a pas une différence significative. Les doses testées d'*Anchusa azurea* ont augmenté la valeur du FRAP (mmol/10 μ l) en comparant au groupe CNTL (0.21 \pm 0.04). L'EBr-D2 a augmenté le pouvoir réducteur (0.56 \pm 0.08) d'une manière très significative ($p \leq 0.001$). Ces résultats suggèrent que le système de défense antioxydant est renforcé dans le plasma, par l'augmentation du pouvoir réducteur, probablement due à la concentration élevée des polyphénols et flavonoïdes dans les extraits. Ces données sont confirmées par les résultats obtenues par Ansari et son équipe de recherche (2004) qui ont montré que l'effet de la vitamine K1 sur le PR est dose-dépendant. Wong et ses collaborateurs (2006) ont montré eux aussi qu'il existe une relation linéaire entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante totale en utilisant la technique du FRAP.

4.6 L'activité anti-inflammatoire utilisant PMA

L'effet anti-œdémateux du traitement par l'extrait méthanolique des deux plantes a été évalué en utilisant le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le PMA chez les souris qui sont un modèle d'inflammation aiguë.

L'application locale de phorbol myristate acétate (PMA) induit une réponse inflammatoire de longue durée, résultant de l'activation de protéine kinase C (PKC) (Kang *et al.*, 2008). Cette réponse atteint un maximum en 6 heures et disparaît en 24 heures (Malaviya *et al.*, 2006).

Les souris du groupe témoin ayant reçu uniquement la solution de DMSO contenant le PMA ont développé au bout de six heures un œdème au niveau de l'oreille gauche caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de 0.304 ± 0.051 mm. Chez les souris du groupe injecté par le Diclofénac, on a constaté une réduction significative de l'inflammation comparée à celle développée par les souris du groupe témoin. L'augmentation de l'épaisseur six heures après l'induction de l'inflammation est de 0.128 ± 0.033 mm. L'injection de l'extrait brute de *Globularia alypum* et *Anchusa azurea* a induit une atténuation significative de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin et l'augmentation de l'épaisseur est de 0.263 ± 0.013 mm et 0.206 ± 0.008 mm, respectivement (Figure. 18).

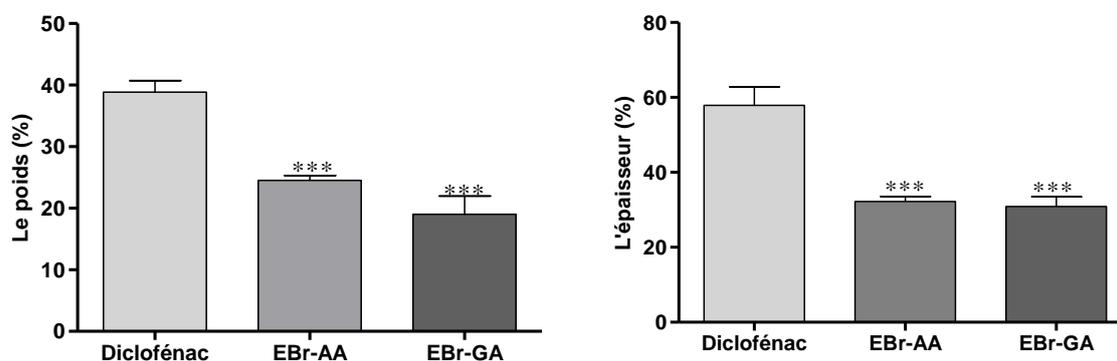


Figure. 18 : L'activité anti-inflammatoire d'*Anchusa azurea* (AA) et *Globularia alypum* (GA) par l'administration de 100 mg/kg d'extrait méthanolique, les résultats sont exprimés soit par l'épaisseur de l'œdème ou le poids d'œdème. ***: $p \leq 0.001$.

Les résultats ont montré que les extraits bruts des deux plantes ont un effet anti-inflammatoire qui a réduit le poids d'œdème de l'oreille gauche. Le poids de l'œdème du groupe témoin est 7.26 ± 0.15 mg, a été réduit par le Diclofénac à 4.44 ± 0.13 mg. L'EBr de *Globularia alypum* et *Anchusa azurea* (100 mg/kg) ont également réduit le poids à 5.88 ± 0.48 et 5.48 ± 0.13 mg, respectivement. Les deux plantes (GA et AA) ont un faible degré d'activité anti-inflammatoire (%I= $19.00 \pm 3.18\%$ et $24.51 \pm 2.80\%$, respectivement) en comparant avec celui du Diclofénac utilisé comme médicament de référence (%I= $38.84 \pm 1.87\%$) (Figure. 18).

Les résultats obtenus n'ont pas une corrélation avec la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des deux plantes, l'EBr-AA présente une activité anti-inflammatoire supérieure à celle de l'EBr-GA malgré son faible teneur en polyphénols et flavonoïdes.

Les coupes histologiques ont montré que toutes les oreilles droites qui ont reçu que le véhicule (acétone) ne présentent aucun signe d'inflammation (Figure. 19, Figure. 20, Figure. 21, Figure. 22). Cependant l'examen histologique des oreilles gauches a révélé un recrutement important des leucocytes polynucléaires dans le derme avec accompagnement perturbation du tissu conjonctif et la formation d'un œdème. Le traitement par l'extrait brut des deux plantes a entraîné une diminution légère non significative de l'infiltrat inflammatoire et la persistance de l'œdème a été remarquée, par contre l'injection de Diclofénac, a conduit à une diminution importante des leucocytes.

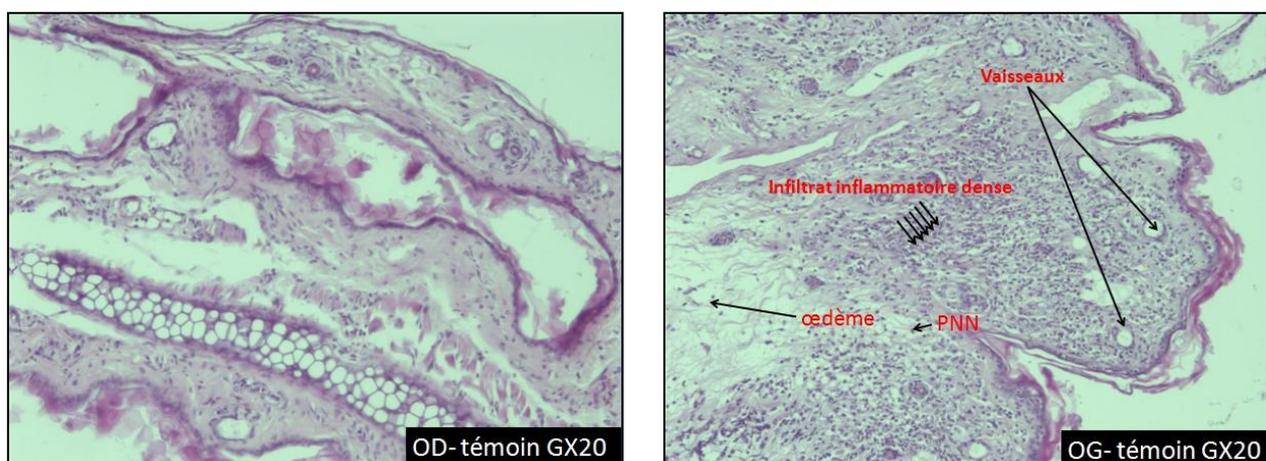


Figure. 19 : Coupes histologiques des oreilles des souris mâles témoin traité avec l'eau physiologique. Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 20X. OD : Oreille droite qui a reçu le véhicule (DMSO), OG : oreille gauche qui reçu du PMA. PNN : polynucléaire neutrophile.

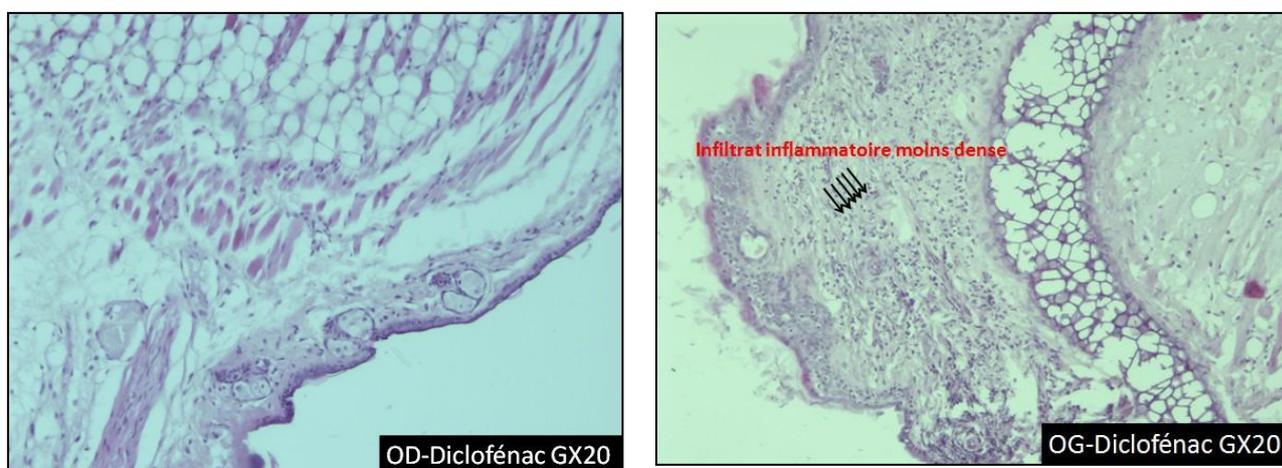


Figure. 20 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitée avec le Diclofénac. Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 20X. OD: Oreille droite qui a reçu le véhicule (acétone), OG : oreille gauche qui a reçu du PMA.

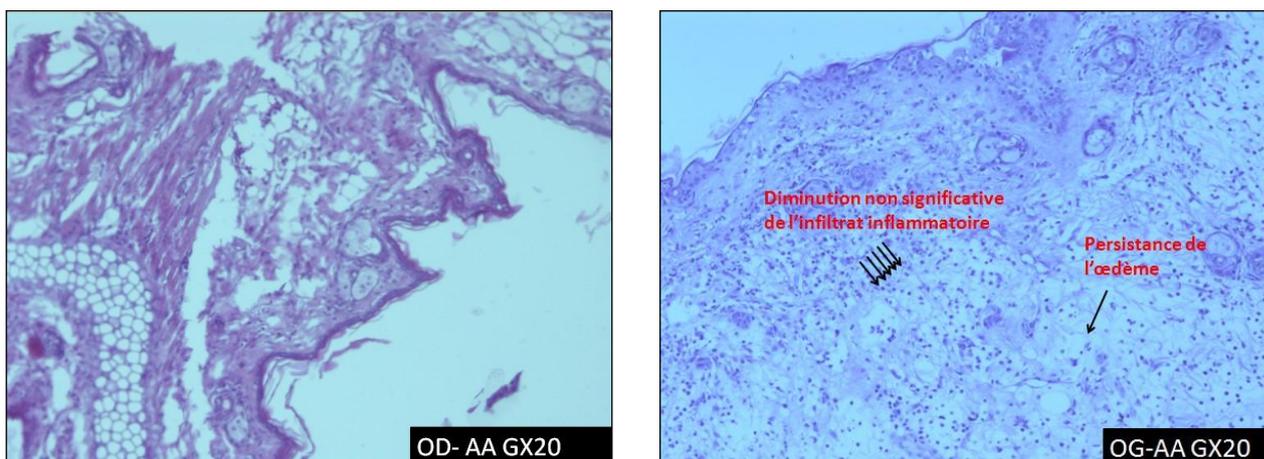


Figure. 21 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitées avec une dose de 100 mg/kg d'extrait méthanolique d'*Anchusa azurea* (AA). Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 20X. OD : Oreille droite qui a reçu le véhicule (DMSO), OG : oreille gauche qui reçu du PMA.

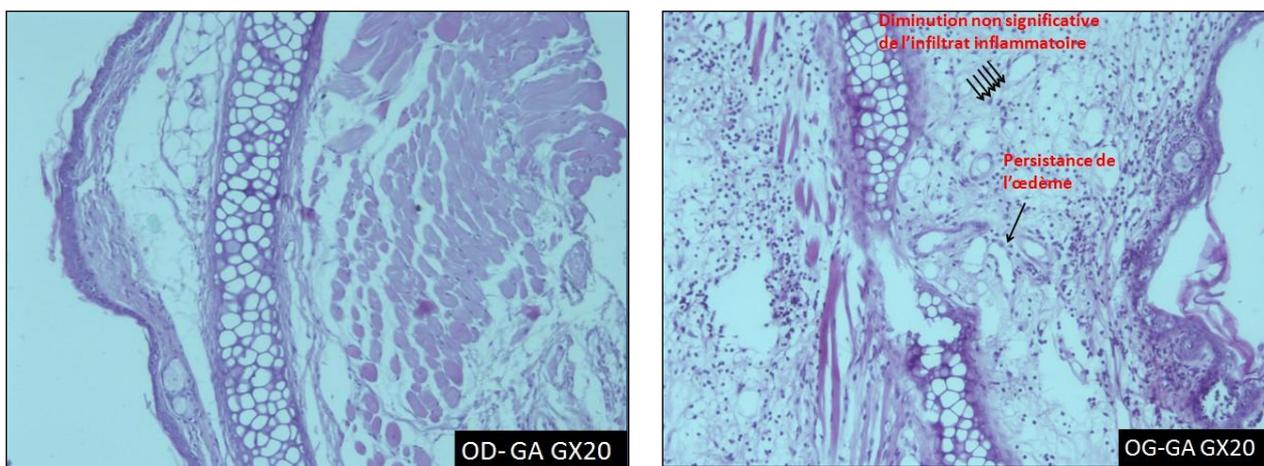


Figure. 22 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitées avec une dose de 100 mg/kg d'extrait méthanolique de *Globularia alypum* (GA). Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 20X. OD : Oreille droite qui a reçu le véhicule (DMSO), OG : oreille gauche qui reçu du PMA.

