



DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2014

MÉMOIRE

Présenté par

LAOUICHA Saliha

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER EN BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Effets anti-inflammatoire, antioxydant et antibactérien des
extraits aqueux et méthanolique de *Plantago lanceolata* L.**

Soutenue publiquement le/...../2014

DEVANT LE JURY

Président	Bouriche Hamama	Pr UFA Sétif 1
Directeur	Senator Abderrahmane	Pr UFA Sétif 1
Examineurs	Zerroug Mohamed Mihoub	Pr UFA Sétif 1
	Bouamra Dalila	Dr UFA Sétif 1

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Dédicace

*En guise de reconnaissance envers mon **DIEU** le **Tout Puissant***

Je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique

Espérant qu'il lui sera utile.

Remerciements

Louange à DIEU, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux de m'avoir aidé à finir ce modeste travail de recherche.

*Je remercie vivement le Directeur de ma thèse le **Pr. SENATOR Abderrahmane**, qui m'a fait l'honneur de me proposer ce sujet et de m'a faire accepter de rapporter ce travail. Je tiens surtout à vous remercier pour vos conseils qui m'ont été de grande utilité.*

*Je remercie infiniment le **Pr. BOURICHE Hamama**, pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance de ce mémoire. En la remerciant pour toutes les observations qu'elle voudra bien formuler sur ce travail, je la prie de recevoir mes sentiments les plus respectueux*

*Les remerciements vont aussi aux membres du jury le **Pr. ZERROUG Mohamed Mihoub** et le **Dr BOUAMRA Dalila** pour leur présence nécessaire et utile au sein du jury.*

*Je n'oublie pas de remercier vivement les membres de l'équipe laborantine, en particulier **KADA Seoussen**, **MESSAOUDI Dalila** et **KARNOUF Nassima** pour leur aide et soutien morale ainsi que mon collègue **KHERBECHE Abdellah** qui a partagé avec moi la vie quotidienne au sein du laboratoire.*

*J'aimerais également remercier **M^{elle} BOUSSOUALIM Naouel** pour son aide, ainsi que pour les précieux conseils qu'il a bien voulu me transmettre à chacune de nos rencontres.*

*Finalement je remercie mes très **chers parents**, mes **soeurs** et mes **frères** de leur soutien, ainsi que tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans ma tâche.*

Abstract

The present study was devoted to evaluate the *in vitro* antioxidant and antibacterial properties, the *in vivo* anti-inflammatory activities of the aqueous (Aq. E) and methanolic (Met. E) extracts of the aerial part of *Plantago lanceolata* L. The obtained results showed that methanolic extract is richer on total polyphenols, flavonoids and tannins. The orally pretreatment of rats with 200 or 400 mg/kg of Aq. E, prevents significantly the paw edema induced by λ carrageenan from the 4th hour with an inhibition percent of 82 % and 84 % respectively. These effects are higher than that of the Met. E but similar to those of aspirin used as an anti-inflammatory standard. On the other hand, the local treatment of mice with 2 mg/ear of Aq. E or Met. E, inhibited ear inflammation induced by croton oil with 77% and 89% respectively. These values are better than those obtained with indomethacin used as reference. The antioxidant potential of the two extracts was evaluated using the DPPH test, the metal chelating assay and reducing power tests. Compared to the synthetic antioxidant BHT, both extracts exhibited high antiradical activity against the free radical DPPH, with IC₅₀ of 38.94 ± 0.83 and 66.44 ± 1.04 $\mu\text{g/ml}$ for Aq. E. and Met. E respectively. The Aq. E and Met. E have also, a good chelating activity with EC₅₀ of 53.61 ± 1.51 and 105.78 ± 14.56 mg/ml respectively. These values are lower than that of standard chelator (EDTA). Both extracts showed a good concentration dependent reducing power. The antibacterial effect of Aq. E and Met. E was determined by agar diffusion assay toward ten bacterial strains. The obtained results revealed that Aq. E has the broadest spectrum of activity because it inhibited the growth of 4 strains (*Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 and *Bacillus cereus* ATCC 10876) causing inhibition zones of 8-22 mm. While Met. E inhibited the growth of 3 strains (*Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 and *Proteus mirabilis* ATCC 35659) with inhibition zones of 8-17 mm. In conclusion, aqueous and methanolic extracts of aerial parts of *Plantago lanceolata* L. have anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial activities which supports the traditional medicinal use of this plant.

Key words: Oxidative stress, antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, *Plantago lanceolata*

الملخص

تم في هذه الدراسة تقدير الفعالية المضادة للالتهاب في الحي وكذلك الفعالية المضادة للأوكسدة و للبكتيريا في الأنبوب للمستخلص المائي و الميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Plantago lanceolata L.* أظهر التقدير الكمي للمركبات الفينولية أن المستخلص الميثانولي يحتوي على أعلى كمية من الفينول الكلي ، الفلافونويدات ومن الدباغ. تمت دراسة النشاطية المضادة للالتهاب باستعمال اختبارين أحدهما وذمة الرجل المحفزة ب carragénine λ ، و الآخر وذمة الاذن المحفزة بزيت croton. اظهرت المعالجة المسبقة للجرذان ب 200 او 400 مغ/كغ من المستخلص المائي قدرة معتبرة في الحماية من انتفاخ الرجل ابتداء من الساعة الرابعة بعد إحداث الالتهاب بنسب 82% و 84% على التوالي. تعتبر هذه التأثيرات موافقة لتلك المحدثه بمضاد الالتهاب المرجعي (الأسبرين). التأثير المضاد للالتهاب للمستخلص الميثانولي و على الرغم من انه معتبر إلا أنه يبقى منخفضا مقارنة بتأثير المستخلص المائي. من جهة أخرى أظهرت المعالجة الموضوعية للفئران ب 2 مغ/للأذن من المستخلص المائي و الميثانولي تثبيط لالتهاب الأذن بنسب 77% و 89% على الترتيب. هاته القيم تعتبر أعلى من تلك المحصل عليها مع مضاد الالتهاب المرجعي Indométhacine. تم تقييم القدرة المضادة للأوكسدة للمستخلصين باستعمال كل من اختبار DPPH واستحلاب المعادن و كذلك اختبار القدرة على الإرجاع. بينت المقارنة بمضاد الأوكسدة المرجعي (BHT) أن المستخلص المائي و الكحولي أبديا قدرة عالية لإزاحة جذر DPPH ب قيم IC_{50} تقدر ب $0,83 \pm 38,94$ و $1,04 \pm 66,44$ ميكروغرام/مل على التوالي. كما أظهر كل من المستخلص المائي و الميثانولي أيضا قدرة لا بأس بها على أستحلاب المعادن ب قيم ل EC_{50} تقدر ب $1,51 \pm 53,61$ و $14,56 \pm 105,78$ ميكروغرام /مل على الترتيب. هاته القدرات تبقى منخفضة نسبيا مقارنة ب EDTA. كما أبديا أيضا قدرة لا بأس بها على الإرجاع و هي متعلقة بالتركيز. كما تم تحديد الفعل المضاد للبكتيريا على 10 سلالات بكتيرية وقد أظهرت النتائج أن المستخلص المائي يثبط 4 سلالات (*Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis* ATCC 35659) و 3 سلالات (*Bacillus cereus* ATCC 10876 و *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 و *Listeria* ATCC 27853) مساحات تثبيط تراوحت بين 8 و 22 ملم، في حين ان المستخلص الميثانولي لم يثبط سوى 3 سلالات (*Listeria* ATCC 35659) و ذلك بمساحات تثبيط تتراوح من 8 إلى 17 ملم. كخلاصة يمكن القول ان هذه الفعاليات التي ابدتها كل من المستخلصين المائي والكحولي لنبته *Plantago lanceolata L.* تدعم بقوة استخدامها في الطب التقليدي.

الكلمات المفاتيح : الاجهاد التأكسدي، مضاد للأوكسدة، مضاد للالتهابات، مضاد بكتيري، *Plantago lanceolata*

Résumé

Les propriétés antioxydantes et antibactériennes *in vitro* et anti-inflammatoires *in vivo* de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E Met) de la partie aérienne de *Plantago lanceolata* L. ont été évaluées dans la présente étude. Les dosages ont montré que l'E. Met est plus riche en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins. Le prétraitement par voie orale des rats par 200 ou 400 mg/kg d'E. Aq prévient de façon significative l'œdème de la patte induit par la carragénine à partir de la 4^{ème} heure avec 82% et 84% d'inhibition respectivement. Ces effets sont supérieurs à ceux de l'E. Met mais très proches de ceux de l'aspirine utilisée comme anti-inflammatoire de référence. D'une autre part, le traitement local des souris par 2 mg/oreille d'E. Aq ou Met a inhibé l'inflammation induite par l'huile de croton avec 77% et 89% respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues avec l'indométacine utilisée comme produit de référence. Le potentiel antioxydant des deux extraits a été évalué en utilisant les tests de DPPH, la chélation des métaux et le pouvoir réducteur. En comparaison avec l'antioxydant de synthèse (BHT), les deux extraits ont exhibé une forte activité antiradicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH avec des IC₅₀ de 38.94 ± 0,83 et de 66,44 ± 1.04 µg/ml pour l'E. Aq et l'E. Met respectivement. Ces extraits ont donné aussi une bonne activité chélatrice avec des EC₅₀ de 53.61±1.51 et de 105.78 ± 14.56 µg/ml respectivement. Cette activité demeure plus faible que celle de l'EDTA. De même, les deux extraits ont présenté un bon pouvoir réducteur concentration dépendant. L'effet antibactérien des deux extraits a été déterminé sur 10 souches bactériennes par la méthode de diffusion sur l'agar. L'E. Aq possède le spectre d'activité le plus large du fait qu'il a inhibé la croissance de 4 souches (*Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Bacillus cereus* ATCC 10876) avec des zones d'inhibition allant de 8 à 22 mm. Tandis que l'E. Met n'était actif que sur 3 souches seulement (*Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Proteus mirabilis* ATCC 35659) avec des zones d'inhibition de 8 à 17 mm. En conclusion, les extraits aqueux et méthanolique de *Plantago lanceolata* L. ont des effets anti-inflammatoire, antioxydant et antimicrobien qui supportent l'usage de cette plante en médecine traditionnelle.