4.7 Le test d'inhibition enzymatique de la xanthine oxydase d'origine bactérienne

4.7.1 L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits sur les activités du XO

L'effet inhibiteur des extraits sur l'activité de la xanthine oxydase a été évalué en suivant la diminution de la production de l'acide urique à 295 nm. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits inhibent d'une manière dose-dépendante l'activité de l'enzyme XO (Figure. 23).

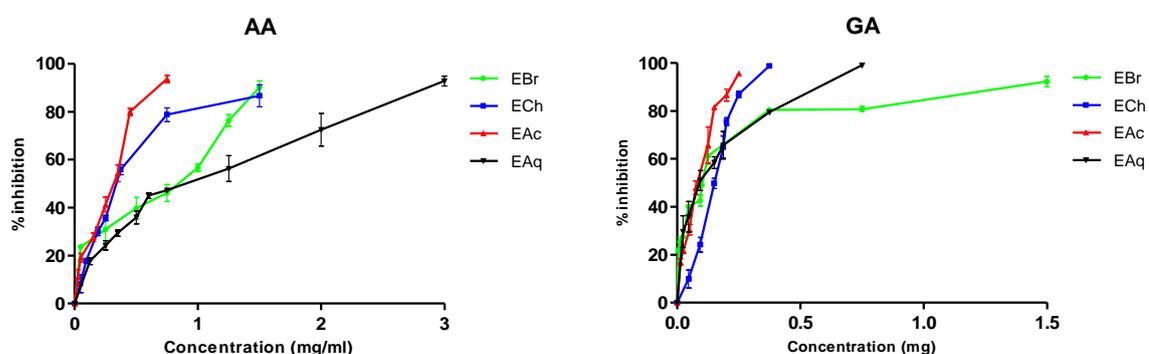


Figure. 23 : Inhibition de la XO par les extraits d'*Anchusa azurea* (AA) et *Globularia alypum* (GA).

L'extrait EAc-GA semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant avec une IC_{50} de 0.069 ± 0.003 mg/ml suivis par l'EBr-GA et l'EAQ-GA avec des IC_{50} de 0.081 ± 0.000 et 0.088 ± 0.002 mg/ml, respectivement. L'ECh-GA montre le pouvoir inhibiteur le plus faible.

Les valeurs des IC_{50} sont 34, 40 et 44 fois supérieures en comparant à l'allopurinol qui est un inhibiteur spécifique de la XO, respectivement pour le l'EAc-GA, EBr-GA et EAQ-GA (Tableau 16).

Tableau. 16 : Effet des extraits d'AA et GA sur les activités de la XO.

Extraits	IC ₅₀ (mg/ml)	
	<i>Anchusa azurea</i>	<i>Globularia alypum</i>
EBr	0.828 ± 0.108 ^{***}	0.088 ± 0.000 ^{***}
ECh	0.334 ± 0.006 ^{***}	0.123 ± 0.004 ^{***}
EAc	0.263 ± 0.002 ^{**}	0.069 ± 0.003 ^{***}
EAq	0.726 ± 0.016 ^{***}	0.081 ± 0.002 ^{***}
Allopurinol	0.002 ± 0.00	0.002 ± 0.00

Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 essais ± SD. Les comparaisons sont effectuées par rapport à l'inhibition de la XO par l'allopurinol (** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$).

Par contre, les extraits d'AA expriment des inhibitions plus au moins importantes par rapport au GA. L'ECh-AA et l'EAc-AA exercent un effet inhibiteur plus au moins considérable (IC₅₀ égale à 0.334 ± 0.006 et 0.263 ± 0.002, respectivement). Les extraits EBr-AA et EAq-AA inhibent faiblement les activités XO, une concentration de 700 et 800 µg/ml réduit l'activité de la XO par 50%. En comparant à l'IC₅₀ de l'allopurinol, l'inhibition de la XO par EAc-AA et ECh-AA est supérieur 134-fois et 167-fois, respectivement, (Tableau.16).

Pour la plante *Globularia alypum*, une corrélation considérable (R²= 0.631) est observée entre la teneur en polyphénols et leur effet inhibiteur. L'effet inhibiteur le plus important de l'extrait EAc-GA sur la XO peut être expliqué par la présence de taux relativement élevé en polyphénols et flavonoïdes. Pour la plante *Anchusa azurea*, il existe une bonne corrélation linéaire entre le teneur en polyphénols et l'effet inhibiteur de la XO (R²= 0.9034). L'extrait EAc-AA est le plus riche en polyphénols, cet extrait présente l'IC₅₀ la plus faible pour cette plante suivi par ECh-AA. Autrement dit, les extraits ECh-AA et EAc-AA sont les plus riches en polyphénols et flavonoïde et sont les meilleurs inhibiteurs de la XO.

De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différentes plantes sur l'activité XO de la XOR (Cos *et al.*, 1998; Van Hoorn *et al.*, 2002; Arai *et al.*, 2001). L'inhibition de l'activité

de la XO est attribuée à différents composés tels que les polyphénols et les flavonoïdes (Cos *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2010 ; Boumerfeg *et al.*, 2009 ; Tung *et al.*, 2010).

En se basant sur la corrélation entre la concentration en polyphénols et flavonoïdes et l'inhibition de la XO par ces extraits, nos résultats sont confirmés par ceux obtenus par Boumerfeg et ses collaborateurs (2009) sur les racines du *Tamus communis* L. Wu et ses collaborateurs (2010) sur *Géranium sibiricum* L. et Baghiani et ses collaborateurs (2010) sur les extraits *Carthamus caurulis*. Ils ont constaté que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les plus actifs sur la XO. Cos et ses collaborateurs ont montré sur l'étude d'une trentaine de flavonoïdes, que l'inhibition de la XO pourrait être liée non seulement à la concentration en polyphénols et flavonoïdes, mais aussi à la nature (structure) de ces composés. Les flavonoïdes glycosidiques (EAc) et non glucosidique (ECh) ont montré l'effet inhibiteur le plus élevé.

Plusieurs chercheurs ont déterminé aussi la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la XO. La présence de la double liaison entre les carbones C2 et C3 du cycle A des flavonoïdes est très importante pour l'inhibition (Cos *et al.*, 1998). Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Une structure plane est en effet nécessaire pour une haute activité inhibitrice vis-à-vis de la XO (Van Hoorn *et al.*, 2002).

4.7.2 La détermination du type d'inhibition

Afin de déterminer la relation entre les extraits et leur activité inhibitrice, nous avons déterminé le type d'inhibition pour chaque extrait. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17 et Annexe 4.

Tableau. 17 : Type d'inhibition des extraits d'*Anchusa azurea* et *Globularia alypum*.

Extraits	Type d'inhibition	
	<i>Anchusa azurea</i>	<i>Globularia alypum</i>
EBr	Incompétitif	compétitif
ECh	Non compétitif	compétitif
EAc	Non compétitif	Non compétitif
EAq	Incompétitif	compétitif
Allopurinol	compétitif	compétitif
Quercetine	compétitif	compétitif
Catéchine	Incompétitif	Incompétitif

Les extraits EBr-GA, ECh-GA et EAq-GA inhibent la XO de manière compétitive, tandis que Les extraits EAc-GA, EAc-AA et ECh-AA sont des inhibiteurs non compétitifs. Les extraits EBr-AA et EAq-AA sont des inhibiteurs incompétitifs (Annexe 4). L'inhibition de l'activité XO par les extraits est traduite par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant indépendamment ou en synergie sur les sites actifs de l'enzyme.

La représentation de Lineweaver-Burk des extraits EBr-GA, ECh-GA et EAq-GA a montré que le type d'inhibition est compétitif. Ces extraits sont les inhibiteurs les plus puissants de la XO avec des pourcentages d'inhibition de 50% à une concentration de l'ordre de 100 µg/ml d'extraits. Ce type d'inhibition est le même pour les flavonoïdes: apigénine, quercétine, myricétine, isovitexine, genistéine avec des K_I entre 0.6 et 5 µM (Lin *et al.*, 2002), suggérant qu'une de ces molécules ou autres peuvent être présentes dans notre extrait.

D'autre part, les extraits ECh-AA et EAc-GA inhibent la XO d'une manière non compétitive. Cependant, l'extrait EAc-GA qui présente le meilleur inhibiteur ($IC_{50} = 0.069$ mg/ml), il inhibe aussi la XO d'une manière non compétitive, même type d'inhibition exercé par la catéchine (Annexe 4). Ceci est en accord avec Aucamp et ses collaborateurs (1997), indiquant que ces extraits agissent différemment sur l'enzyme, donnant un complexe non-fonctionnel.

En fait, ce type d'inhibition est observée dans le cas de nombreux composés phénoliques, tels que les dérivés de l'acide caféique 6-O-trans-caféoyl β -D-glucopyranoside et son isomère, 6-O-trans-cafféoyl α -D-glucopyranoside (Chang *et al.*, 1993).

Selon certains auteurs, le type d'inhibition de la XO est selon la ou les molécules qui réagissent avec l'enzyme. Dans une étude menée sur 122 extraits chinois, Kong et ses collaborateurs (2000) ont rapporté que les meilleurs inhibiteurs sont trois extraits méthanolique : *Cinnamomum cassia* (Lauraceae), *Chrysanthemum indicum* (Asteraceae) et *Lycopus europaeus* (Lamiatae) et que le type d'inhibition est mixte. Unno et ses collaborateurs (2004) ont évalué l'effet inhibiteur des extraits de *Lagerstroemia speciosa*, en isolant 2 molécules actives : acide valonique dilactone (VAD) et l'acide ellagique.

Les résultats ont montré que l'effet inhibiteur de la VAD est meilleur que l'allopurinol avec un mode d'inhibition non compétitif. Umamaheswari et ses collaborateurs (2009) ont aussi testé l'activité inhibitrice des fractions d'une plante *Erythrina stricta* utilisée pour le traitement de la goutte en Inde, ils ont trouvé l'extrait chloroformique exerce un bon effet avec une $IC_{50} = 21.2 \mu\text{g/ml}$ suivis par l'EAc et l'EAq, le type d'inhibition de la fraction la plus active (ECh) est de type mixte.

Berboucha et ses collaborateurs (2010) ont testé l'activité inhibitrice de la XO d'un mélange de quercétine et catéchine, dans le but de déterminer l'effet de l'interaction simultanée de deux inhibiteurs potentiels. Les résultats ont montré que le type d'inhibition est mixte, ce qui signifie que le type d'inhibition peut être modifié par la présence de d'autres molécules présentes dans l'extrait des plantes par des interactions non spécifiques. Tang et Yang (2010) ont également évalué l'extrait méthanolique d'une *Leguminosae*. Par ailleurs, les valeurs d' IC_{50} indiquent que l'okanine est l'inhibiteur le plus puissant ($IC_{50} = 0.076 \mu\text{M}$), suivi par melanoxetin ($IC_{50} = 0.274 \mu\text{M}$) et l'allopurinol ($IC_{50} = 4.784 \mu\text{M}$). Cette étude a révélé que

l'okanine et melanoxetine sont des excellents inhibiteurs avec un mode d'inhibition de la XO non compétitif et compétitif respectivement. Leurs activité inhibitrice est meilleur que l'allopurinol

Cos et ses collaborateurs (1998) ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production d'acide urique par la XO. Ils ont ainsi déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de cette enzyme. La présence de la double liaison entre les carbonnes C2 et C3 du cycle A des flavonoïdes est très importante pour l'inhibition. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Une structure plane est en effet nécessaire pour une haute activité inhibitrice vis-à-vis de la XO (Van Hoorn *et al.*, 2002).

En conclusion, pour obtenir une vue globale sur l'activité inhibitrice de la XO des extraits des deux plantes : GA et AA, une étude *in vivo* est souhaitable sur des modèles hyperurécémique, partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps, et vice versa.

4.7.3 L'effet hypouricémique des extraits

Les agents antihyperuricémiques sont couramment utilisé pour le traitement de la goutte et l'arthrite chronique comme les agents uricosuriques, les inhibiteurs de la XOR et l'urate oxydase. Cependant, l'utilisation de ces agents antihyperuricémiques est limité à cause de ses effets secondaires indésirables (Bomalaski et Clark, 2004 ; Bieber et Terkeltaub, 2004 ; Yu *et al.*, 2007). La recherche de meilleurs agents antihyperuricémique est fortement demandée, la présente étude représente un effort pour trouver une nouvelle molécule hypouricémique à base de plante.

L'hyperuricémie est induite par l'injection intrapéritoniale de l'oxonate de potassium qui est un inhibiteur compétitif d'uricase hépatique, il bloque partiellement la conversion de l'acide urique en allantoïne et donc augmente le taux d'acide urique dans le sang des souris en donnant un modèle animal hyperurécémique (Osada *et al.*, 1993 ; Huang *et al.*, 2011). L'acide urique, l'urée et la créatinine sont dosés dans le sérum et le surnageant du foie.

Nous avons essayé de confirmer l'effet inhibiteur *in vitro* des deux plantes sur la XO *in vivo* en mesurant le taux d'acide urique dans le sérum et le surnageant du foie sur un modèle animal hyperurécémique et donc essayer de faire une comparaison entre l'effet inhibiteur des extraits *in vitro* et *in vivo* de la XO.

La valeur de l'acide urique dans le groupe témoin est : 1.48 ± 0.07 mg/L, pour le groupe qui a reçu l'oxonate de potassium « OP », le taux d'acide urique est considérablement augmenté : 6.33 ± 0.46 mg/L deux heures après l'injection intrapéritonéale d'oxonate de potassium ce qui indique que cette dernière a induit avec succès l'hyperurécémie.

À partir des résultats obtenus (Figure. 24), il paraît que le traitement par tous les extraits a diminué la valeur d'acide urique en comparant au témoin (1.48 ± 0.07 mg/L). Pour le groupe « OP », le taux d'acide urique plasmatique a augmenté 4 fois (6.33 ± 1.22 mg/L) et presque 2 fois pour le surnageant du foie (31.36 ± 5.4 mg/L), l'administration de 10 mg/kg d'allopurinol a diminué le taux d'acide urique vers le normal (1.89 ± 0.32 mg/L, 16.36 ± 1.03 mg/L, respectivement pour le sérum et surnageant).

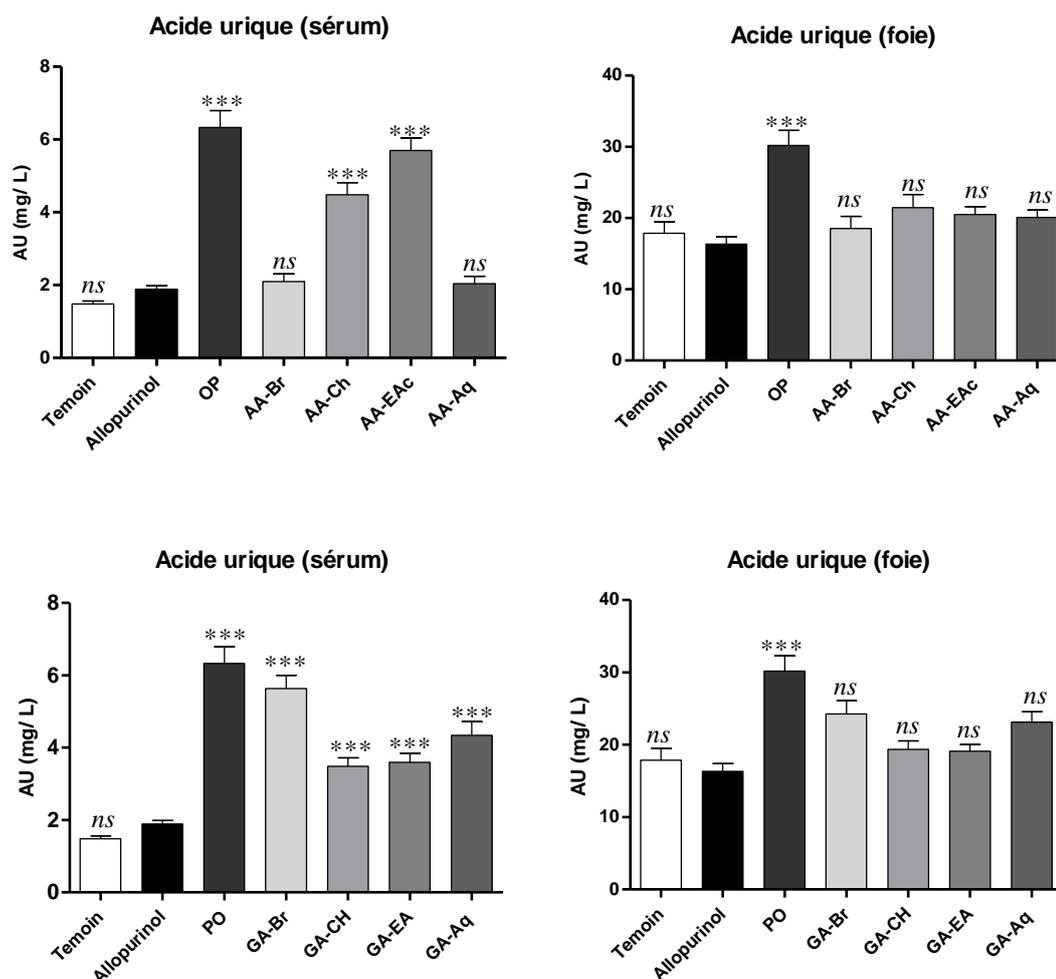


Figure. 24 : L'activité antihypourécimique des extraits d'AA et GA. La comparaison contre le groupe allopurinol, *** : $p \leq 0.001$, ns: n'est pas significatif.

Les extraits EBr-AA et EAq-AA ont provoqué une diminution de l'acide urique plasmatique (une diminution de 66%). Alors que, L'ECh-AA a diminué le taux d'AU d'une manière plus au moins remarquable avec un pourcentage de 29.22%. L'EAc-AA garde presque la même valeur de l'AU du groupe OP. Pour le surnageant, seul l'EBr-AA qui a provoqué une diminution significatif de l'AU hépatique (18.5 ± 1.85 mg/L). On peut expliquer cette diminution soit par l'inhibition significative de la XO soit par l'inhibition d'un des voies de synthèse de l'acide urique (Yu *et al.*, 2006). L'effet hypouricémiant pourrait être dû à l'effet

inhibiteur de ces extraits sur la XO (IC_{50} (EBr-AA)= 0.828 mg/l, IC_{50} (EAq-AA)= 0.726 mg/l).

Ces résultats sont en contradiction avec les résultats obtenus *in vitro*, l'EAc-AA et l'ECh-AA qui présentent les IC_{50} les plus faibles *in vitro* (0.263 mg/l, 0.334 mg/l) et donc l'effet le plus puissant. Ces extraits ont permis le maintien de la même valeur de l'acide urique; une diminution non significative en comparant au groupe allopurinol (AU plasmatique= 1.89 ± 0.1 mg/L). Seuls les extraits EBr-AA et EAq-AA ont provoqué une diminution presque similaire à celui de l'allopurinol (2.1 ± 0.47 mg/L, 2.04 ± 0.45 mg/L).

Les extraits ECh-GA, EAc-GA et EAq-GA ont réduit d'une manière significative le taux d'AU plasmatique et hépatique (diminution de 44.76%, 43.03% et 31.31%, respectivement). En comparant ces résultats avec ceux obtenus *in vitro*, l'extrait ECh-GA ayant l'effet inhibiteur le plus faible *in vitro* (IC_{50} = 0.123 mg/ml) présente l'effet le plus efficace *in vivo*. L'extrait EBr-GA a diminué le taux d'acide urique mais cette diminution reste non significative (AU= 5.64 ± 0.36 mg/L) en comparant au groupe allopurinol (1.89 ± 0.1 mg/L). Contrairement aux résultats obtenus *in vitro*, l'EBr-GA a une activité inhibitrice remarquable (IC_{50} = 0.088 mg/ml). Les extraits ECh et EAc-GA provoquent un effet très remarquable en comparant au contrôle positif « allopurinol » surtout l'AU hépatique (allopurinol= 16.36 mg/L, ECh-GA= 19.4 mg/L et EAc-GA= 19.1 mg/L). En résumé, il y a une grande contradiction entre l'inhibition *in vitro* et *in vivo*, cette incohérence ou différence peut être due à la différence dans la biodisponibilité des flavonoïdes ou substances naturelle et leur vaste métabolisme chez les souris (Huang *et al.*, 2007).

En effet, plusieurs chercheurs dans une étude sur la maladie de la goutte ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la XO et par conséquent, peuvent faire régresser la

maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et inhibant la XO humaines (Hanasaki *et al.*, 1994 ; Zhu *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2011).

Zhu et ses collaborateurs (2004) ont montré que la quercétine et la rutine sont plus efficace que l'extraits éthanolique de *Biota orientalis*. En utilisant la même dose, ces molécules aussi ont provoqué une inhibition significative de la xanthine dehydrogenase/xanthine oxydase (XDH/XO) d'une manière dose dépendante. Huang et ses collaborateurs (2011) ont évalué l'effet de quelque flavonoïde sur l'activité d'une XO *in vitro* et *in vivo* dans le sérum et dans le foie. Ils ont trouvé que ces flavonoïdes n'ont pas un effet significatif *in vitro*. Cependant une diminution légère du taux d'acide urique plasmatique entre 8,6-16,5% a été observée, ils ont constaté aussi qu'il n'existe pas une corrélation entre l'activité inhibitrice de la XO *in vivo* et *in vitro*.

D'autres équipes de recherche ont aussi testé l'effet hypouricémique de plusieurs flavonoïdes, l'administration orale de ces flavonoïdes durant trois jours est capable d'obtenir un bon effet hypouricémiant. Ces molécules ont considérablement réduit le taux d'acide urique hépatique et inhibent significativement l'activité de XO hépatique. Il est fort probable que ces flavonoïdes réduisent le taux d'acide urique par l'inhibition de l'activité de XO. L'analyse de la structure chimique a montré qu'une structure plane avec des groupements hydroxyles a joué un rôle crucial dans l'activité hypouricémiantes des flavonoïdes (Mo *et al.*, 2007).

L'évaluation de la fonction rénale : L'objectif de notre recherche est d'évaluer l'effet des extraits sur la fonction rénale. Le taux d'urée et le taux de la créatinine peuvent être des indicateurs pour l'évaluation de la fonction rénale. Les lésions rénales peuvent être accompagnées par une augmentation de la créatinine et l'urée.

La créatinine est une molécule azotée produite par l'organisme par l'intermédiaire du catabolisme de la créatine qui est un composé protéique contenu dans le tissu musculaire. La créatinine est une molécule physiologiquement inerte. Cela signifie qu'elle n'est ni métabolisée, ni utilisée d'une quelconque manière par l'organisme. Elle est strictement éliminée par les reins. Son dosage est employé dans l'évaluation de la fonction rénale et plus particulièrement dans l'estimation du débit de filtration glomérulaire. L'urée représente la forme principale d'élimination de l'azote, synthétisée lors du catabolisme des protéines par le foie, c'est un des premiers marqueurs qui a été utilisé pour mesurer le débit de filtration glomérulaire, Une teneur élevée indique généralement une atteinte glomérulaire, mais la concentration peut être aussi modifiée par une alimentation inadéquate ou par une hépatotoxicité (Newcombe, 2013 ; Jetanalin et Lee, 2013).

Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenu par Li et ses collaborateurs (2011), qui ont montré que l'induction de l'hyperuricémie par l'oxonate de potassium provoque un dysfonctionnement rénal et par conséquent il augmente le taux d'acide urique et de créatinine. Tous les extraits et l'allopurinol n'ont pas diminué le taux de la créatinine (Figure. 25). Cependant, le taux d'urée a diminué par rapport aux souris témoins normales. En les comparant au groupe "OP" (0.48 g/L), seuls les extraits EBr-AA, EAq-AA, ECh-GA et EAc-GA ont permis le déclin du taux d'urée ($p \leq 0.05$) jusqu'à la valeur normale (0.34 g/L).

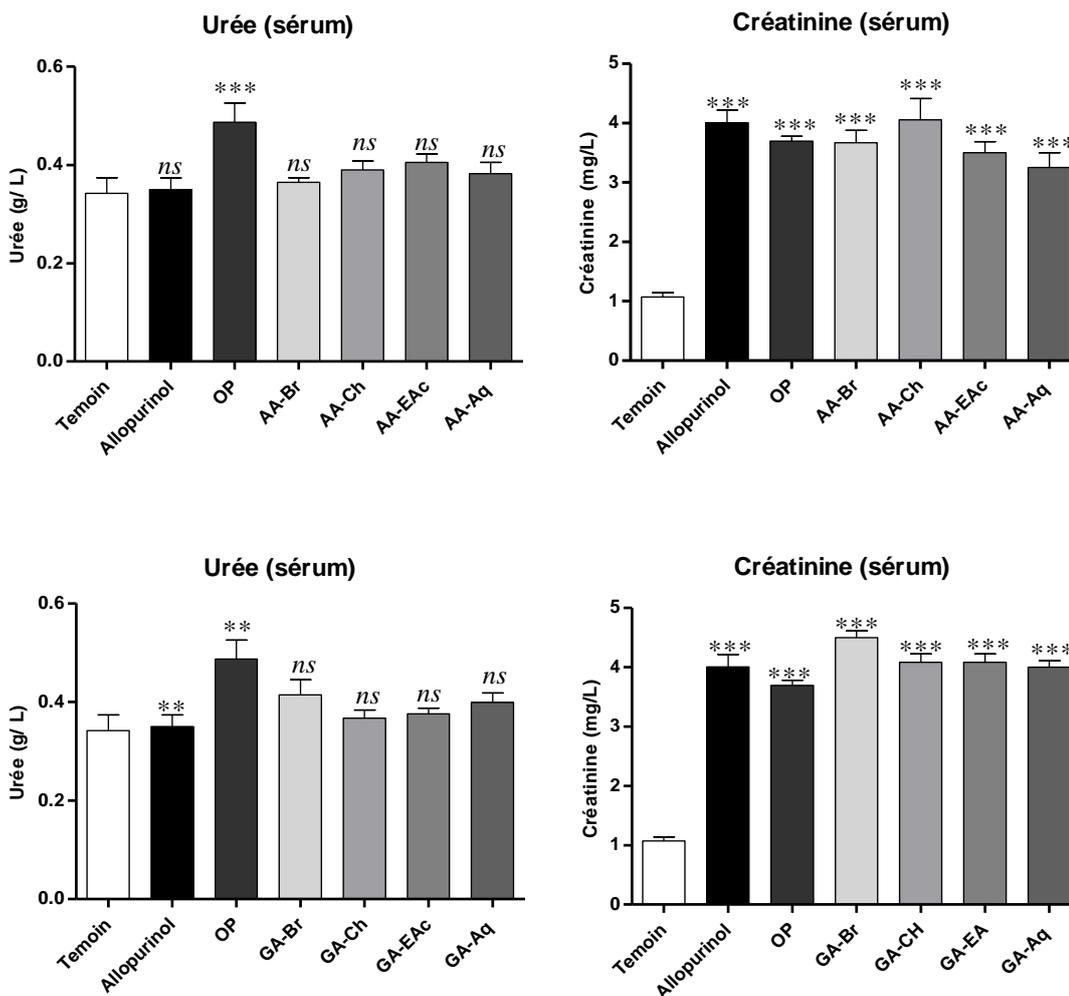


Figure. 25 : L'évaluation de la fonction rénale par le dosage de l'urée et la créatinine. La comparaison contre le groupe témoin. **: $p \leq 0.05$, *** : $p \leq 0.001$, ns: n'est pas significatif.