Mots clés: Stress oxydant, antioxydant, anti-inflammatoire, antibactérien, *Plantago lanceolata*

Liste des Abréviations

AINS	: Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	: Anti-inflammatoires stéroïdiens
ATCC	: American Type Culture Collection
CAT	: Catalase
CMC	: Carboxy méthyl cellulose
COX	: Cyclooxygenase
ERA	: Espèces réactives azotées
ERO	: Espèces réactives oxygénées
GPx	: Glutathion peroxydase
HNE	: 4- hydroxy nonenal
IL	: Interleukine
LDL	: Light Density Lipoprotein
LO	: Lipooxygénases
MDA	: Malondialdéhyde
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NF-κB	: Nuclear factor-kappa B
NOS	: Oxyde nitrique synthase
P38 MAPK	: Mitogen-activated protein kinases
PAF	: Platelet Activating Factor
PKC	: Protéine Kinase C
PGH2	: Prostaglandine H2
PMNs	: Polymorphonucléaires neutrophiles
SOD	: Superoxyde dismutase
TNF-α	: Facteur de nécrose tumorale
TPA	: 12-O-tetradecanoyl phorbol acetate
XO	: Xanthine Oxydase
LTB4	: Leucotriène B4

Liste des figures

- Figure 1.** Diagramme général de la réaction inflammatoire.
- Figure 2.** Phase précoce du processus inflammatoire suite à une infection.
- Figure 3.** La phase d'initiation.
- Figure 4.** Inhibition des cyclo-oxygénases par l'aspirine et les AINS.
- Figure 5.** Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.
- Figure 6.** Espèces réactives de l'azote et de l'oxygène intervenant dans le phénomène de stress oxydant.
- Figure 7.** Sources endogènes d'espèces réactives oxygénées.
- Figure 8.** Implication de la xanthine oxydase dans la production de peroxynitrite.
- Figure 9.** Cibles biologiques et dommages oxydatifs induits par les ROS.
- Figure 10.** Principales circonstances pathologiques s'accompagnant le stress oxydant.
- Figure 11.** Mécanisme de détoxification enzymatique des espèces oxygénées réactives
- Figure 12.** Mécanisme probable de l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines à faible densité par la vitamine C et la vitamine E.
- Figure 13.** Effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres.
- Figure 14.** Sites probables de la fixation de Fe^{3+} aux cycles A et C des flavonoles.
- Figure 15.** Principales stratégies mises par les bactéries pour résister à l'action des antibiotiques.
- Figure 16.** Photographie de *Plantago lanceolata*.
- Figure 17.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.
- Figure 18.** Droite d'étalonnage de la quercétine.
- Figure 19.** Droite d'étalonnage de l'acide tannique.
- Figure 20.** La forme radicalaire et la forme réduite de DPPH.
- Figure 21.** Effet de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de la partie aérienne de *P. lanceolata* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.

Figure 22. Effet de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de la partie aérienne de *P. lanceolata* sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.

Figure 23. Effet de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de *P. lanceolata* sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat 4 heures après l'induction.

Figure 24. Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de la partie aérienne de *P. lanceolata* et du BHT vis-à-vis du radical DPPH.

Figure 25. Activités chélatrices de l'extrait aqueux, E. Aq et métanolique, E. Met de la partie aérienne de *P. lanceolata* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux, exprimée en pourcentage de chélation.

Figure 26. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *P. lanceolata* et du BHT

Figure 27. Photographies des zones d'inhibition de la croissance bactérienne de quelques souches induites par l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *P. lanceolata*.

Liste des tableaux

Tableau 1. Espèces réactives de l'oxygène.

Tableau 2. Mécanismes d'action des antibiotiques.

Tableau 3. Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne.

Tableau 4. Teneur des extraits aqueux et méthanolique de *P. lanceolata* en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins.

Tableau 5. Valeurs des IC₅₀ des extraits de *P. lanceolata* et de BHT.

Tableau 6. Valeurs EC₅₀ et l'activité chélatrice en termes d'équivalents d'EDTA des extraits de *P. lanceolata* et de l'EDTA.

Tableau 7. Les EC₅₀ des extraits de *P. lanceolata* et du BHT.

Tableau 8. Zones d'inhibition de la croissance bactérienne induite par les extraits aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de *P. lanceolata* et par l'Amoxicilline.

SOMMAIRE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	
Erreur ! Signet non défini.	
I. INFLAMMATION	3
I.1. Inflammation aigue.....	3
I.1.1. Phase vasculaire.....	5
I.1.2. Phase cellulaire.....	6
I.1.3. Phase de résolution.....	7
I.2. Inflammation chronique.....	7
I.3. Médiateurs de l'inflammation.....	8
I.4. Anti-inflammatoires.....	9
I.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	9
I.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	11
I.4.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	11
II. LE STRESS OXYDANT	12
II.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	12
II.1.1. Principales Espèces réactives de l'oxygène.....	14
II.1.2. Principales sources des espèces réactives oxygénées.....	15
II. 2. Conséquences biologiques du stress oxydant.....	18
II. 3. Implications pathologiques du stress oxydant.....	20
II. 4. Antioxydants.....	21
II. 4.1. Antioxydants endogènes.....	21
II.4.2. Antioxydants exogènes.....	22
II.4.3. Autres antioxydants.....	24
III. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	26
III.1. Antibiotiques et leurs modes d'action.....	26
III. 2. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	26
III. 3. Antimicrobiens naturels.....	29
III. 3. 1. Polyphénols.....	29
IV. PLANTAGO LANCEOLATA L.	33
IV.1. Classification botanique de <i>Plantago lanceolata</i>	33
IV.2. Aspect botanique de <i>Plantago lanceolata</i>	33

IV.3. Composition chimique.....	34
IV.4. Propriétés biologiques	34
IV.5. Usage traditionnel.....	35

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES	37
I. Matériel.....	37
I.1. Matériel végétal	37
I.2. Animaux.....	37
I.3. Bactéries.....	37
I.4. Réactifs	37
I.5. Solutions de travail	38
II. Méthodes	39
II.1. Extraction.....	39
II.2. Dosage des polyphénols totaux	39
II.3. Dosage des flavonoïdes	39
II.4. Dosage des tannins	40
II.5. Activité anti-inflammatoire	40
II.6. Activité antioxydante.....	42
II.7. Activité antibactérienne.....	44
II.8. Analyses statistiques.....	44
RESULTATS ET DISCUSSION.....	46
RESULTATS.....	46
I. Préparation des extraits, dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins	46
II. Activité anti-inflammatoire des extraits de <i>Plantago lanceolata</i>	46
III. Activité antioxydante des extraits de <i>Plantago lanceolata</i>	50
IV. Activité antibactérienne	55
DISCUSSION.....	57
I. Préparation des extraits de <i>P. lanceolata</i>	57
II. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins.....	58
III. Activité anti-inflammatoire des extraits de <i>P. lanceolata</i>	59
IV. Activité antioxydante des extraits de <i>P. lanceolata</i>	61
V. Activité antibactérienne.....	65
Conclusion et perspectives.....	67
Références bibliographiques.....	68

INTRODUCTION

L'inflammation est une réaction normale du corps suite à un traumatisme, une infection ou une attaque par un corps étranger, elle intervient dans une multitude de circonstances et de maladies dont l'expression clinique et la gravité sont très variées. De même, le stress oxydant qui est généré par le déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et les antioxydants, au profit des premiers est aussi impliqué dans de nombreuses pathologies. La supplémentation par les antioxydants devient une nécessité. Mais l'utilisation des antioxydants de synthèse présente des effets indésirables sur la santé humaine. De même, la plupart des anti-inflammatoires commercialisés présentent plusieurs effets secondaires néfastes.

Par ailleurs, la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques, ce qui pose un grand problème de santé publique. A cet égard, l'homme s'est orienté vers la phytothérapie pour découvrir empiriquement les moyens de préserver sa santé.

La phytothérapie est utilisée depuis longtemps dans le secteur de la médecine traditionnelle. Le traitement par les plantes se trouve facilité par le fait que cette pratique est intimement liée aux coutumes et traditions des pays et des peuples. Les traitements traditionnels à base de plantes ont été toujours utilisés sans savoir à quoi étaient dus leurs effets bénéfiques, mais actuellement plusieurs recherches à travers le monde se sont orientées vers la valorisation des substances biologiquement actives afin d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes.

C'est dans cet objectif que s'inscrit notre travail et qui consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire, antioxydante et anti-bactérienne des extraits de la partie aérienne de *Plantago lanceolata* L. connu en Algérie sous le nom de Lissan-El-Haml. Cette plante est connue en médecine traditionnelle pour ces vertus astringentes, cicatrisante, anti-inflammatoires et antitussives. La tradition attribue à cette plante des propriétés antiseptiques, émoullientes (calmant la peau) et vulnéraires (qui guérit les blessures) qui justifient son usage sur les plaies, les contusions et les ulcères cutanés.

Notre étude expérimentale comporte:

- * Préparation des extraits méthanolique et aqueux de la partie aérienne de la plante.
- * Détermination de la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins de ces extraits.
- * Evaluation de l'effet antiinflammatoire des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris et de la patte induit par la carragénine chez le rat.
- * Activité antioxydante (test du DPPH, chélation du fer ferreux, pouvoir réducteur).
- * Activité antibactérienne évaluée par la méthode des disques sur 10 souches.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INFLAMMATION

L'inflammation est une réponse naturelle des tissus vivants vascularisés à une agression physique, chimique ou biologique. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, car son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires (Bourkhiss *et al.*, 2010). Mais elle peut engendrer des dommages irréversibles suite à une régulation défectueuse et générer plusieurs processus pathologiques. Si l'inflammation est mal contrôlée, elle peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation sanguine et conduit alors à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, parfois même à un choc septique entraînant dans les cas les plus graves le décès (Nathan, 2002 ; Tracey, 2002 ; Barton, 2008).

L'inflammation peut être aiguë ou chronique. La première se manifeste immédiatement après l'intrusion du micro-organisme et dure jusqu'à 48 heures. Elle se traduit cliniquement par l'œdème, la rougeur, la douleur et la chaleur. C'est la réponse typique du système immunitaire inné (Russo-Marre *et al.*, 1998). Toutefois, si la réaction inflammatoire n'est pas contrôlée, elle peut évoluer pour donner l'inflammation chronique à laquelle plusieurs maladies peuvent être liées. L'Asthme, l'Alzheimer, le diabète type 2 en sont des exemples (Ferguson, 2010 ; Roifman *et al.*, 2011).

Le déroulement de la réaction inflammatoire (**Figure 1**) comporte initialement une phase locale immédiate suite à un signal de danger d'origine endogène ou exogène, et qui met en jeu des effecteurs primaires, une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires, et une phase de résolution qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé (Regnault, 1992; Barton, 2008).

I.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Elle se traduit par les quatre symptômes cardinaux et elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Botting et Botting, 2000). Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë (**Figure 2**) sont toujours les mêmes, quel que soit le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé.

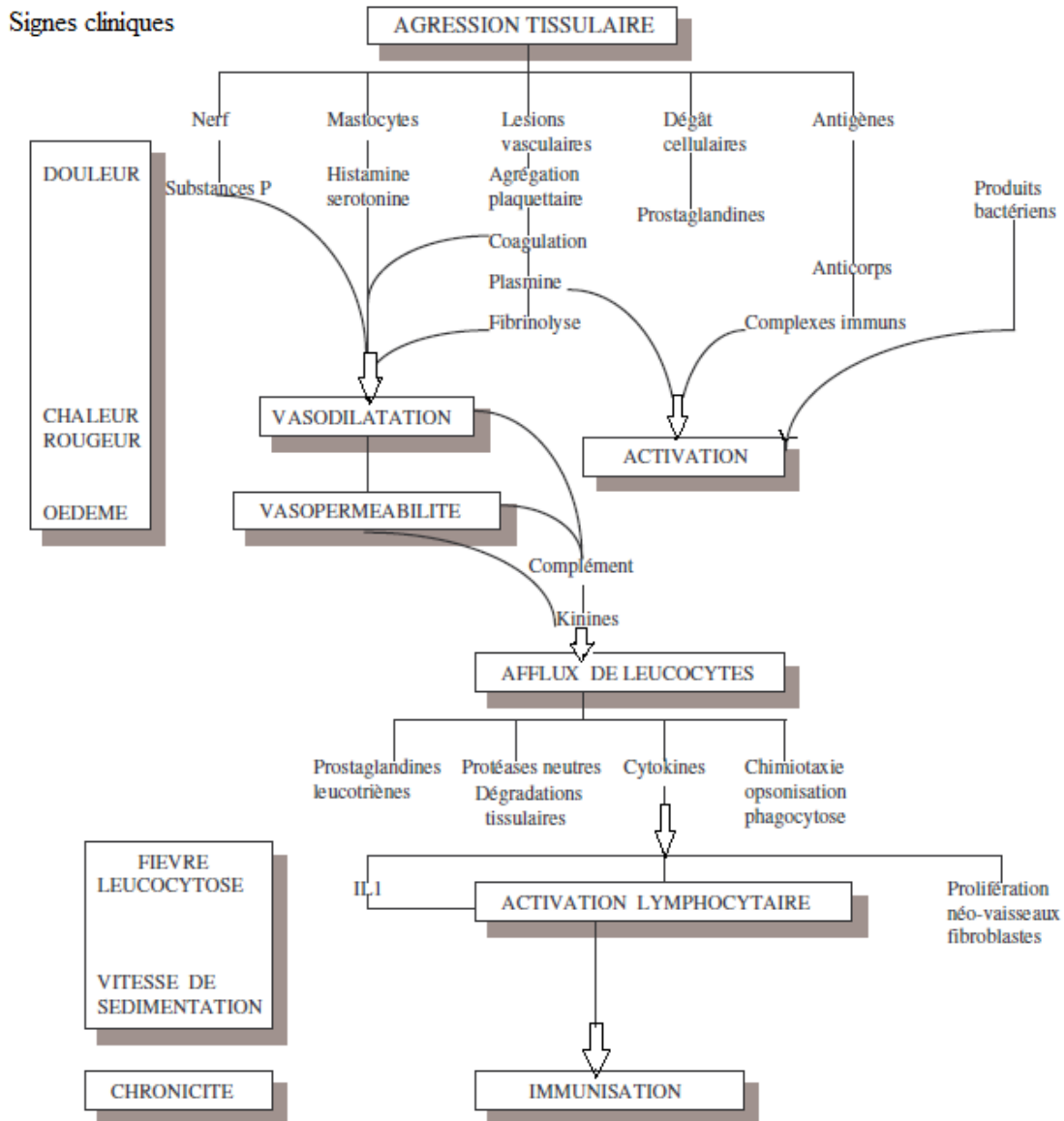


Figure 1. Diagramme général de la réaction inflammatoire selon Laurent, 1987, avec quelques adaptations. L'agression cause des lésions tissulaires et vasculaires, ce qui entraîne la libération de médiateurs chimiques tel que l'histamine et le PAF. Ces médiateurs provoquent la vasodilatation et augmentent la perméabilité vasculaire engendrant l'exsudation plasmatique et un œdème local. Les neutrophiles migrent ensuite vers le foyer de l'inflammation.

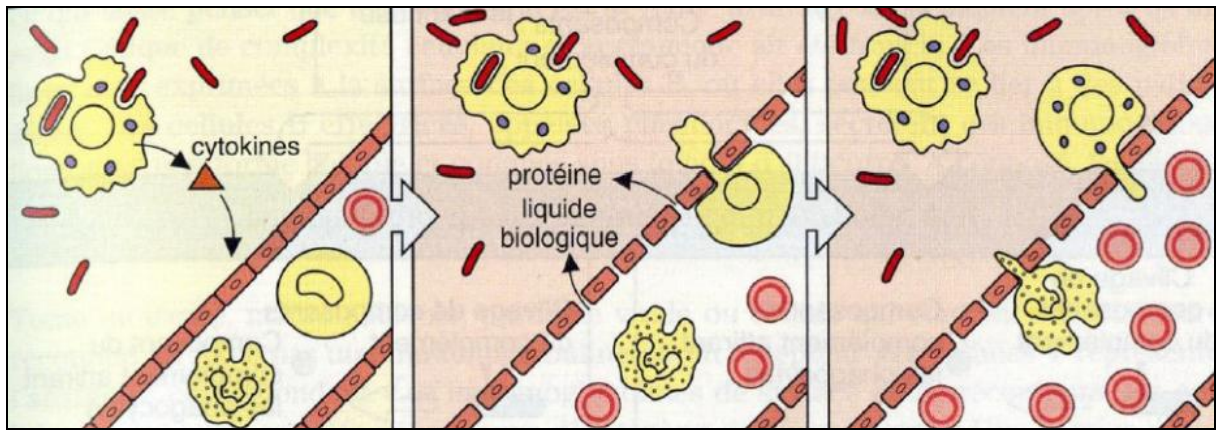


Figure 2. Phase précoce du processus inflammatoire suite à une infection (Parham, 2003)

I.1.1. Phase vasculaire

Suite à une lésion tissulaire, les plaquettes sont activées favorisant ainsi la libération de médiateurs (facteurs vaso-actifs) comme la sérotonine et l’histamine (**figure 3**). Les plaquettes produisent également des cytokines et des facteurs de croissance actifs sur la phase vasculaire et le recrutement et l’activation des cellules inflammatoires. Cette activation des plaquettes constitue la première étape de la phase vasculaire (Steinhubla, 2007). Les mastocytes résidents qui peuvent aussi être activés par un très grand nombre de stimuli, sont également susceptibles d’initier la réaction inflammatoire (Botting et Botting, 2000). L’activation de la cascade de coagulation et du système du complément conduit à la génération de divers médiateurs doués d’activités vasodilatatrice et chimioattractante comme le facteur XII, la fibrine, la bradykinine, C3a et C5a (Fauve et Hevin, 1998). La libération de facteurs vasoactifs entraîne une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire et par conséquent l’exsudation plasmatique (Autier *et al.*, 2004). L’augmentation du débit micro-circulatoire au niveau du site enflammé explique partiellement l’apparition de la chaleur et de la rougeur. L’exsudation plasmatique induit un œdème par distension des tissus et provoque une hyper-pression sur les terminaisons nerveuse locales, ce qui explique les sensations de tuméfaction et de douleur (Weill *et al.*, 2003).

Les facteurs vasoactifs, additionnés de facteurs chimiotactiques et de l’expression des molécules d’adhérence favorisent le recrutement des cellules inflammatoires dans le foyer lésionnel et déclenchent ainsi la phase cellulaire (Autier *et al.*, 2004).

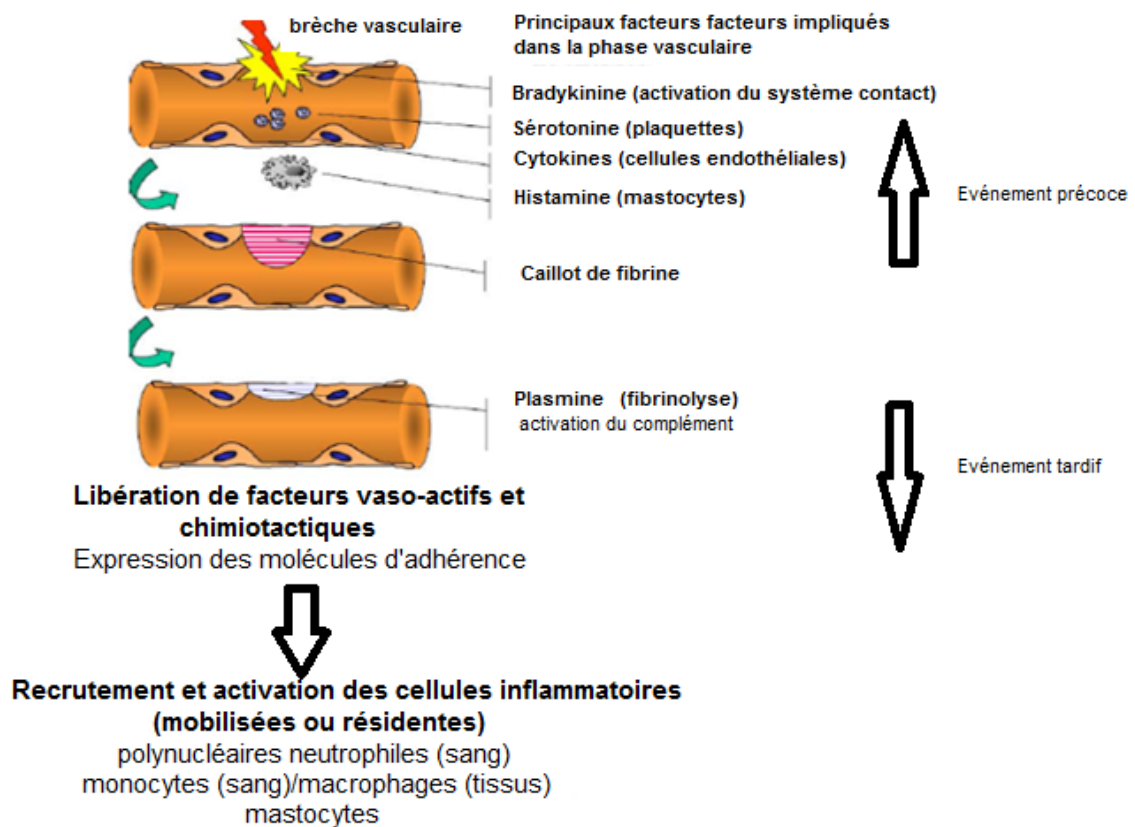


Figure 3. La phase d'initiation (Prin *et al.*, 2009).

I.1.2. Phase cellulaire

L'exsudation plasmatique permet l'apparition de plusieurs substances dans les espaces extravasculaires : anticorps, substances bactéricides, facteurs de coagulation, composants du complément, interleukines, interférons et des dérivés de l'acide arachidonique. Ceci conduit à un afflux extravasculaire des leucocytes attirés par les chimio-attractants existants dans l'exsudat et ceux libérés au niveau du site enflammé (Schoroderet, 1992). Cet afflux consiste en une marginalisation des leucocytes grâce à l'expression d'adhésines au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes activés (Fauve et Hevin, 1998). Ceci permet l'interaction entre l'endothélium et les phagocytes, notamment les polynucléaires neutrophiles (PMNs) et les monocytes, et leur passage à travers les cellules endothéliales contractées sous l'effet de certains médiateurs inflammatoires vers le site enflammé. Les monocytes achèvent leur différenciation en macrophages et amorcent avec les PMNs la phagocytose des agents extérieurs et/ou des débris cellulaires. De nombreuses protéases (collagénase, élastase) et des radicaux libres dérivés sont produits au cours de la phagocytose (Fauve et Hevin, 1998).