La modification du taux de l'urée et la créatinine peut être causée par un certain nombre de facteurs autres que la maladie rénale, y compris la dégradation des protéines, une mauvaise hydratation, et une insuffisance hépatique. Une diminution de l'urée chez les animaux traités par les flavonoïdes peut être liée à la production inefficace d'urée dans le foie. La vitesse de formation de l'urée dépend de la vitesse du catabolisme protéique, une augmentation de l'urée reflète une accélération du taux de catabolisme des protéines et une diminution de l'excrétion urinaire d'urée (Huang *et al.*, 2011). Par conséquent, nous pouvons conclure que le taux de l'urée et la créatinine après le traitement avec extraits des plantes sont normales et que les résultats de cette recherche indiquent l'absence des dommages rénaux chez les souris.

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales sont utilisées partout dans le monde pour traiter diverses maladies, y compris l'inflammation, les maladies cardiaques, le cancer... Un grand nombre de plantes médicinales contiennent des composés présentant des propriétés thérapeutiques très importantes. L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. Pour permettre l'utilisation vaste des plantes médicinales dans la médecine moderne, la recherche et le développement de nouveau traitement important est demandé. Cependant, l'information scientifique sur les activités biologiques des plantes médicinales, y compris *Anchusa azurea* et *Globularia alypum* est encore insuffisante. De ce fait, on a inspiré cette étude, une demande très croissante pour revenir à la nature dans le but de chercher des soins de santé et de nouveau traitement est une autre motivation importante.

D'après les résultats obtenus dans cette recherche, les extraits ECh et EAc des deux plantes sont plus actifs sur l'ensemble des bactéries. Ces extraits perdent leur efficacité en synergie avec la gentamicine. Des effets additifs, potentiels et antagonistes ont été remarqués dans le test de synergie avec la gentamicine. Les extraits EBr-AA, EAc-AA, EAq-AA, EAc-GA et EBr-GA ont montré une très bonne activité inhibitrice des β -lactamases. Une corrélation significative entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité antibactérienne des extraits a été observée, mais ceci n'exclue en aucun cas la contribution d'autres composés.

Pour évaluer l'activité antioxydante, Il est préférable d'utiliser une combinaison d'au moins deux marqueurs différents pour identifier un stress oxydant. Les résultats obtenus ont montré que l'EBr-GA, EAc-GA et l'EAc-AA présentent une importante activité anti-radicalaire vis à

vis du DPPH. L'EAc-GA, l'EBr-GA et l'EAc-AA présentent la plus grande activité dans le test de blanchissement du β -carotène (entre 76% et 84%). L'activité de l'EAc peut être attribuée aux teneurs les plus élevées de composés phénoliques ainsi la nature de ces composés (polyphénols glycosidiques). Néanmoins, la bonne activité antioxydante de l'EBr-GA indique que le contenu en polyphénols et en flavonoïdes et leurs polarité ne sont pas les seuls facteurs liés à cette activité. La synergie possible de polyphénols avec d'autres composants présents dans les extraits peut être responsable de cette activité.

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence l'effet protecteur *in vitro* des extraits contre l'hémolyse oxydative des érythrocytes. Le traitement par les extraits a fait augmenter les valeurs d'HT₅₀ comparé au témoin, ces extraits ont un effet dose dépendante sur l'augmentation des défenses antioxydantes globales à l'exception de l'EAq-GA. Les trois concentrations élevées de l'ECh-AA ont entraîné un retardement très significatif de l'hémolyse, la concentration (84,74 μ g/ml) des extraits ECh-GA et EAc-GA a renforcé d'une manière significative le système anti radicalaire érythrocytaire, Ces deux extraits, à cette concentration ont retardé l'hémolyse presque de 40 min. Ces résultats peuvent être expliqués par les extraits apolaires lipophiles qui sont les meilleurs protecteurs contre les dommages de la membrane cellulaire induite par les radicaux libres.

Cependant, l'étude *in vivo* avec une injection intrapéritonéale a permis d'évaluer l'effet des extraits EBr-AA, EBr-GA, EAc-GA et EAq-GA sur le statut antioxydant chez les souris. Le traitement par ces extraits a entraîné une amélioration de la capacité antioxydante totale du sang et de la capacité antioxydante plasmatique chez les souris. En effet, La comparaison de l'hémolyse *in vivo* et *in vitro*, indique qu'il ya des extraits qui ne sont pas efficaces *in vitro*, mais ils ont montré un puissant pouvoir anti-hémolytique *in vivo*. Cela peut être expliqué

par le changement de la structure de quelques flavonoïdes pendant les étapes d'absorption, la distribution et le métabolisme.

Le test d'inhibition des activités XO révèle que l'extrait EAc-GA est le plus puissant. Par contre, les extraits d'*Anchusa azurea* expriment des inhibitions plus ou moins importantes par rapport au *Globularia alypum*. Les extraits EBr-GA, ECh-GA et EAq-GA présentent et montrent des inhibitions de type compétitif. L'inhibition de l'activité XO par les extraits est traduite par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant indépendamment ou en synergie sur les sites actifs de l'enzyme. L'effet inhibiteur *in vitro* des deux plantes sur la XO est confirmé *in vivo* sur un model animal hyperurécimique. Les extraits EBr-AA, EAq-AA, ECh-GA, EAc-GA et EAq-GA ont provoqué une diminution significative de l'acide urique plasmatique. L'effet hypouricémiant pourrait être dû à l'inhibition de la XO par ces extraits. En effet, la comparaison de l'inhibition de la XO *in vivo* et *in vitro*, révèle une "contradiction"; les extraits qui ne sont pas efficaces *in vitro*, sont très efficaces *in vivo*, et vice-versa.

Les extraits bruts des deux plantes ont un effet anti-inflammatoire sur d'œdème. Par contre, les coupes histologiques n'ont pas montré aucun effet significatif.

Les résultats obtenus dans cette étude peuvent être approfondis par des études suivantes:

- L'isolement, caractérisation et l'identification des composés actifs par des méthodes spécifiques.
- L'éclaircissement des synergies obtenues avec la Gentamicine et la réalisation de d'autres synergies avec d'autres classes d'antibiotiques.
- L'isolement et la détermination des principes actifs serait un point de départ pour le développement des inhibiteurs ou inactivateurs des β -lactamases.

- Une études de la toxicité des plantes étudiées est indispensable afin de déterminer si elles peuvent être utilisées pour la fabrication de médicaments.
- D'autres études *in vivo* seraient intéressantes et plus prometteuse visant d'autres marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes plasmatiques.
- Vue le bon effet hypouricémiant, des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des principes actifs serait utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

Références bibliographiques

- Abu Sitta K, Shomah MS, Salhab AS.** 2009. Hepatotoxicity of *Teucrium polium* L. tea: supporting evidence in mice models. *Australian Journal of Medical Herbalism* 21(4): 106-107.
- Afanas'ev IB.** 2009. Signaling mechanisms of oxygen and nitrogen free radicals, *CPC Press*. pp. 1-71.
- Albano SM, Miguel MG.** 2010. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products* 33(2): 338-343.
- Andersen OM, Markham KR.** 2006. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, Taylor & Francis Group. USA. pp. 1-37.
- Ankli A, Heinrich M, Bork P, Wolfram L, Bauerfeind P, Brun R, Schmid C, Weiss C, Bruggisser R, Gertsch J, Wasescha M, Sticher O.** 2002. *Yucatec Mayan* medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 79:(1) 43-52
- Ansari H, Allameh A, Hajhaidari M, Dadkhah A, Rasmi Y.** 2004. Influence of plasma total antioxidant ability on lipid and protein oxidation products in plasma and erythrocyte ghost obtained from developing and adult rats pretreated with two vitamin K formulations. *Molecular and Cellular Biochemistry* 267: 195-201.
- Arai T, Endo N, Yamashita K, Sasada M, Mori H, Ishii H, Hirota K, Makino K, Fukuda K.** 2001. 6-Formylpterin, a xanthine oxidase inhibitor, intracellularly generates reactive oxygen species involved in apoptosis and cell proliferation. *Free Radical Biology Medicine*.1,30(3): 248-59.
- Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adigüzel A, Sahin F, Özkan H.** 2006. Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology* 44: 247-252.
- Aucamp J, Gaspar A, Hara Y, Apostolides Z.** 1997. Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (*Camellia sinensis*). *Anticancer Research* 17:4381-4385.
- Babic MA, Hujer AM, Bonomo RA.** 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates* 9: 142-156.
- Baghiani A, Boumerfeg S, Belkhiri F, Khennouf S, Charef N, Harzallah D, Arrar L, Abdel-Wahhab M.** 2010. Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L. extracts grow wild in the Algeria flora. *The Comunicata Scientiae* 1: 128-136.
- Baghiani A., Harrison R, Benboubetra M.** (2003). Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry* 111: 407-414.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M.** 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 46: 1086-1089.

- Bartosz G.** 2005. Superoxide Dismutases and Catalase. Vol. 2, Part O Dans: The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin. Springer-Verlag Heidelberg. pp.
- Basile A, Giordano S, López-Sáez JA, Cobianchi RC.** 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52(8):1479-82.
- Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M.** 2011. New Treatment Options against Gram-negative Organisms. Dans: Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine. Springer Science+Business Media LLC .pp 501-515.
- Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C.** 1991. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*. 35: 123-143.
- Beniston NT, Beniston WS.** 1984. Fleurs d'Algérie, E. N. L. Alger.
- Bendjelloul-Bensalem M.** (1998). Techniques histologiques théorie et pratique. Office des publications universitaires. pp. 6-41.
- Benzie IF, Strain JJ.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal of Biochemistry* 15, 239(1): 70-6.
- Berboucha M, Ayouni K, Atmani D, Atmani Dj, Benboubetra M.** 2010. Kinetic Study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from Two Selected Algerian Plants Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Journal of medicinal food* 13 (4): 1-9.
- Berger MM.** 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20: 48-53.
- Bidaut-Russell M.** 2001. Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 15: 739-753.
- Bieber JD, Terkeltaub RA.** 2004. Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis Rheumatoid* 50: 2400-2414.
- Billerbeck VG.** 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* 5: 249-253.
- Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini MP, Piatti, E.** 2007. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry* 104(4): 1635-1640.
- Bomalaski JS, Clark MA.** 2004. Serum uric acid-lowering therapies: where are we heading in management of hyperuricemia and the potential role of uricase. *Current Rheumatology Reports* 6: 240-247.
- Bonnier G, De Layens G.** 1985. Flore Complète Portative de la France, de la Suisse et de la Belgique, p : 221.
- Boumerfeg S, Baghiani A, Messaoudi D, Khennouf S, Arrar L.** 2009. Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. Root Extracts. *Phytotherapy Research* 23: 283-288.