I.1.3. Phase de résolution

Des signaux anti-inflammatoires sont produits pour conduire à la résolution de l'inflammation. Des lipides, telles que les lipoxines générées par les lipo-oxygénases à partir de l'acide arachidonique, les protectines et les résolvines jouent un rôle majeur dans la promotion de la résolution du processus inflammatoire et de la réparation tissulaire (Serhan et Savill, 2005 ; Serhan, 2007). Les lipoxines, sécrétées par les macrophages, stoppent l'influx des neutrophiles, facilitant la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et permettant le recrutement de monocytes afin d'éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires (Serhan et Savill, 2005). Les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales libèrent les inhibiteurs de protéases, inactivant ainsi les protéases sécrétées par les neutrophiles lors de la phase aiguë de la réponse inflammatoire (Ashcroft *et al.*, 2000).

Le système nerveux joue également un rôle important dans l'arrêt de l'inflammation. Le système nerveux parasympathique induit l'activation des macrophages via la libération d'acétyl choline, son principal neurotransmetteur (Tracey, 2002). Cette action pourrait être liée à la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 et IL-18) et de l'induction de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Borovikova *et al.*, 2000).

La réparation des tissus fait intervenir les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Eming *et al.*, 2007). Les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires et les produits de dégradation et les débris cellulaires sont phagocytés. La réparation de l'endothélium est assurée par les cellules endothéliales, mais si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction tissulaire, ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui produisent les protéines de la matrice intercellulaire comme le collagène, la fibronectine et la laminine, qui permettent la reconstruction des tissus. Le système d'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire va s'éteindre (Weill *et al.*, 2003).

I.2. Inflammation chronique

C'est une inflammation qui n'a aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années.

A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de cette inflammation. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentative de réparation sont également présents. Les macrophages sont l'élément essentiel de l'infiltration cellulaire vers le site inflammatoire (Weill *et al.*, 2003).

On peut distinguer plusieurs circonstances de survenue des inflammations chroniques :

- Les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe.
- Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est surtout le cas des maladies auto-immunes.
- Il est aussi possible que la chronicité apparaisse spontanément (Ferguson, 2010) et que cette inflammation se perpétue en l'absence de tout agent pathogène telle que l'inflammation du tissu adipeux (Poitou et Clément, 2005).

I.3. Médiateurs de l'inflammation

Le déclenchement et le maintien de l'inflammation, ainsi que sa diffusion au niveau du foyer initial font appel à des facteurs synthétisés localement ou à l'état inactif au niveau systémique dont certains sont pro-inflammatoires et d'autres anti-inflammatoires. Un déséquilibre entre ces deux groupes de médiateurs conduit à la chronicité de la réaction inflammatoire et à la destruction des tissus enflammés. Les principaux médiateurs chimiques cellulaires sont:

* Amines vaso-actives (histamines et sérotonine): libérées par les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes. Elles provoquent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).

* Eicosanoïdes (dérivés de l'acide arachidonique). Les leucotriènes augmentent la perméabilité capillaire et exercent une chimioattractivité sur les polynucléaires, tandis que les prostaglandines produisent une vasodilatation locale, favorisent l'œdème et l'afflux leucocytaire (Moulin, 1998). Les thromboxanes stimulent les mécanismes de l'agrégation plaquettaire (Diouf, 1991).

* Molécules d'adhésion: permettent le ciblage du foyer inflammatoire par les cellules immunitaires. Elles sont exprimées par les vaisseaux du foyer inflammatoire et retiennent les cellules sanguines comportant le ligand correspondant (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).

* Cytokines: elles sont produites par de nombreuses cellules comme les lymphocytes T, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les plaquettes ou même par les cellules épithéliales (Capron, 1998). Elles peuvent être pro-inflammatoires (interleukine (IL) : IL-1 β , IL-6, ou le TNF α) ou anti-inflammatoires (IL-10). Les cytokines sont responsables de la médiation de l'immunité innée, de la régulation, de l'activation, de la croissance et de la différenciation des lymphocytes, ainsi que de la stimulation de l'hématopoïèse (Henrotin *et al.*, 2001; Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).

* Neuropeptides: dont le principal est la substance P. De nombreuses cellules possèdent des récepteurs membranaires pour la substance P à savoir les cellules endothéliales, les lymphocytes, les macrophages, les mastocytes et les fibroblastes. Elle augmente la perméabilité vasculaire, stimule le chimiotactisme des neutrophiles et la production de prostaglandines, induit la dégranulation des mastocytes et la libération de l'histamine. La substance P stimule aussi l'angiogenèse et la prolifération des kératinocytes, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (Tanaka *et al.*, 1988 ; Ziche *et al.*, 1990 ; Henrotin *et al.*, 2001).

* PAF (Platelet Activating Factor): il stimule l'agrégation plaquettaire, augmente la perméabilité vasculaire et active les leucocytes (Hosford et Braquet., 1990 ; Henrotin *et al.*, 2001).

* Les kinines: ce sont des polypeptides plasmatiques phlogogènes, dont la plus active est la bradykinine. Elles entraînent une activation de la phospholipase A2, une irritation des fibres sensorielles au niveau lésionnel. La bradykinine favorise la vasoconstriction (Diouf, 1991; Henrotin *et al.*, 2001).

* Complément: regroupe des protéines sériques, dont beaucoup sont des protéases, activées par les deux voies enzymatiques classique et alterne qui forment la séquence terminale d'éléments lytiques C5 à C9. Au cours de l'inflammation aigue, une troisième voie d'activation du complément est possible et permet la production des anaphylatoxines. Le système de complément induit l'opsonisation qui facilite la phagocytose et la lyse des micro-organismes pathogènes, mais aussi l'activation des cellules inflammatoires. Le C3a et C5a augmentent la perméabilité vasculaire, stimulent le chimiotactisme des neutrophiles, la production de leucotriène, la dégranulation des mastocytes, la libération d'histamine et enfin activent la formation des espèces réactives de l'oxygène. (Henrotin *et al.*, 2001).

* Système coagulation/fibrinolyse: permet la formation du caillot afin de limiter le foyer inflammatoire et constitue une matrice sur laquelle les cellules immunitaires peuvent se déplacer (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).

I.4. Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont une classe thérapeutique largement utilisée en médecine, pour la gestion des états fébriles et inflammatoires. Leurs administrations lors du processus inflammatoire permettent une gestion symptomatique et non étiologique.

I.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde. Leurs propriétés antalgique, anti-inflammatoire et antipyrétique forment l'intérêt de leur administration lors du processus inflammatoire. Leurs intérêts bénéfiques sont cependant limités par leurs effets indésirables graves, principalement digestifs (ulcères gastroduodénaux) et à un moindre degré rénaux (Lahmidani *et al.*, 2012). L'impossibilité de dissocier les effets thérapeutiques des AINS de certains de leurs effets indésirables s'explique par leur mécanisme d'action (Blain *et al.*, 2000; Lahmidani *et al.*, 2012). En effet, les AINS inhibent compétitivement la biotransformation de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂) par la voie de la cyclooxygénase (**figure 4**). Cette inhibition rend impossible la transformation de PGH₂ en prostanoïdes par les isomérases spécifiques à la cellule (Blain *et al.*, 2000).

La cyclo-oxygénase existe sous deux formes: la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) et la cyclo-oxygénase 1 (COX-1). La COX-2 est inductible, sa synthèse est stimulée par le TNF α et l'interleukine 1 et c'est elle qui est impliquée dans les phénomènes liés à l'inflammation et dans quelques processus associés à la prolifération cellulaire et est responsable des effets pharmacodynamiques des AINS. Au contraire, la COX-1 est une enzyme constitutive présente dans la plupart des tissus et intervient dans la protection de la muqueuse gastrique, l'agrégation plaquettaire, l'homéostasie vasculaire et le maintien de l'équilibre hydrosodé (Blain *et al.*, 2000 ; Corrado *et al.*, 2009). L'inhibition de la COX1 (par manque de spécificité d'action) lors de l'utilisation des AINS est la cause des effets indésirables de ces médicaments. Ceci nécessite la mise au point d'AINS COX-2 sélectifs.

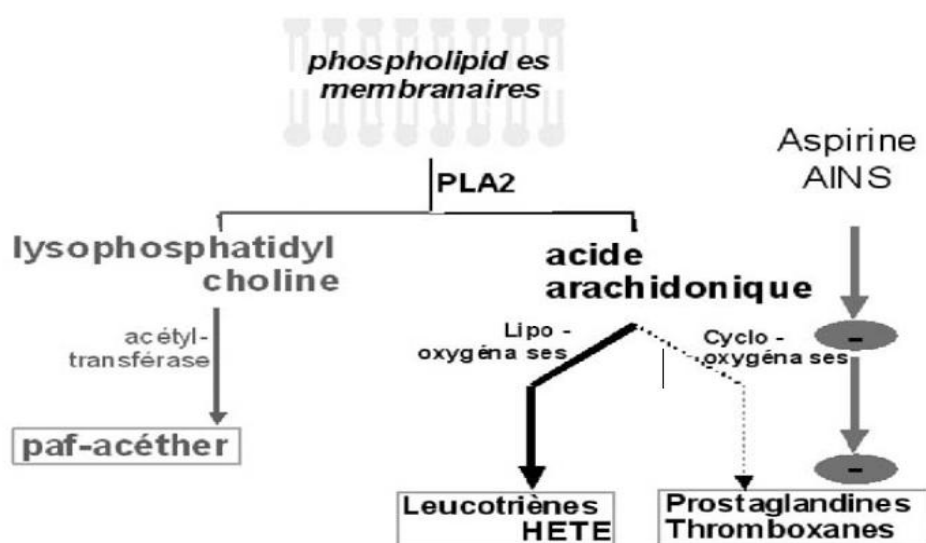


Figure 4. Inhibition des cyclo-oxygénases par l'aspirine et les AINS (Demoly, 2007).

I.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes sont des molécules dérivées d'une hormone naturellement sécrétée par le cortex surrénale ou hémi-synthétisés à partir d'extraits animaux ou végétaux. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires et antalgiques, mais également immuno-suppressives (Dangoumau, 2006).

En outre, les glucocorticoïdes diminuent fortement la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site inflammatoire ainsi que la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinines, les cytokines, les ions superoxydes (**figure 5**). Ils sont également responsables de la diminution de la perméabilité capillaire et à l'augmentation de l'activité des ostéoclastes, ce qui conduit à la fragilisation des os (Coyen, 1990, Lechat, 1990 ; Dangoumau, 2006). Ces troubles peuvent être aigues (hypertension artérielle, dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes, ulcère gastroduodéal...etc.) ou chroniques tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003).

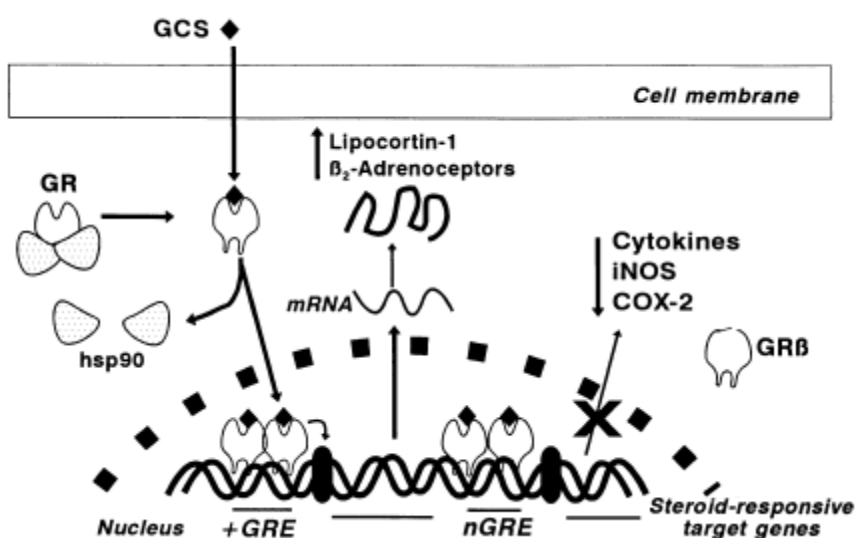


Figure 5. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (Barnes, 1998).

I.4.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Afin de réduire les effets secondaires des anti-inflammatoires commercialisés, le recours aux produits naturels (particulièrement les plantes médicinales) s'impose comme une piste très importante à explorer pour avoir des médicaments efficaces et à moindre effets secondaires.

L'activité anti-inflammatoire des plantes médicinales est due à leur contenu en métabolites secondaires bioactifs, tels que les polyphénols, les stérols, les alcaloïdes, les coumarines les terpènes...etc. Ces substances actives peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction

inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique (tout en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase), les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, l'activation du facteur nucléaire kappa-B et la production des espèces oxygénées réactives (Dowiejua *et al.*, 1993).

II. LE STRESS OXYDANT

Le stress oxydant est l'altération de l'homéostasie redox cellulaire induite soit par une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou d'azote (RNS) soit par une déplétion des capacités de défenses antioxydantes par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008).

A faibles concentrations, les ROS exercent des effets physiologiques et jouent des rôles importants dans l'organisme. En effet, les ROS sont les médiateurs de multiples fonctions de signalisation et de transcription essentielles pour le fonctionnement normal et la survie des cellules, ainsi que de la programmation de leur élimination. Dans des circonstances pathologiques, ou sous l'action de certains facteurs exogènes, une surproduction de ces espèces est possible. Dans ce cas, Les ROS peuvent endommager la structure des macromolécules (acides nucléiques, protéines, lipides et glucides), générer de nouveaux produits oxydants et provoquer une cytotoxicité (Sayre *et al.*, 2005). L'intensité de ces dommages est proportionnelle au taux de production des ROS, leur durée d'action ainsi que des outils de défense spécifique présents dans les tissus attaqués (Bloomer et Fisher-Wellman., 2008).

II.1.Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène ROS (**tableau 1**) sont des substances chimiques (atomes, molécules) incluant les radicaux libres possédant au moins un électron libre sur la couche externe (radical hydroxyl OH[•], superoxyde O₂^{•-}, le radical peroxy ROO[•]) et les dérivés non radicalaires, dont la réactivité est très élevée comme le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, l'oxygène singulet ¹O₂ et l'acide hypochloreux HOCl (Cuzzocrea *et al.*, 2001 ; Chu *et al.*, 2010).

A cause de leur hyperréactivité, ces radicaux libres ont une demi-vie très courte (quelques millisecondes à quelques nanosecondes. Cette réactivité dépendra des éléments en présence: si un radical rencontre un autre radical, le produit sera un non radical (A[•]+B[•]→AB). Si un radical rencontre un non radical, un nouveau radical sera formé (A[•]+B→A+B[•]) et donnera

naissance à une chaîne qui continuera jusqu'à ce que le radical rencontre un autre radical ou un antioxydant (Finaud *et al.*, 2006).

Les espèces réactives azotées RNS ont été définies comme un sous-groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) (**figure 6**) comme le radical monoxyde d'azote (NO[•]), l'anion peroxydinitrite (ONOO⁻) et le radical dioxyde d'azote (NO₂[•]) (Simon *et al.*, 2000).

Tableau 1 : Espèces réactives de l'oxygène (Kohen et Nyska, 2002).

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Oxygène (bi-radical)	O ₂
Anion superoxyde	O ₂ ^{•-}
Radical hydroxyle	OH [•]
Radical peroxyde	ROO [•]
Radical alkoxyde	RO [•]
Monoxyde d'azote	NO [•]
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Peroxyde organique	ROOH
Acide hypochlorique	HOCl
Ozone	O ₃
Aldéhydes	HCOR
Oxygène singlet	¹ O ₂
Peroxydinitrite	ONOO ⁻

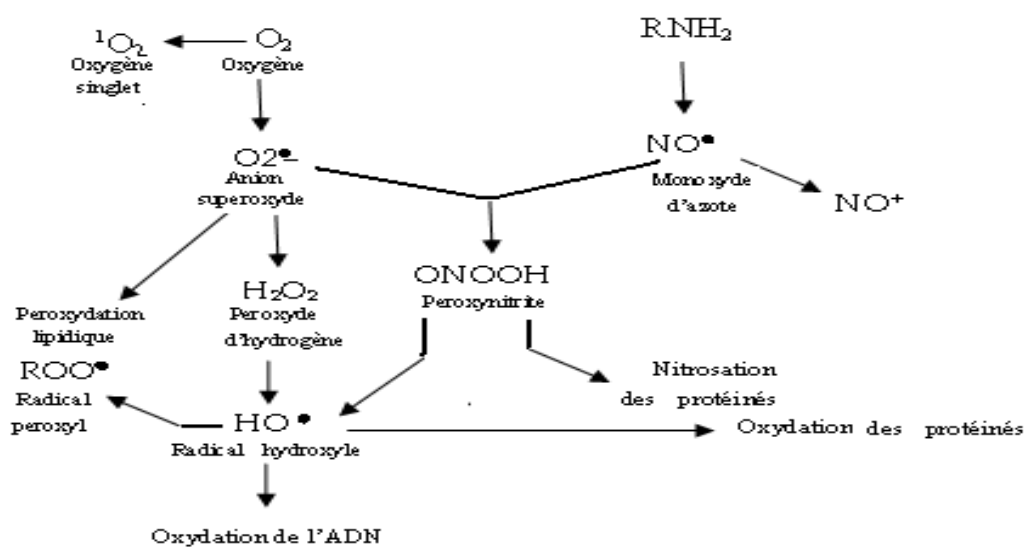


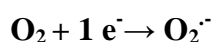
Figure 6. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote intervenant dans le phénomène du stress oxydant (Favier, 1997).

II .1.1 Principales Espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire (mitochondries). Ce processus n'est toutefois pas parfait car 2 à 5% de l'oxygène est consommé et transformé en $O_2\cdot^-$ par une réduction univalente et de ce fait il en résulte une production inévitable d'intermédiaires très réactifs (Pincemail *et al.*, 2001 ; Finaud *et al.*, 2006).

II.1.1.1. Radical superoxyde ($O_2\cdot^-$)

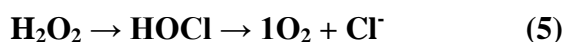
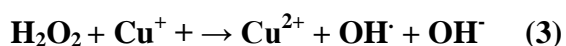
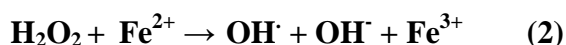
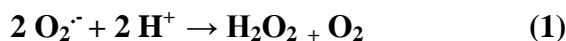
Le radical superoxyde est l'espèce réactive la plus fréquente dans l'organisme. Il est principalement formé au niveau de la chaîne de transport des électrons, au niveau des complexes I et III de la membrane interne des mitochondries, sous l'influence du coenzyme Q10 réduit, de la NADH-déshydrogénase en présence d'oxygène (Sayre *et al.*, 2005).



Il est également formé sous l'influence de métalloenzymes endommagées ou altérées par mutation génétique, et peut être produit par des NADPH oxydases au niveau des membranes des cellules du système immunitaire où il contribue à l'action bactéricide. La réactivité du radical superoxyde est limitée et son action sera plus le résultat des produits beaucoup plus agressifs qui en dérivent, en particulier le radical hydroxyle ($OH\cdot$) (Lamprecht *et al.*, 2004).

II.1.1.2. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD), le radical superoxyde $O_2\cdot^-$ est réduit en peroxyde d'hydrogène (réaction 1). Ce dernier bien que n'étant pas un radical libre, joue un rôle important dans le stress oxydant. Il est non ionisé et de faible charge ce qui facilite sa diffusion à travers les membranes cellulaires. Le H_2O_2 est le précurseur du $OH\cdot$ selon les réactions de Fenton/Haber-Weiss (réaction 2, 3, et 4). Comme il peut donner l'acide hypochloreux (réaction 5) en présence de myéloperoxydases.



Le H_2O_2 peut dans certaines conditions favoriser le système antioxydant en se transformant en H_2O et O_2 en présence de la catalase ou en H_2O en présence de la glutathion peroxydase (Biesalski *et al.*, 2001). A faible concentration, le H_2O_2 active la signalisation et pourrait être

impliqué dans des réponses physiologiques comme celle du cycle de Krebs, la croissance, la dépolarisation membranaire, la régulation du calcium (Sayre *et al.*, 2005).

II.1.1.3. Radical hydroxyle (OH•)

Le radical hydroxyle est extrêmement puissant, il réagit indifféremment avec toutes les macromolécules, auxquelles il a un accès (Van Helden *et al.*, 2009). Le radical hydroxyle est un des oxydants les plus réactifs du système biologique, toutefois, sa courte demi vie (10^{-9} secondes) en réduit considérablement sa potentialité (Sayre *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2008). Généralement le peroxyde d'hydrogène serait transformé en radical hydroxyle par une succession de réactions en chaîne initiée par la réaction de Fenton (réaction 3 et 4), suivie de la réaction de Haber-Weiss (Ahsan *et al.*, 2003). La continuité des réactions se fait grâce à la régénération des ions métalliques oxydés (Fe^{3+} et Cu^{2+}). Cette capacité essentiellement d' $O_2^{\bullet-}$ de réduire le fer et le cuivre aux formes qui catalysent les réactions oxydatives sont la cause principale de son effet délétère. (Halliwell et Gutteridge, 1995).