- Boussoualim N, Meziane-cherif DJ, Baghiani A.** (2011). Kinetic study of different flavonoids as inhibitors of beta-lactamase enzyme. *African Journal of Biochemistry Research* Vol. 5(10), pp. 321-327.
- Bray RC.** 1975. Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In Boyer P.D. *The enzyme*. New York: *Academic Press*. 299-419.
- Brook I.** 2009. Antibiotic Resistance of Anaerobic Bacteria. Dans: *Antimicrobial Drug Resistance*, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC. pp. 873-899
- Brown KL, Hancock EW.** 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion Immunology* 18: 24-30.
- Burda S, Oleszek W.** (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2774-2779.
- Bush K.** 2009. The importance of β -lactamases to the development of new β -lactams. Chapitre 12. Dans: *Antimicrobial Drug Resistance*, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC. pp. 135-141.
- Cai Z, Yan Y.** 2007. Pathway and mechanism of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Medical Colleges of PLA* 22: 320-325.
- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, Akpulat HA.** 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 87: 215-220.
- Cavaillon JM.** 2005. Médiateurs de l'inflammation. Dans: *Sepsis sévère et choc septique. Le point sur...* Springer-Verlag.France. pp. 23-49.
- Chabot S, Bel-Rhlid R, Chenevert R, Piche Y.** 1992. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO²-enriched conditions. *New Phytologist* 122: 461-467.
- Chaïbi EB, Sirot D, Paul G, Labia R.** 1999. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43(4): 447-458.
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC.** 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research* 13:2165-2170.
- Charles DJ.** 2013. Natural Antioxidants. Chapitre 3. Dans: *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. New York. Springer Science+Business Media. pp. 39-64.
- Chen P, Hung SI, Chen SY, Chen YT.** 2011. Allopurinol. Chapitre 13. dans: *Pharmacogenomic Testing in Current Clinical Practice, Molecular and Translational Medicine*, Springer Science+Business Media. pp. 213-223.
- Chograni H, Riahi L, Zaouali Y, Boussaid M.** 2011, Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *African Journal of Ecology* 51: 343-34

- Comhair SAA, Erzurum SC.** 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases, *American Journal Physiology Lung Cell. Molecular Physiology* 283: 246-255.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu J.P, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe D.** 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural product.* 61: 71-76.
- Cowan MM.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiologu rev* 12(4): 564-582.
- Dai F, Miao Q, Zhou B, Yang L, Liu ZL.** 2006. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sciences* 78: 2488-2493.
- Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK.** 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4(2): 104-111.
- Das NU.** 2011. Inflammation. Chapitre 3. Dans: Molecular Basis of Health and Disease. New Work. Dordrecht: Springer. pp. 15-100.
- Decker EA, Welch B.** 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 674-677.
- Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB.** 2002. Reactive oxygen species, antioxidant system and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1255-1272.
- Deny BJ, Lambert PA, West PWJ.** 2002. The favonoid galangin inhibits the L1 metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters* 208: 21-24.
- Desikan R, Hancock JT, Neill SJ.** 2003. Oxidative stress signalling. Chapitre5. Dans: Topics in Current Genetics, Vol. 4 Plant Responses To Abiotic Stress. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 121-149.
- Diallo A.** 2005. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (*Myrtaceae*). Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali. pp. 31-35.
- Djeridane A, Yousfi M, Vidal N, Lesgards JF, Stocker P.** 2007. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Food Chemistry* 97: 654-660.
- Dorward DA, Lucas CD, Rossi AG, Haslett C, Dhaliwal K.** 2012. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution *Pharmacology & Therapeutics.* 135: 182-199.
- Dröge W.** 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Review* 82 (1): 47-95.
- Dupont CH.** 1970. Détermination de la DL₅₀ chez la souris (méthode de Litchfield et Wilcoxon). *Journal of Pharmacology* 1: 407-414.

- Důračková Z.** 2008. Oxidants, Antioxidants and Oxidative Stress. Chapitre 2. Dans: Mitochondrial Medicine. Springer Science and Business Media B.V. , pp. 19-54
- Dwight JF, BHendry M.** 1996. The effects of *tert-butyl* hydroperoxide on human erythrocyte membrane ion transport and the protective actions of antioxidants. *Clinica Chimica Acta* 249: 167-181.
- Eaton DL, Klaassen CD.** 2001. Principles of toxicology. Dans: Toxicology: the basic science of poisons. 6^{ème} Edition. McGraw-Hill: Medical publishing division. USA. pp. 11-34.
- Eddouke M, Maghrani M, Jouad H.** 2002 .Hypoglycemic effect of rubus fructifose l and *Globularia alypum* in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of ethno pharmacology* 81: 351-356.
- El amri H, Jana M, Kayara A, Lazrek B, Skim F.** 1998. Toxicological studies on *Globularia alypum* and *zygophyllum gaetulum* in rats. *Phytotherapy research* 2: 592-594.
- Es-Safi N, Kollmanna A, Khlif S, Ducrot PH.** 2006. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L.structure–activity relationship. *Journal of Natural Products* 40: 1246-1252.
- Evans WJ.** 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition* 72: 647-652.
- Favier A.** 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*. 108-115.
- Fehri B, Aiach M, Mueem K.** 2012. Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum* aqueous leaf extract, *Pharmacognosie research* 4(3):138-14.
- Fernandez-Lopez J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Perez-Alvarez JA, Kuri V.** 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science* 69: 371-380.
- Finberg RW, Guharoy R.** 2012. Penicillins, Chapitre 4. Dans: Clinical use of anti-infective agents: A Guide on how to prescribe drugs used to treat infections, Springer Science+Business Media, LLC. pp.
- Fontaine E.** 2007. Radicaux libres. Dans: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer-Verlag France. pp. 251-257
- Foyer CH, Trebst A, Noctor G.** 2008. Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione Chapitre 16. Dans: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment,. Netherlands. Springer Science+Business Media B.V. pp. 241-268
- Frank CLU.** 1992. Toxicologie, Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Paris. pp. 73-202.
- Frankel EN, Meyer AS.** 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1925-1940.
- Freiburghaus F, Kaminsky R, Nkunya MH, Brun R.** 1996. Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacol* 55: 1-11.

- Frère JM.** (1995). β -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology* 16: 385-395.
- Gangoué-Piéboji J, Baurin S, Frère JM, Ngassam P, Ngameni B, Azebaze A, Emmanuel Pegnyem D, Watchueng J, Goffin C, Galleni M.** 2007. Screening of some medicinal plants from Cameroon for β -lactamase inhibitory activity. *Phytotherapy research*. 21, 284-287.
- Garrido G, González D, Lemus Y, García D, Lodeiro L, Quintero G, Delporte C, Núñez-Sellés AJ, Delgado R.** 2004. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacology Research* 50 (2): 143-149.
- Goetz P, Ghedira K.** 2012. Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. Dans: Phytothérapie anti-infectieuse, Collection Phytothérapie Pratique. Springer-Verlag France. pp. 193-208
- Goudable J, Favier A.** 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 11: 115-20.
- Guzik TG.** 2010. Functional Studies of NADPH Oxidases in Human Vasculature. Chapitre 8. Dans: Studies on Cardiovascular Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, Springer Science+Business Media, LLC. pp. 149-167.
- Hailu T, Endris M, Kaleab A, Tsige GM.** 2005. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 168-175.
- Harborne JB, Williams CA.** 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Pistelli L, Giorgi I.** 2012. Antimicrobial Properties of Flavonoids. Chapitre 2. Dietary Phytochemicals and Microbes, Springer Science+Business Media Dordrecht . pp. 33-91.
- Harmala P, Vuorela H, Tornquist K, Hiltunen R.** (1992). Choice of solvent in the extraction of *Angelica archangelica* roots with reference to calcium blocking activity. *Plant Medicine* 58(2): 176-183. Abstract
- Harzallah1 HJ, Neffati A, Skandrani I, Maaloul1 E, Chekir-Ghedira L, Mahjoub T.** 2010. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(19): 2048-2053.
- Hasani P, Yasa N, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Dehghan G, Abdollahi M.** 2007. *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharmaceutica* 57: 123-127.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ.** 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition Biochemistry* 13: 572-584.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M.** 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15: 639-652.

- Hendrich AB. 2006.** Flavonoïd-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica* 27(1): 27-40.
- Henzen C. 2003.** Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum médical suisse*, 19: 442-446.
- Hille R. 2010.** EPR studies of xanthine oxidoreductase and other molybdenum-containing hydroxylases. Dans: *Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR*. Springer Science and Business Media. pp. 91-120.
- Hsieh PC, Siegel SA, Rogers B, Davis D, Lewis K. 1998.** Bacteria lacking a multidrug pump: A sensitive tool for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95(12): 6602-6606.
- Hu ZQ, Zhao WH, Asano N, Yoda Y, Hara Y, Shimamura T. 2002.** Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 558-560.
- Huang J, Wang S, Zhu M, Chen J, Zhu X. 2011.** Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1943-1947.
- Jacquot JP, Dietz KJ, Rouhier N, Meux E, Lallement PA, Selles B, Hecker A. 2013.** Chapitre 8, Redox Regulation in Plants: Glutathione and “Redoxin” Related Families. Dans: *Oxidative Stress and Redox Regulation*, Springer Science+Business Media Dordrecht. pp. 213-291
- Jetanalin P, Lee SJ. 2013.** Gout. Chapitre 3. Dans: *Challenging Cases in Rheumatology and Diseases of the Immune System*, Springer Science+Business Media, LLC. pp. 35-53.
- Jouad H, Maghrani M, Eddouks M. 2002.** Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. In normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 351-356.
- Kang JY, Khan MNA, Park NH, Cho JY, Lee MC, Fujii H, Hong YK. 2007.** Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice, *Journal of Ethnopharmacology* 116: 187-190.
- Khelifi D, Hamdi M, El Hayouni A, Cazaux S, Souchard J.P, Couderc F, Bouajila J. (2011).** Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves. *Molecules* 16: 10592-10603.
- Kitagawa H, Sakamoto H, Tano Y. 2004.** Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52: 999-1001.
- Koechlin-Ramonatxo C. 2006.** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique* 20: 165-177.
- Kohen R, Nyska A. 2002.** Oxidation of Biological Systems. Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic pathology* 30(6): 620-650.

- Kong LD, Cai Y, Huang WW, Cheng CHK, Tan RX.** 2000. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 199-207.
- Kouri G, Tsimogiannis D, Bardouki H, Oreopoulou V.** 2007. Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 155-162.
- Kumaran A, Karunakaran JR.** 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *L.W.T Food Science and Technology* 40: 344-352.
- Kuruüzüm-uz A, Güvenalp Y, Kazaz C, L. Demirezer O.** (2013). Phenolic compounds from the roots of *Anchusa azurea* var. *Azurea*. *Turk J Pharm Sci* 10(2), 177-184.
- Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M.** 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale* 30: 1076-1081.
- Leporatti M, Ghedira k.** 2009. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *Journal of Ethnobiol ethnomed* 5-31.
- Li JM, Zhang X, Wang X, Xie YC, Kong LD.** 2011. Protective effects of cortex fraxini coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. *European Journal of Pharmacology* 666: 196-204.
- Li H, Cheng K.W, Wong C.C, Fan, K.W, Chen, F, Jiang Y.** 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry* 102: 771-776.
- Li R, Townsend CA.** 2006. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolism Engineering.*, 8: 240-252.
- Limbach S, Guiland JC.** 2007. Vitamines. Dans: *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. 2^{ème} éd. France: Springer- Verlag. pp. 127-143.
- Lin M, Chen CS, Chen CT, Liang Y, Lin J.** 2002. Molecular modeling of favonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294: 167-172.
- Little B.** 1984. *Encyclopaedia of Medicinal Plants* (Macdonald Encyclopedias). Broché. pp. 448.
- Liu X, Durham DG, Richards RME.** 2000. Baicalin synergy with β -lactam antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and other β -Lactam resistant strains of *S. aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52: 361-366.
- Livermore DM.** (1998). β -Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother* 41: 25-41.
- López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M.** 2006. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemical Biology Interaction* 161(1): 79-91.

- Lykkesfeldt J, Svendsen O.** 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173: 502-511.
- Maccarrone M.** 2008. Lipoxygenases, Apoptosis, and the Role of Antioxidants. Chapitre 20. Dans: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment, Springer Science +Business Media B.V. pp.321-332.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS.** 2005. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 25: 29.
- Madhuri V, Darshan SK, Kent LE.** 2008. Health Effects of Foods Rich in Polyphenols. chapitre 27. Dans: Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention. Humana Press Inc., Totowa. pp. 393-412
- Maiti SN, Kamalesh Babu RP, Shan R.** 2006. Overcoming bacterial resistance: role of β -lactamase inhibitors. Springer-Verlag . Berlin. pp.208-215.
- Malaviya R, Ansell J, Hall L, Fahmy M, Argentieri RL, Olini JGC, Pereira DW, Sur R, Cavender D.** 2006. Targeting cytosolic phospholipase A2 by arachidonyl trifluoromethyl ketone prevents chronic inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology* 539: 195-204.
- Manna C, D'angelo S, Migliardi V, Loffredi E, Mazzoni O, Morrica P, Galletti P, Zappia V.** 2002 Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 50: 6521-6526.
- García MJ.** 2005. ROS Generation, Antioxidants, and Cell Death. dans: Mitochondria and the Heart, Developments in Cardiovascular Medicine Volume 256 Springer Science +Business Media, Inc., USA. pp. 99-122
- Markham KR.** 1982. Techniques of flavonoid identification (Chapitre 1 et 2). London: *Academic Press*. pp. 1-113.
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I.** 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32: 595-603.
- Miwa S, Muller FL, Beckman KB.** 2008. The Basics of Oxidative Biochemistry. Dans: Oxidative Stress in Aging, Aging Medicine. pp. 11-35.
- Mo SF, Zhou F, Lv YZ, Hu QH, Zhang DM, Kong LD.** 2007. Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: structure-activity relationships. *Biology Pharmaceutical Bulletin* 30(8):1551-1556.
- Münzel T, Post F, Warnholtz A.** 2006. Smoking and Oxidative Stress: Vascular Damage Dans: Cigarette Smoke and Oxidative Stress, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany. pp. 339-364.
- Naidu MM, Shyamala BN, Naik JP, Sulochanamma G, Srinivas P.** 2011. Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* 44: 451-456.
- Newcombe DS.** 2013. Clinical Aspects of Gout and Associated Disease States. Chapitre 5. Dans: *Gout: Basic Science and Clinical Practice*. London. Springer-Verlag. pp. 91-159.

- Newcombe DS.** 2013. Uric Acid Metabolism in Humans. *Dans: Gout*, Springer-Verlag London. pp. 69-89.
- Newman DJ, Cragg GM.** 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Product* 70(3):461-77. "Abstract"
- Neyestani TR.** (2008). Polyphenols and Immunity. Chapitre 28. *Dans: Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 413-434
- Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli MA.** 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letter Applied Microbiology* 30: 379-384.
- O'Mahony JA, Fox PF, Kelly AL.** 2013. Indigenous Enzymes of Milk Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition, Springer Science+Business Media New York .pp. 337-385.
- Oduola T, Adeniyi F, Ogunyemi E, Bello I.S, Idowu T, Subair H.** 2007. Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in wistar albino rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 1(1): 001-004.
- Okuda T, Ito H.** 2011. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules* 16: 2191-2217
- Okuda, T.** 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66: 2012-2031.
- Omulokoli E , Khan B, Chhabra SC.** 1997. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology* 56: 133-137.
- Orban JC, Sibon S, Ichai C.** 2007. Ischémie/reperfusion, stress oxydant, préconditionnement et insuffisance rénale aiguë. *Dans: L'insuffisance rénale aiguë, Le point sur ...* Springer-Verlag France, pp. 85-105.
- Osada Y, Tsuchimoto M, Fukushima H, Takahashi K, Kondo S, Hasegawa M, Komoriya K.** 1993. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents. *European Journal Pharmacology* 241, 183-188. "Abstract".
- Page MGP.** 2012. Beta-lactam antibiotics. Chapitre 3. *Dans: Antibiotic Discovery and Development*, Springer Science+Business Media, LLC. pp.79-111.
- Parekh J, Nair R, Chanda S.** 2005. Preliminary screening of some folklore medicinal plants from western India for potential antimicrobial activity. *Indian Journal of Pharmacology* 37: 408-409."Abstract".
- Palaniappan K, Holley RA.** 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 140: 164-168.
- Payne DNR, Adcock IM.** 2001. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatric Respiratory Reviews* 2: 145-150.

- Pistelli L, Giorgi I.** 2012. Antimicrobial Properties of Flavonoids. Chapitre 2. Dans: Dietary Phytochemicals and Microbes, Springer Science+Business Media Dordrecht. pp. 33-91.
- Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, šolmajer T, Jerala R.** 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306: 530-536.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F.** 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3369-3402.
- Quezel P, Santa S.** 1963. Nouvelle flore de l'Algerie et des régions desertiques méridionales, Tome II, Centre National de la Recherche Scientifique. 797-860.
- Quiney C, Finnegan S, Groeger G, Cotter TG.** 2011. Protein Oxidation Chapitre 3. Dans: Post-Translational Modifications in Health and Disease Protein Reviews. Volume 13, pp. 57-78.
- Rahal K.** 2005. Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4^{ème} édition, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.
- Rojas A, Hernandez, Pereda-Miranda R, Mata R.** 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 35: 275-283.
- Rong-Dih L, Yi-Ping C, Mei-Hsien L.** 2005. Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytotherapy Research* 19: (7) 612-617.
- Sandalio LM, Rodriguez-serrano M, Romero-puertas M, Ddel rio L.** 2013. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ros) signaling molecules. Chapitre 13. Dans: peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism, subcellular biochemistry. springer scienceec business media dordrecht. pp. 233-249
- Sandanayaka VP, Prashad AS.** 2002. Resistance to β -Lactam Antibiotics: Structure and Mechanism Based Design of β -Lactamase Inhibitors. *Current Medical Chemistry* 9: 1145-1165.
- Sastre J, Federico V, Pallardo JV.** 2005. Glutathione. Partie: O, Vol. 2. Dans: The Handbook of Environmental Chemistry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 91-108.
- Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Iinuma M, Tosa H, Ohkawa Y.** 1996. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *journal of Ethnopharmacology* 54:171-176.
- Schnackenberg CG.** 2002. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 282 (2): 335-342.
- Seib KL, Wu HJ, Kidd SP, Apicella MA, Jennings MP, McEwan AG.** 2006. Defenses against Oxidative Stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a System Tailored for a Challenging Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (2): 344-361.

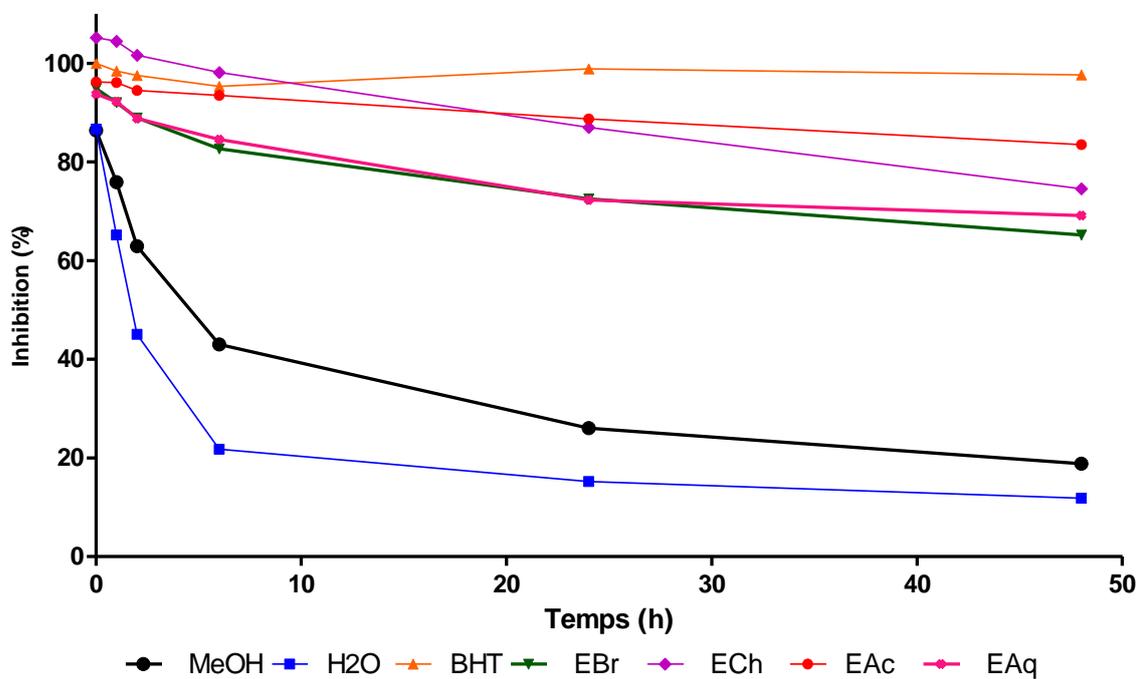
- Shankar Sh, Singh BN., Srivastava RK.** 2012. Plant Polyphenols and Their Role in Cancer Prevention and Chemotherapy. Chapitre 10. Dans: Nutrition, Diet and Cancer, Springer Science Business Media B.V. pp. 209-233.
- Shi-Fu M, Feng Z, Yao-Zhong LV, Qing-Hua H, Dong-Mei Z, Ling-Dong K.** 2007. Hypouricemic Action of Selected Flavonoids in Mice: Structure–Activity Relationships. *Biology Pharmaceutical Bulletin* 30(8): 1551-1556.
- Shimizu M, Shiota S, Mizushima T, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Tsuchiya T.** 2001. Marked potentiation of activity of β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 3198-3201.
- Shiota S, Shimizu M, Mizusima T, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Tsuchiya T.** 2000. Restoration of effectiveness of β -lactams on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by tellimagrandin I from rose red. *FEMS Microbiology Letters* 185: 135-138.
- Skim F, Kaaya A, Jaouhari J.T, Lazrek H.B, Jana M, El Amri H.** 1999. Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. *Fitoterapia*. 70: 382-389
- Stapleton PD, Gettert J, Taylor PW.** 2006. Epicatechin gallate, a component of green tea, reduces halotolerance in *Staphylococcus aureus*. *The International Journal of Food Microbiology* 111: 276–279.
- Stocker P, Lesgards J, Vidal N, Chalier F, Prost M.** 2003. ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1621: 1-8.
- Su X, Duan J, Jian Y, Shi J and Kakuda Y.** 2006. Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *J Food Composition Anal* 19: 348-353.
- Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M.** 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry* 102: 938-953.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommesa J.** 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113:1226-1233.
- Takebayashi J, Chen J, Tai A.** 2010. A Method for Evaluation of Antioxidant Activity Based on Inhibition of Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. D. Armstrong (ed.), *Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology*, vol. 594. pp. 287-296.
- Tanumihardjo SA.** 2013. Carotenoids and Human Health. Humana Press, Springer. USA.
- Taylor PW.** 2013. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents* 42:195-201.
- Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K.** 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46(10): 3133-3141.
- Tim Cushnie TP, Lamb AJ.** 2005. Antimicrobial activity of flavonoïds. *International Journal. Antimicrobial Agents* 26: 343-356.

- Tim Cushnie TP, Lamb AJ.** 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38: 99-107.
- Touyz RM, Chignalia A, Sedeek M.** 2010. Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress, and Hypertension. Chapitre 15. Dans: *Studies on Cardiovascular Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*, Springer Science+Business Media, LLC . pp. 281-315.
- Tsimogiannis DI, Oreopoulou V.** 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7: 140-146.
- Tung YT, Chang ST.** 2010. Inhibition of xanthine oxidase by *Acacia confusa* extracts and their phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 781-786
- Umamaheswari M, Asokkumar K, Sivashanmugam AT, Remyaraju A, Subhadradevi V, Ravi TK.** 2009. *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology* 124: 646-648.
- Unno T, Sugimoto A, Kakuda T.** 2004. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 391-395.
- Van Hoorn DEC, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PAM, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DBA, Van Norren K.** 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology* 451: 111-118.
- Vasson MP, Reimund JM.** 2007. Nutrition, immunité et inflammation. Chapitre 34. Dans: *Traité de nutrition artificielle de l'adulte 3^{ème} édition*, France. pp. 456-476.
- Vonkeman HE, Braakman-Jansen LM, Klok RM, Postma MJ, Brouwers JR, van de Laar MA.** 2008. Incremental cost effectiveness of proton pump inhibitors for the prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug ulcers: a pharmaco-economic analysis linked to a case-control study. *Arthritis Research Therapy* 10(6): 1-7.
- Warner DS, Sheng H, Batinié-Haberle I.** 2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *Journal of Experiment Biology* 207: 3221-3231.
- Wagner H.** (2011). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 82: 34-37.
- Wong CC, Li HB, Cheng KW, Chen F.** 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry* 97: 705-711.
- Wu N, Zu Y, Fu Y, Kong Y, Zhao J, Li X, Li J, Wink M, Efferth T.** 2010. Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of extracts and main polyphenolic compounds obtained from *Geranium sibiricum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4737-4743.
- Wu PJ, Shannon K, Phillips I.** 1995. Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 β -actamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 36: 927-939.

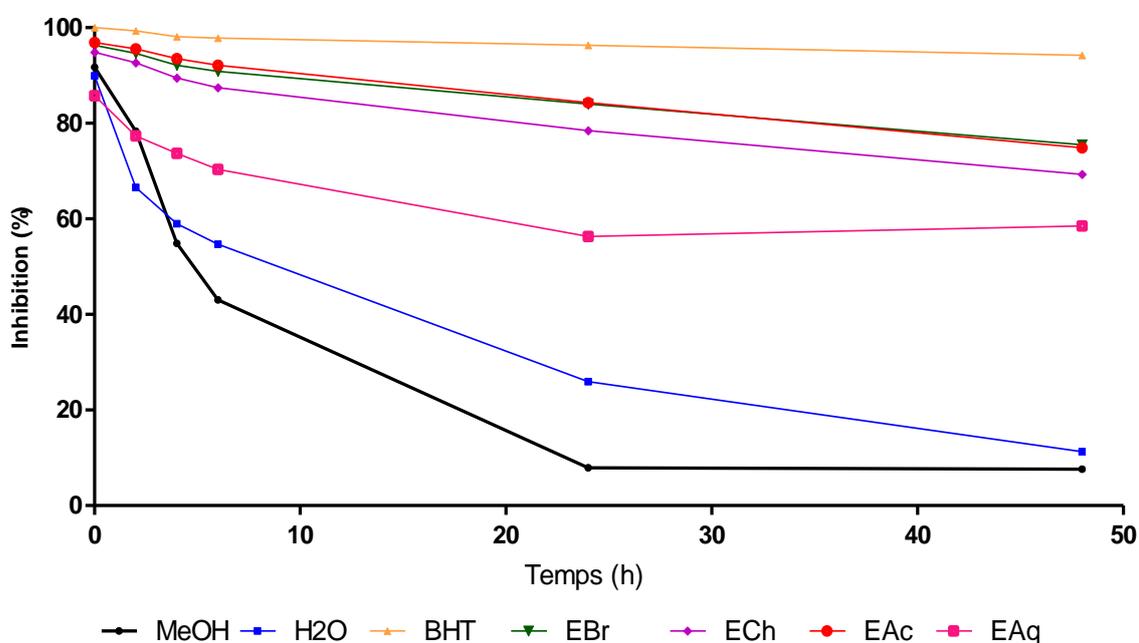
- Yang X, Li J, Li X, She R, Pei Y.** 2006. Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. *Peptides* 27: 3122-3128.
- Yang Y, Niu Y, Le Y, Ma X, Qiao CH.** 2010. Beta-lactamase inhibitory component from the roots of *Fissistigma cavaleriei*. *Phytomedicine* 17 : 139-141.
- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Toma S-Barbera FA, Datta NN, Singanusong R, Chen SS.** 2004. Flavonoïde in food and their health benefits. *Plant Foods and Human Nutrition* 59: 113-122.
- Yeum KJ, Aldini G, Russell RM, Krinsky NI.** 2009. Antioxidant/Pro-oxidant Actions of Carotenoids. Chapitre 12. Dans: Nutrition and Health Volume 5: Birkhauser Verlag Basel. pp. 235-268.
- Yoneyama H, Katsumata R.** 2006. Antibiotic resistance in bacteria and Its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70(5): 1060-1075.
- Yu Z, Fong WP, Cheng CHK.** The Dual Actions of Morin (3,5,7,2,4_ Pentahydroxyflavone) as a Hypouricemic Agent: Uricosuric Effect and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 316(1): 169-175.
- Zelek L, Latino-Martel P, Pecollo N, Barrandon E, Czernichow S, Galan P, Hercberg S.** 2010. Vitamines et micronutriments. dans: Aider á vivre après un cancer Oncologie pratique. Paris: Springer-Verlag. pp. 277-282.
- Zhao WH, Hu YQ, Hara Y, Shimamura T.** 2002. Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. pp. 2266–2268
- Zhu JX, Wang Y, Kong LD, Yang C, Zhang X.** 2004. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 133-140.
- Zweier J.L, Hassan, Talukder M.A.** 2006. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 70(2): 181-190.