II.1.1.4. Le radical monoxyde d'azote (oxyde nitrique)

Le radical monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) est une petite molécule générée dans les tissus biologiques par l'oxyde nitrique synthase lors de la métabolisation de l'arginine en citruline (Guzik *et al.*, 2003). L'importante production et distribution de l'oxyde nitrique, combinées à sa facile réaction avec les ROS, lui assurent un rôle central dans le stress oxydant. Le NO^{\bullet} libéré des cellules endothéliales réagit très rapidement avec l'oxygène pour former le radical dioxyde d'azote (NO_2^{\bullet}) qui peut à son tour réagir avec l'oxyde nitrique pour former le trioxyde d'azote (N_2O_3). Sa rapide réaction avec le radical superoxyde produit le peroxyde d'azote ($ONOO^{\bullet}$), très réactif et capable d'oxyder les macromolécules particulièrement lors d'états pathologiques (Tsai *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2008). La concentration du NO^{\bullet} est sujette à de nombreuses influences qui peuvent augmenter ou diminuer sa production et influencer son rôle sur l'agrégation plaquettaire, la tension artérielle, l'inflammation, l'oxydation, la reperfusion des organes, l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives (Poprzecki *et al.*, 2009).

II.1.2. Principales sources des espèces réactives oxygénées

Les ROS sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes. La production endogène (**figure 7**) est considérée significativement plus importante que celle d'origine exogène.

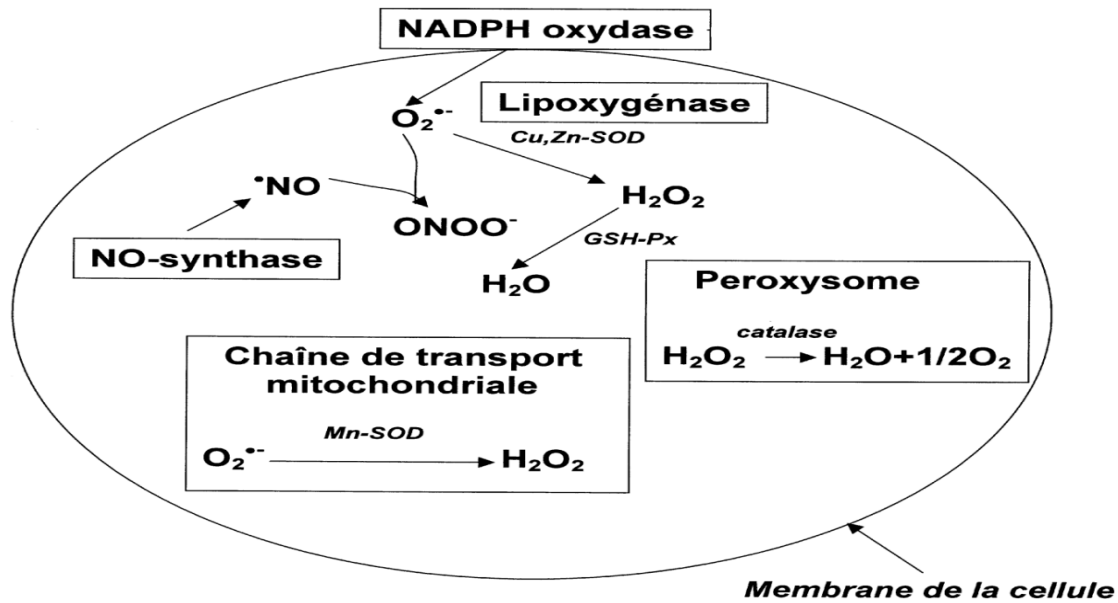


Figure 7. Sources endogènes des espèces réactives oxygénées (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2002).

II.1.2.1. Sources endogènes

a. Xanthine Oxydase

Dans les conditions physiologiques, la xanthine oxydase (XO) catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde (Chan, 2003). La XO joue un rôle crucial dans la génération de l' $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 (Rahman *et al.*, 2006). L' $O_2^{\bullet-}$ produit au cours de l'ischémie-reperfusion est rapidement converti en $ONOO^{\bullet}$ par son interaction avec le NO^{\bullet} (**figure 8**).

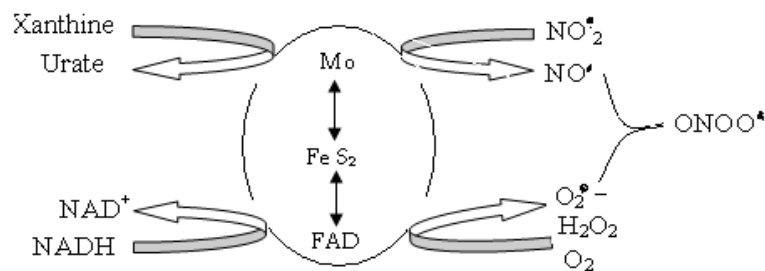


Figure 8. Implication de la xanthine oxydase dans la production de peroxynitrite (Harrison, 2002).

b. NADPH oxydase

Au cours de l'inflammation, la NADPH oxydase phagocytaire peut produire de grandes quantités du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et ses dérivés (Nathan et Root, 1977). L'activation simultanée de la NADPH oxydase et de la myéloperoxydase (MPO), conduit à la production

de l' $^1\text{O}_2$ et de l'acide hypochlorique, l'un des puissants oxydants phagocytaires à forte activité antimicrobienne (Steinbeck *et al.*, 1993). La NADPH oxydase non phagocytaire (fibroblastes) produit des radicaux libres en faible quantité qui joueront le rôle de régulateurs dans les cascades de signalisation intracellulaire (Bae *et al.*, 1997).

c. Lipooxygénases et Cyclooxygénases

Les lipooxygénases et les cyclooxygénases représentent une autre importante source de ROS dans les parois vasculaires (Madamanchi, 2005). La 5-LO catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) pour donner des hydroperoxydes toxiques pour la cellule, comme elle intervient dans la formation du H_2O_2 par les lymphocytes T en réponse aux interleukines-1 β (Droge, 2002). La 12 et 15-lipooxygénase peuvent oxyder les acides gras estérifiés comme les esters de cholestérol et celles retrouvées dans les phospholipides (Belkner *et al.*, 1991).

d. Mitochondrie

La chaîne respiratoire mitochondriale est responsable de la production de 90% des ROS dans la cellule (Balaban *et al.*, 2005). La production d' $\text{O}^{\cdot-}$ résulte de la fuite d'électrons lors de leur transfert par les complexes de la chaîne respiratoire (Zhang et Gutterman, 2007). Ces électrons proviennent des NADH_2 et FADH_2 (Madamanchi *et al.*, 2005).

II.1.2.2. Sources exogènes

Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau (RX ou γ) soit en activant des molécules photosensibles (UV) et produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (Favier, 2003).

Certains métaux (chrome, cuivre, fer, vanadium) génèrent des radicaux hydroxyles très réactifs. Les polluants de l'air, comme le goudron, la fumée des cigarettes et les contaminants industriels (amiante, silice), constituent une importante source de ROS tels que le NO^\bullet et le $\text{NO}^{\cdot 2}$ qui causent des dommages directs avec la peau ou après inhalation (Koren, 1995). Ces ROS participent à la genèse de radicaux libres car ils sont responsables de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires. Le NO^\bullet et le $\text{NO}^{\cdot 2}$ peuvent aussi réagir avec l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène pour former de puissant oxydant comme ONOO^\bullet et le radical OH^\bullet (Pincemail *et al.*, 1998 ; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2001).

D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons, tels que le tétrachlorure de carbone (CCl_4) dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire du radical CCl_3^\bullet (Kanter *et al.*, 2003).

Le métabolisme *in vivo* de certains xénobiotiques (toxines, pesticides et herbicides), de nombreux médicaments (antibiotiques, anticancéreux...) peut contribuer à la production des ROS (Martinez -Cayuela, 1995).

II. 2. Conséquences biologiques du stress oxydant

Les lipides, les protéines et les acides nucléiques représentent les principales cibles des ROS (**figure 9**). L'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de LDL oxydés qui sont captés par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires. Alors que l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003). Les acides gras (AG) insaturés des phospholipides membranaires sont les cibles privilégiés des ROS. Leur peroxydation génère des produits primaires sous forme de polyènes conjugués qui pourront se combiner avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes (Spiteller, 2006). Ces radicaux peroxydes ($\text{LOO}\cdot$) extraient un atome d'hydrogène d'un autre acide gras pour former des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) et de nouveaux radicaux d'AG, qui vont propager la peroxydation. La malonedialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (HNE) sont des exemples d'aldéhydes résultants de la peroxydation lipidique et peuvent être utilisés comme marqueurs lors de la détection de peroxydation lipidique chez les patients (Pincemail *et al.*, 1999). Les $\text{LOO}\cdot$ formés pourront grâce à leur grande réactivité extraire les hydrogènes d'autres molécules adjacentes comme les sucres et les protéines (Spiteller, 2006).

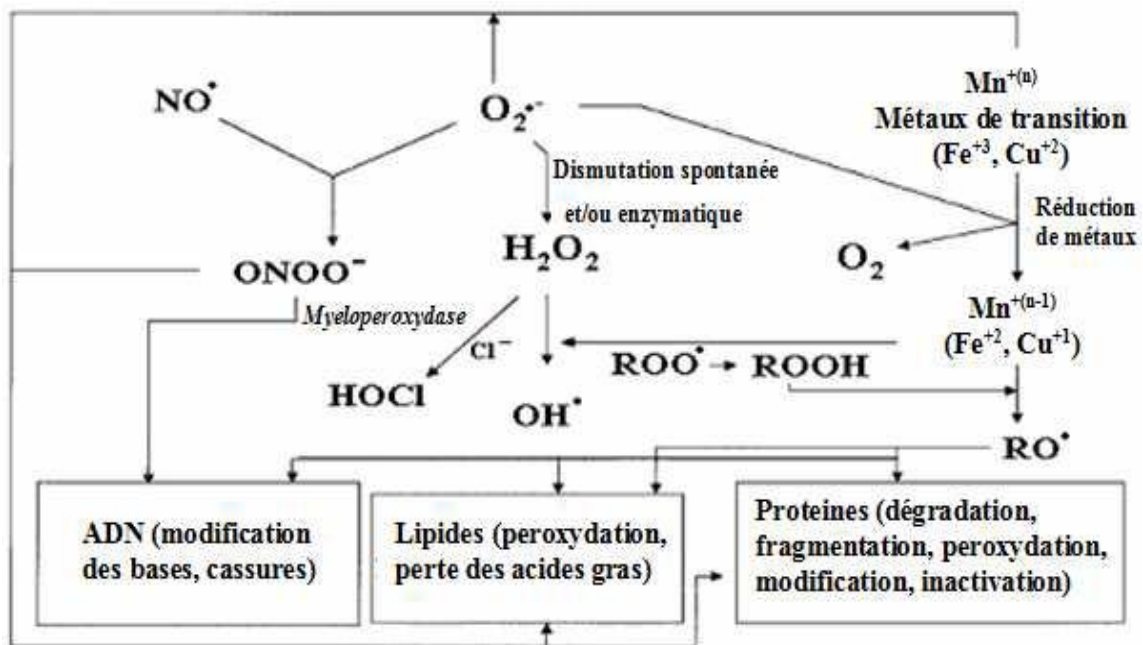


Figure 9. Cibles biologiques et dommages induits par les ROS (Kohen et Nyska, 2002).

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). Il a été estimé que les protéines pouvaient piéger 50 à 75% des ROS. Elles peuvent subir soit des réticulations par formation de ponts bi-tyrosine, soit des coupures en cas d'agression forte ou des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées (Favier, 2003). L'oxydation des acides aminés implique une attaque sur un des groupes méthyle lié à un atome d'azote pour former un radical d'acide aminé qui réagira avec l'oxygène pour former un aldéhyde avec expulsion d'un radical peroxyde d'hydrogène ou d'un peroxyde d'hydrogène (Spiteller, 2006). Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques et deviennent plus sensibles à l'action des protéases. Elles deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation des zones hydrophobes centrales et vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules (Favier, 2003). Le dommage oxydatif des protéines peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires (Aruoma, 1999; Favier, 2003). De même, ces dommages oxydatifs peuvent contribuer au dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérasés (Aruoma, 1999).

Le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter *et al.*, 1988). Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (Beckman et Ames, 1998).

Tant dans les mitochondries que dans le noyau des cellules, des dommages oxydatifs sur les bases d'ARN ou d'ADN peuvent se produire par réactions de Fenton via l'action des radicaux OH•, sous l'effet d'aldéhydes de la peroxydation lipidique comme les HNE ou par des peroxydites (Sayre *et al.*, 2005 ; Lyn Patrick, 2006). Ces altérations peuvent conduire à des scissions d'ADN et avoir une action mutagène (Sayre *et al.*, 2005; Bloomer et Fisher-Wellman., 2008). La peroxydation lipidique est également capable d'affecter la prolifération des cellules en formant des liaisons intra et intermoléculaires entre les acides aminés sulfurés des ARN et des ADN (El-Mesery *et al.*, 2009). Les guanines sont préférentiellement attaquées et le produit de leur dégradation peut être détecté par le dosage de la 8-hydroxydeoxyguanosine dans le sang et dans l'urine (Finaud *et al.*, 2006).

Les sucres sont attaqués par les ROS via l'abstraction d'hydrogène pour former un carbonyle et expulser un radical hydroperoxyde ($\bullet\text{OOH}$). L'opération se prolonge jusqu'à la formation d'un composé dicarbonylé (Spiteller, 2006). Par auto-oxydation, des sucres comme le glucose forment des composés dicarbonylés, dont les plus connus sont les glyoxals et les glycolaldéhydes, qui pourront se lier à des protéines et altérer leurs propriétés chimiques (Wells-Knecht *et al.*, 1995). Ceci a été démontré chez des diabétiques et a été trouvé corrélé avec la sévérité de la maladie (Glomb et Monnier, 1995) et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003). La glyco-oxydation des sucres et la glycation des protéines ont été mis en évidence dans les agglomérats de protéines caractéristiques de certaines maladies neurodégénératives (Sayre *et al.*, 2005).

II. 3. Implications pathologiques du stress oxydant

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (**figure 10**) comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier, 2003). C'est donc la cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, vieillissement accéléré..., il est un des facteurs de genèse de maladies plurifactorielles telle que la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 1997).

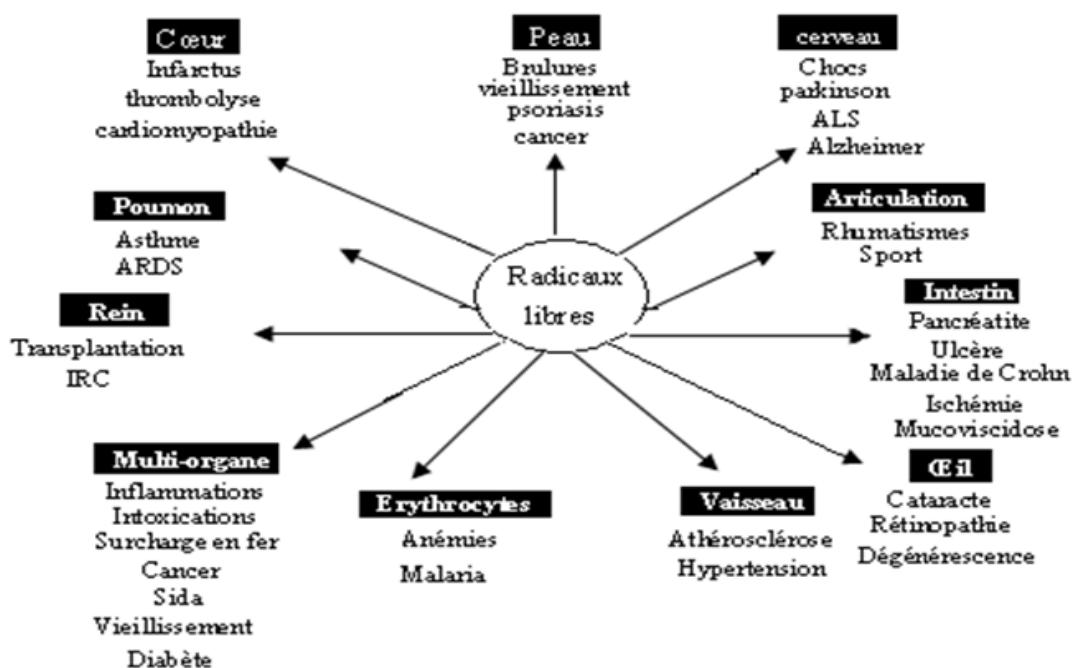


Figure 10. Principales circonstances pathologiques accompagnant le stress oxydant. **ARDS**: Syndrome de détresse respiratoires aigue ; **Sida** : Syndrome d'immunodéficience acquise ; **ALS** : Sclérose latéral amyotrophique (Favier, 1997).

II. 4. Antioxydants

Les antioxydants sont des composés d'origine endogène ou exogène qui servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour les neutraliser et minimiser le dommage oxydatif (Tang et Halliwell, 2010).

II. 4.1. Antioxydants endogènes

II. 4.1.1. Antioxydants enzymatiques

La Super oxyde dismutase (SOD) décompose le superoxyde en O_2 et H_2O_2 moins toxiques (figure 11). Le H_2O_2 sera à son tour transformé par la catalase en O_2 et H_2O , ou en H_2O par la glutathion peroxydase, en présence du glutathion réduit (GSH). Le glutathion réduit, sert de substrat à la GPX pour former du glutathion oxydé (GSSG). Avec l'aide d'une glutathion réductase et de NADPH, le GSH sera régénéré à partir du GSSG. En plus d'éliminer directement les ROS, les enzymes antioxydants participent à la régulation du stress oxydant (Sayre *et al.*, 2005).

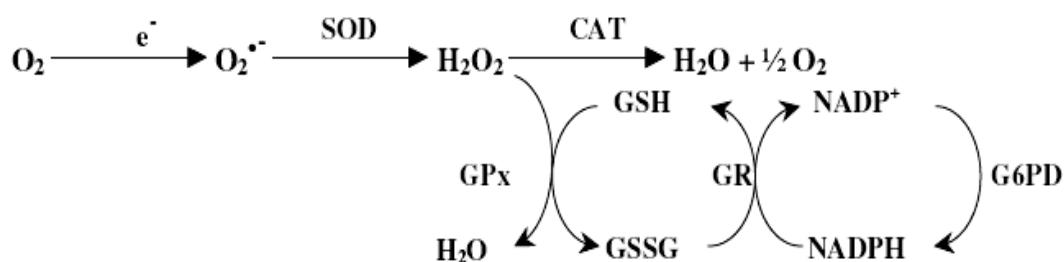


Figure 11. Mécanisme de détoxification enzymatique des ROS (Marfak, 2003).

II. 4.1.2. Antioxydants endogènes non enzymatiques

Cette classe regroupe des composés endogènes de faible poids moléculaire qui peuvent être soit des produits de synthèse (glutathion, histidine dipeptide) ou issus du métabolisme cellulaire (acide urique). Des protéines telles que la ferritine, la ceruloplasmine et l'albumine contribuent à leur tour dans la défense antioxydante secondaire en chélatant les métaux de transition permettant de prévenir la formation du radical hydroxyle (Martinez-Cayuela, 1995).

a. Glutathion réduit

Le glutathion réduit (GSH) est un antioxydant protéique abondant dans l'organisme où il joue un rôle de protection des tissus et des protéines transporteuses d'ions redox actifs comme l'hémoglobine, la transferrine, la ferritine et l'albumine. Le GSH est capable de régénérer les vitamines E et C oxydées. Au niveau hépatique, il est détoxifiant car il peut se lier aux métaux toxiques comme le mercure et l'arsenic (Clarkson et Thompson, 2000; Lyn Patrick, 2006).

b. Acide urique

L'acide urique est l'un des meilleurs antioxydants du plasma, il couvre 35-60% de la capacité antioxydante totale (Johnson *et al.*, 2009). L'acide urique peut être oxydé en différents produits dont le prédominant est l'allantoïne qui augmente également dans les muscles en cas d'effort (Hellsten *et al.*, 2001), puis régénéré par la vitamine C (Vasconcelos *et al.*, 2007).

II.4.2. Antioxydants exogènes

II.4.2.1. Vitamines

La vitamine E est le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Traber et Atkinson, 2007). Elle agit directement sur une grande variété de ROS pour former un radical peu réactif. Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie par la vitamine C (**figure 12**), mais également par d'autres composés comme la vitamine A, le GSH et l'ubiquinol. La vitamine E peut aussi activer les SOD et les CAT (Margaritis *et al.*, 2003; Lyn Patrick, 2006).

La vitamine A (rétinoïdes) est présente dans les aliments d'origine animale (lait, foie, jaune d'œuf), alors que les provitamines A (béta-carotène, lutéines, lycopènes,...) se rencontrent dans de nombreux fruits et légumes. Le béta-carotène est le principal précurseur de la vitamine A. La vitamine A agit sur les ROS en formant un radical de vitamine A qui pourra agir comme antioxydant en réagissant avec un autre radical pour former un non radical, ou sera régénéré en vitamine A (Clarkson et Thompson, 2000; Fisher-Wellman et Bloomer, 2009). En excès, la vitamine A pourrait agir comme pro-oxydants, et favoriser l'oxydation de l'ADN (Van Helden *et al.*, 2009).

La vitamine C joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Koolman *et al.*, 1999). Elle agit directement sur les ROS et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH. A forte dose, la vitamine C peut exercer une action pro-oxydante via son habilité à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}), qui contribue aux réactions de Fenton/Haber-Weiss (Sayre *et al.*, 2005).