Annexes

Annexe 1

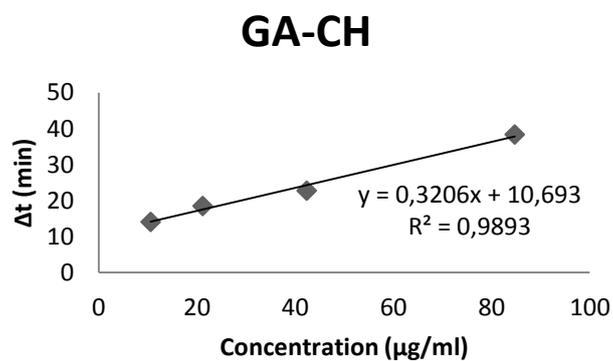
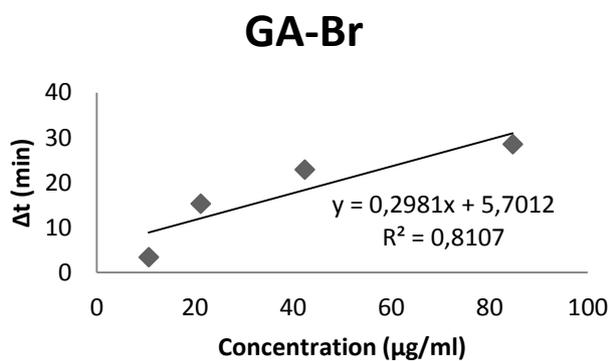
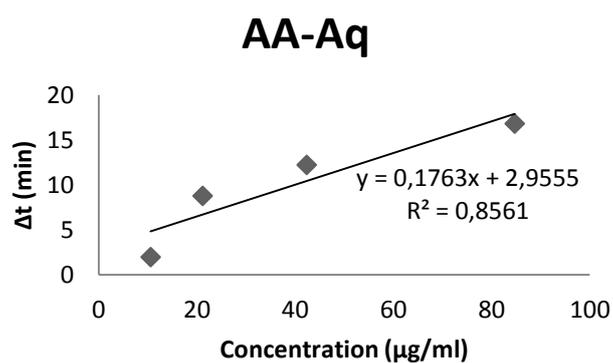
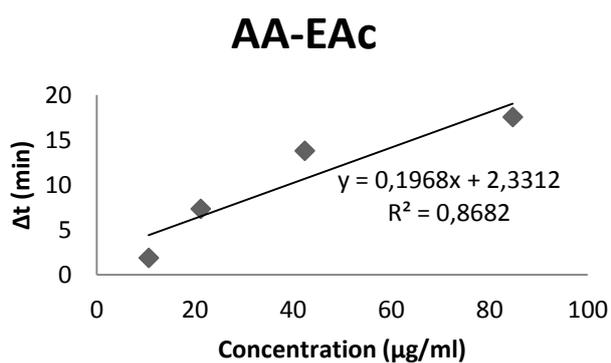
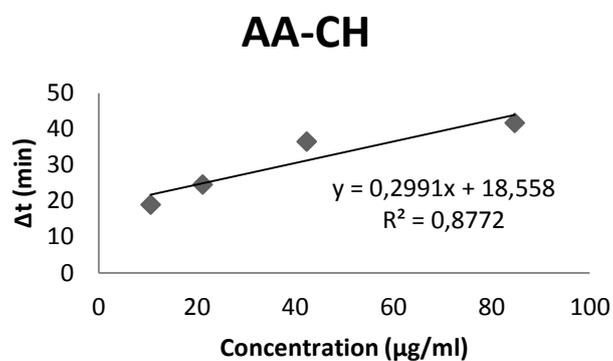
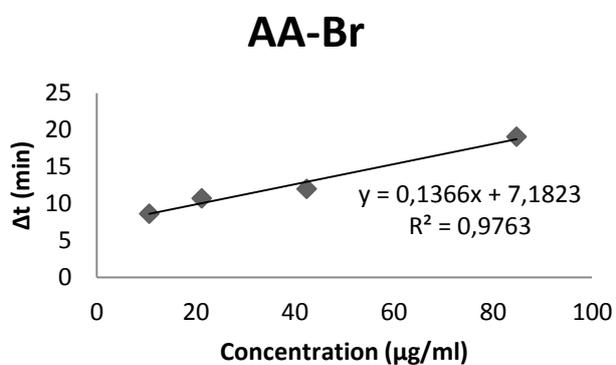


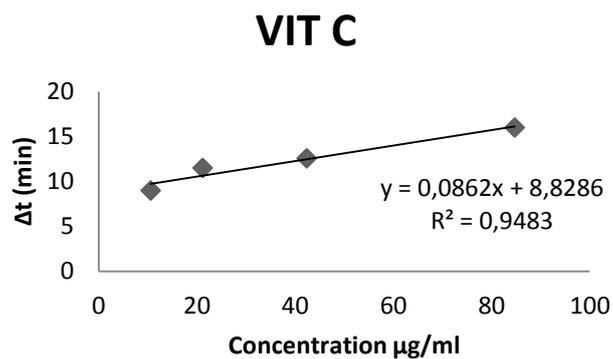
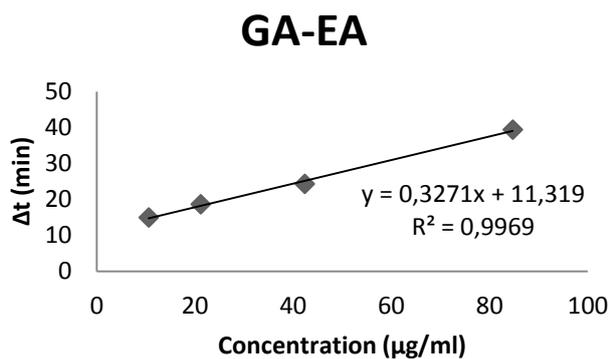
Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits d'*Anchusa azurea*. et du BHT (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de trois essais).



Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de *Globularia alypum* et du BHT (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de trois essais).

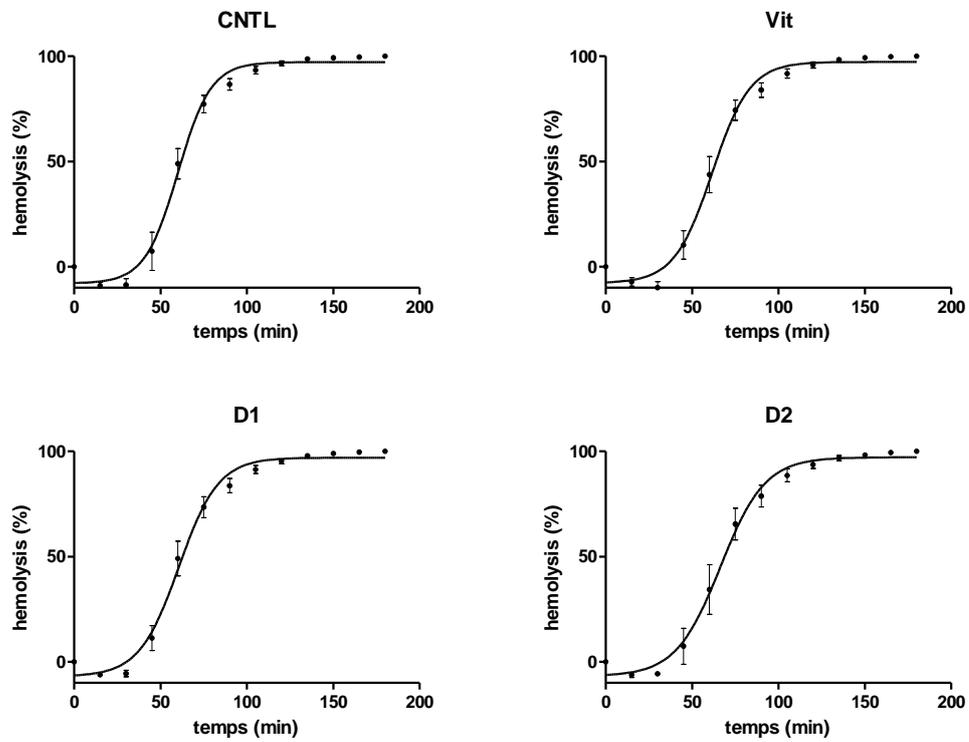
Annexe 2



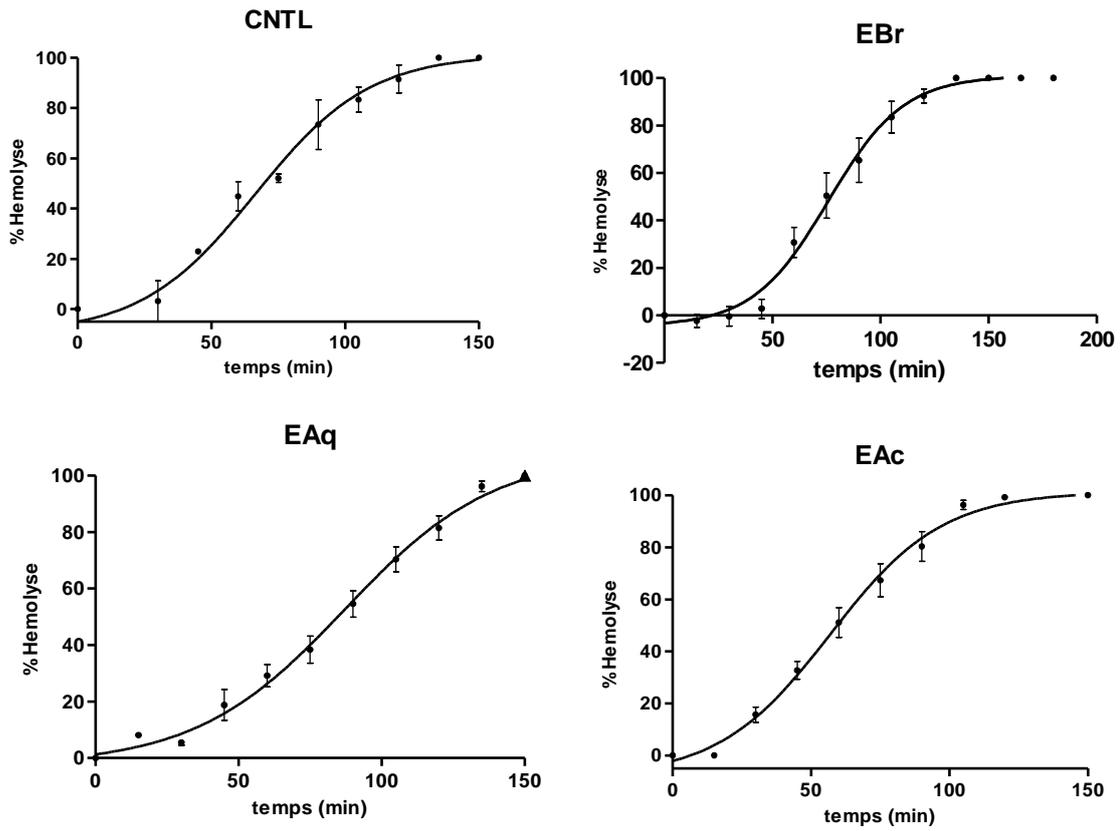


Relation entre la valeur Δt et la concentration des extraits d'*Anchusa azurea*, *Globularia alypum* et Vit C. la suspension érythrocytaire est incubée avec T-BHP en présence d'extraits (10.59, 21.18, 42.37 et 84.74 $\mu\text{g/ml}$) à 37 °C, (HT_{50}) témoin= $56,01 \pm 5,93$.

Annexe 3



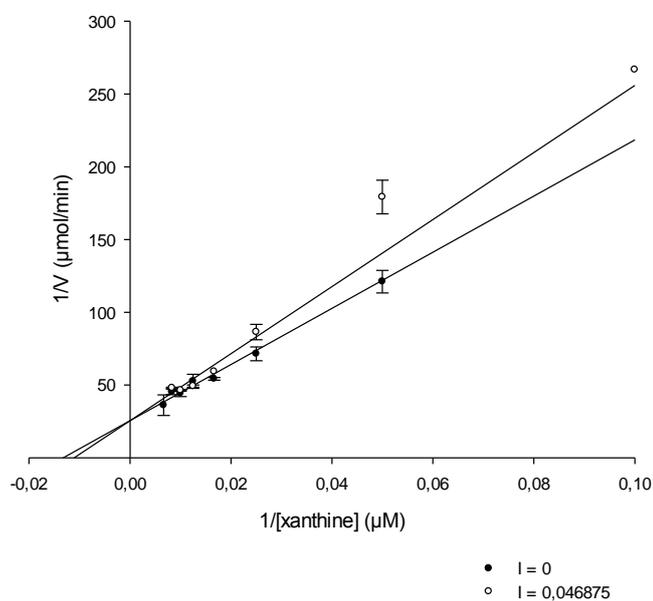
Cinétique de la lyse érythrocytaire en présence de T-BHP pour les différents groupes traités par *Anchusa azurea*.



Cinétique de la lyse érythrocytaire en présence de T-BHP pour les différents groupes traités par *Globularia alypum*.

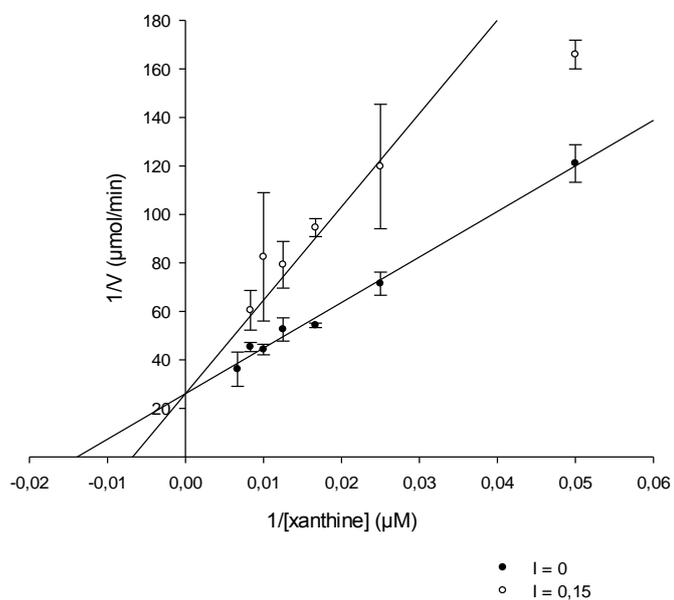
Annexe 4

Lineweaver-Burk



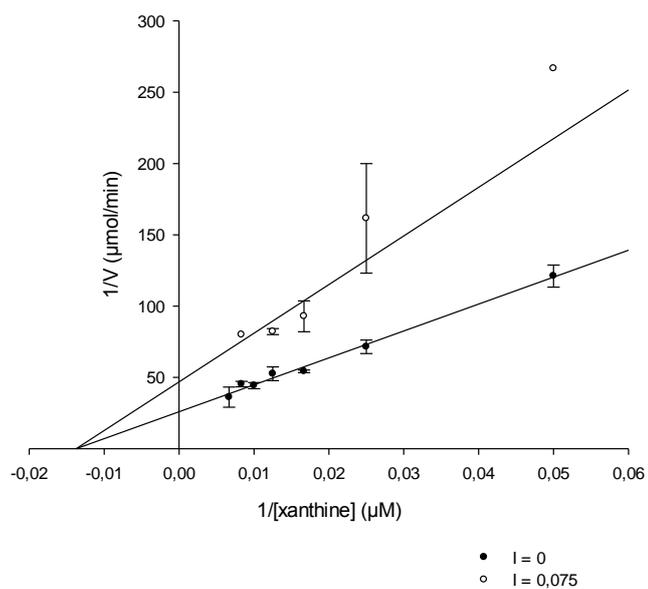
Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'EBr-GA.

Lineweaver-Burk



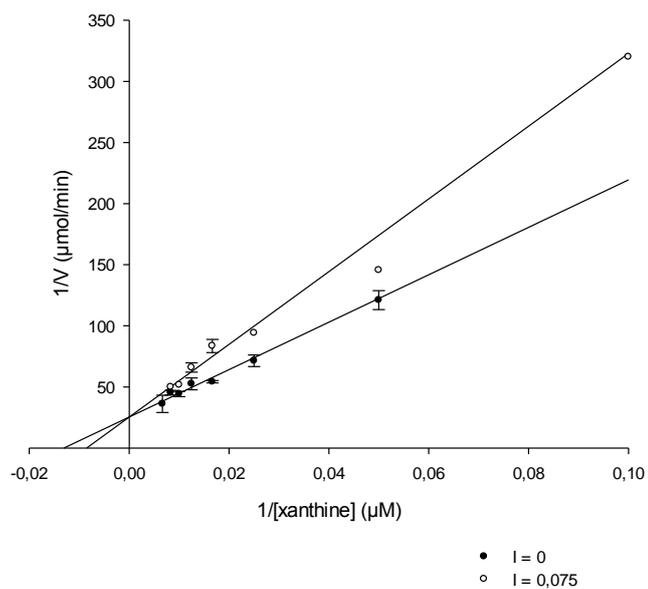
Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'ECh-GA.

Lineweaver-Burk



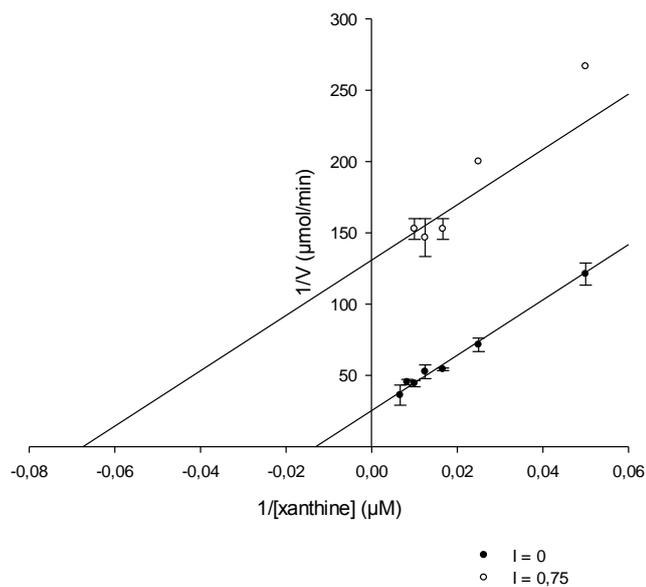
Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'EAc-GA.

Lineweaver-Burk



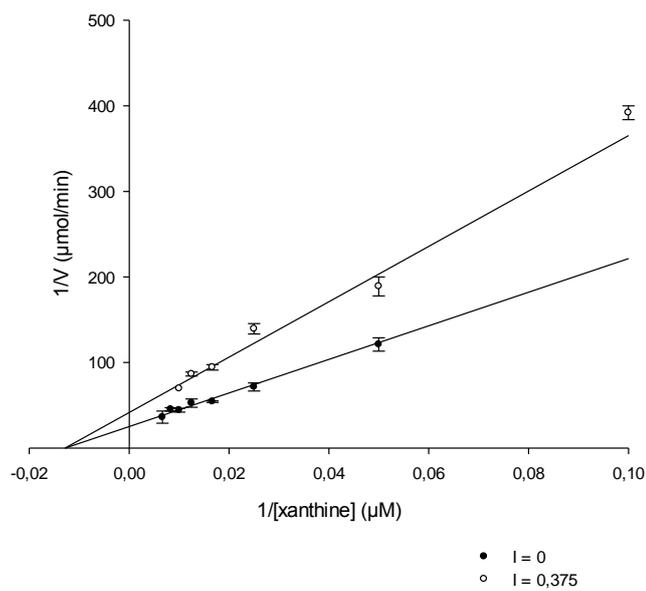
Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'EAq-GA.

Lineweaver-Burk

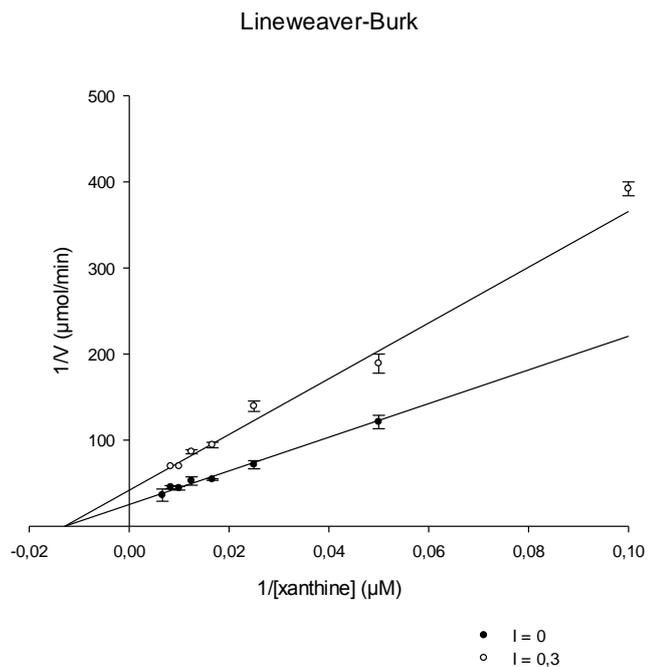


Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'EBr-AA.

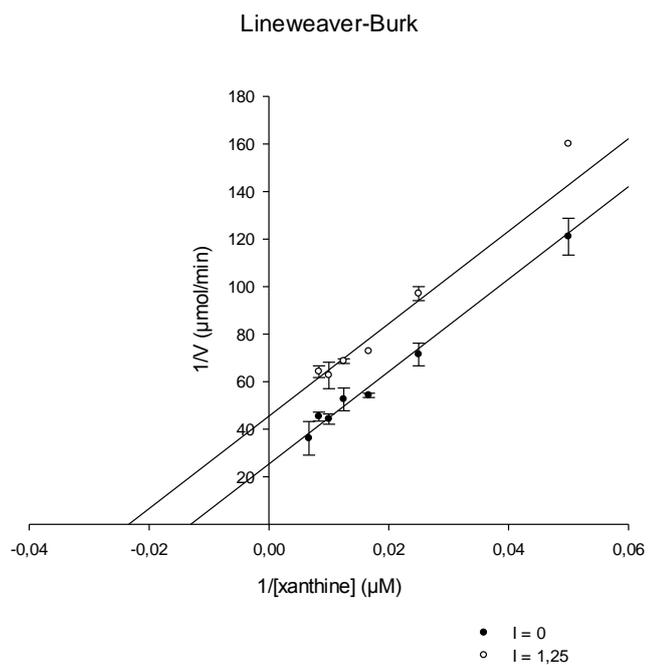
Lineweaver-Burk



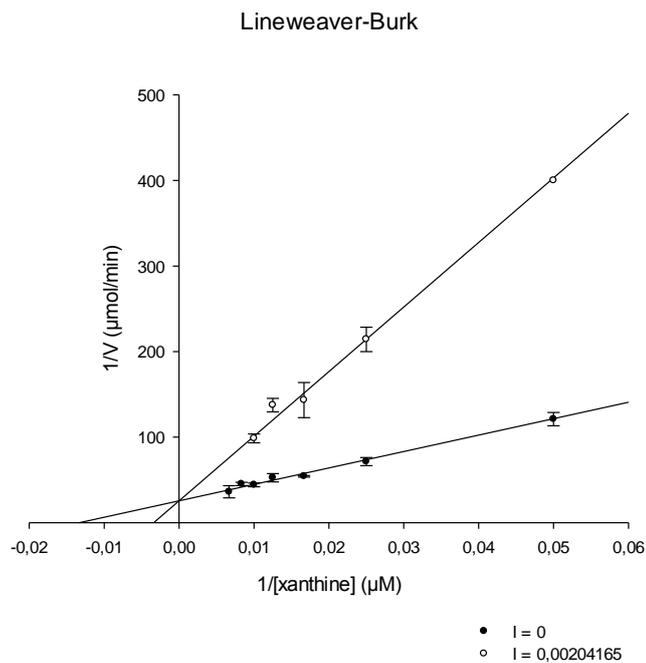
Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'ECh-AA.



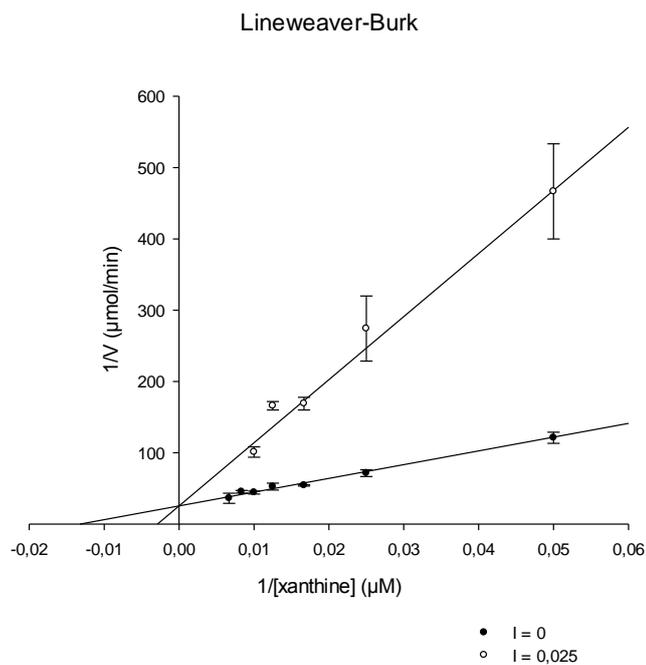
Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'EAc-AA.



Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'EAq-AA.



Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de d'allopurinol.



Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de la quercétine.