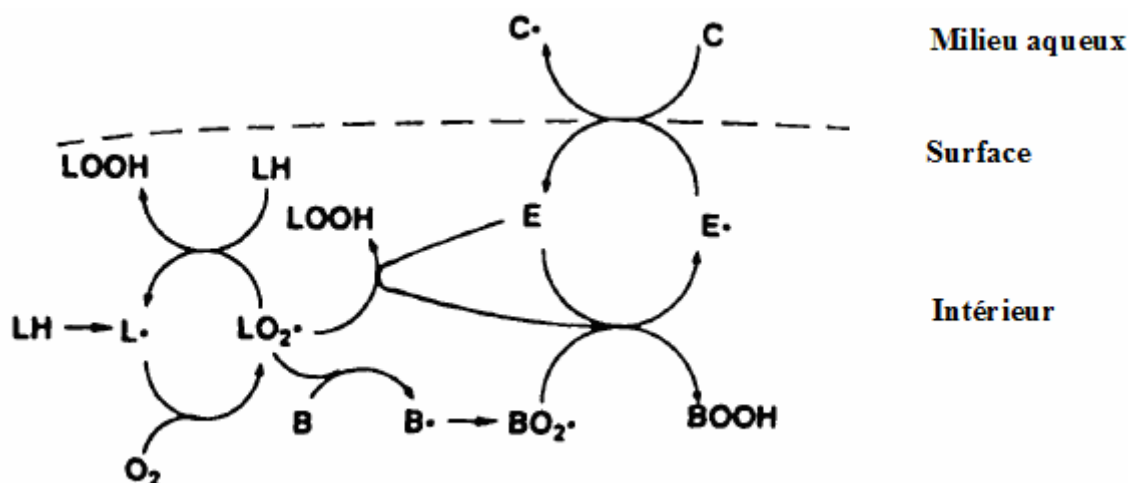


Figure 12. Mécanisme probable de l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines à faible densité par la B-carotène (B), la vitamine C (C) et la vitamine E (E). Lipide (LH), peroxyde lipidique (LO_2^\bullet), hydroperoxyde lipidique (LOOH) (Niki *et al.*, 1995).

II.4.2.2. Polyphénols

Les polyphénols, des produits du métabolisme secondaire des végétaux regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (Tapiero *et al.*, 2002). Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe le plus important (Beta *et al.*, 2005).

Les acides phénoliques (acide chlorogénique, caféique, protocatéchique, vanillique, férulique, sinapique et gallique) contenus dans un certain nombre de plantes médicinales (Hale, 2003; Psotová *et al.*, 2003) sont considérés comme des antioxydants.

Les flavonoïdes (plus de 5000 molécules isolées) sont les polyphénols les plus nombreux (Pietta, 2000), présents dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles (Peluso, 2006). Ils agissent de différentes façons soit par effet scavenger directe (**figure 13**), soit par chélation de métaux de transition empêchant ainsi la réaction de Fenton (**figure 14**) soit par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production de ROS comme la xanthine oxydase (Halliwell, 1994).

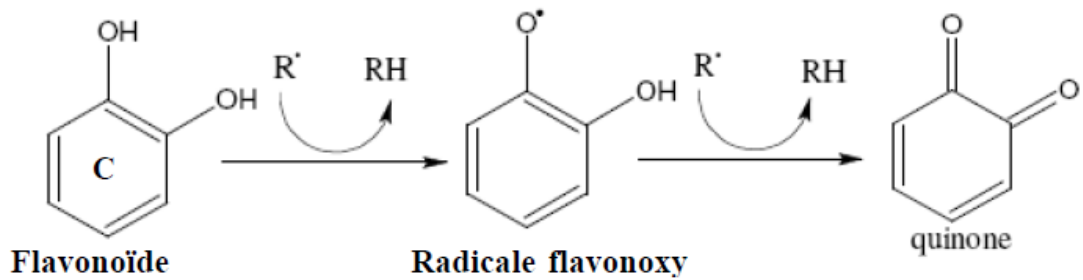


Figure 13. Effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres (Jovanovic *et al.*, 1994).

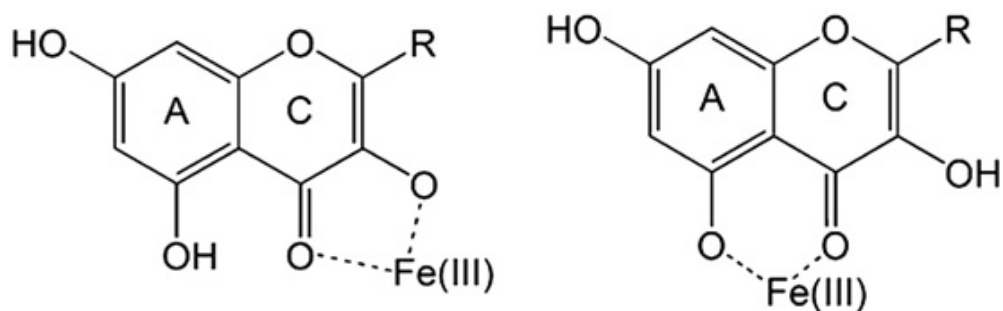


Figure 14. Sites probables de fixation de Fe^{3+} aux cycles A et C des flavonoles (Verdan *et al.*, 2011).

II.4.3. Autres antioxydants

Beaucoup de phyto-nutriments ont été identifiés comme antioxydants. Les plus importants sont les caroténoïdes, flavonoïdes, phénols, phytostérols et les glucosinolates. Ils ont des propriétés antioxydantes intéressantes comme piègeurs/inhibiteurs de radicaux lipidiques, des anions superoxydes, de l'oxygène singulet ou comme régulateur du système antioxydant (Dufour *et al.*, 2007 ; Gobert *et al.*, 2009).

La vitamine B₆ exercerait un rôle antioxydant indirect en favorisant la synthèse de cystéine à partir de la méthionine et ainsi renforcerait la production de GSH.

Des propriétés antioxydantes ont été attribuées à des acides aminés (méthionine, taurine, glutamine, N-acetylcystéine). Ils pourraient être des précurseurs directs ou indirects de la synthèse des GSH dont ils renforcent l'action et seraient capables de piéger et de neutraliser les ROS (Sayre *et al.*, 2005; Fisher-Wellman et Bloomer, 2009).

Des protéines comme la ferritine, l'albumine, la bilirubine, la protéine du choc thermique pourraient agir directement sur les ROS ou indirectement par captation de métaux redox actifs (Finaud *et al.*, 2006; Duarte et Jones, 2007).

L'acide alfa-lipoïque participerait à la régénération des GSH et des vitamines C et E (Lyn Patrick, 2006). L'ubiquinone, pourrait piéger les radicaux superoxydes formés lors des phosphorylations oxydatives (mitochondries) et régénérer les vitamines C et E oxydées (Crane, 2001).

Le pollen, les oestrogènes (Pincemail *et al.*, 2007), les pyridines nucléotides (Sayre *et al.*, 2005), le lactate (Hellsten *et al.*, 1996) sont susceptibles de posséder des propriétés antioxydantes.

Les oligoéléments (Cu, Zn, Se, Mn) ont des propriétés antioxydantes. Ils servent notamment de cofacteurs des enzymes antioxydantes (Berger, 2006).

III. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

III.1. Antibiotiques et leurs modes d'action

Certains antibiotiques sont naturels, ils sont synthétisés par des microorganismes tels que la vancomycine et la streptomycine produits par *Streptomyces sp*, la pénicilline et la céphalosporine produits par *Penicillium sp* et *Céphalosporium sp* respectivement. D'autres antibiotiques sont semi-synthétiques (ampicilline) et résultent de la modification des antibiotiques naturels par l'addition d'un groupement chimique. Plusieurs autres sont totalement synthétiques comme les sulfamides (Chambers et Sande, 1998).

Les antibiotiques empêchent la multiplication des bactéries en perturbant leurs métabolismes ou entraînent leurs destructions en s'attaquant directement à leurs structures indispensables comme la paroi cellulaire, les ribosomes, membrane plasmique et ADN (Chambers et Sande, 1998). Ces produits agissent par 5 modes différents qui sont résumés dans le **tableau 2**.

III. 2. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques d'une espèce bactérienne n'est pas un phénomène stable dans le temps. L'évolution est fonction du germe et de la nature de l'antibiotique. Le cas du *Staphylococcus aureus* est exemplaire puisque la déception fut à la mesure des espoirs suscités par la pénicilline. En 1941, moins de 1% des souches isolées étaient résistantes à la pénicilline; dès 1946, 14% des souches étaient résistantes et bientôt 38% en 1947. Tous les germes n'évoluent pas de la même façon et on peut évoquer un cas différent : *Streptococcus pyogenes* est toujours sensible à la pénicilline et l'utilisation de cet antibiotique dans les infections où ce germe est suspecté reste d'actualité (Thierry Eberlin, 1997).

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multi-résistantes. Elle se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique.

La résistance naturelle est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait, donc, partie du patrimoine génétique normal du germe. Elle constitue donc une caractéristique propre à l'espèce et délimite en fait le spectre d'activité des antibiotiques. On parle ici d'espèces insensibles. Si la bactérie acquies de nouveaux gènes capables de la rendre insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques, cette résistance devient acquise.

Tableau 2. Mécanismes d'action des antibiotiques (Prescott *et al.*, 2003).

Antibiotique	Mécanisme d'action
	Inhibition de la synthèse de la paroi
Pénicilline	Active les enzymes lytiques de la paroi.
Ampicilline	Inhibe les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne.
Vancomycine	Se fixe directement sur la terminaison D-Ala- D-Ala et inhibe la transpeptidation.
Bacitracine	Inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec l'action des transporteurs lipidiques qui transfèrent les précurseurs de ce polymère à travers la membrane cellulaire.
	Inhibition de la synthèse protéique
Streptomycine	Se fixe à la sous unité 30S du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique et provoquer des erreurs dans la lecture de l'ARNm.
Gentamicine	
Chloramphénicol	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et empêche la formation des liaisons peptidiques par l'inhibition de la peptidyl-transférase.
Erythromycine	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique.
	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques
Ciprofloxacine et autres quinolones	Inhibe l'ADN gyrase bactérienne et donc interfère avec la répllication de l'ADN, la transcription et autres activités impliquant l'ADN.
	Destruction de la membrane cellulaire
Polymyxine B	Se fixe à la membrane cellulaire et perturbe sa structure et ses propriétés de perméabilité.
	Antagonisme métabolique
Sulfamide	Inhibe la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide p-aminobenzoïque.

Elle résulte, quant à elle, de l'utilisation des antibiotiques et ne concerne qu'un certain nombre de souches, qui se distinguent ainsi des souches sauvages au sein d'une espèce bactérienne donnée. On parle donc ici de souches insensibles. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation (phénomène rare, environ 10% des cas), soit par transfert (mécanisme le plus fréquent) d'ADN, de plasmides ou de transposons (Yala *et al.*, 2001; Mesaros *et al.*, 2005).

- L'information génétique est portée par des plasmides, transférables à d'autres bactéries par conjugaison, transduction ou transformation.
- Les transposons sont des fragments d'ADN (sauteurs) qui peuvent s'intégrer soit dans le chromosome soit dans des plasmides, en allant de l'un à l'autre (Mesaros *et al.*, 2005).

Les mécanismes de la résistance acquise (**figure 15**) sont de mieux en mieux connus. Les bactéries mettent en jeu 4 types de stratégies qui sont toutes sous contrôle génétique, à savoir la stratégie offensive dont la bactérie produit une enzyme capable d'inactiver l'antibiotique telle la β lactamase, la stratégie d'évitement qui consiste à une modification de la cible de l'antibiotique qui rend ce dernier inefficace, la stratégie de contournement où l'antibiotique atteint sa cible et interagit avec elle, mais la bactérie est capable d'utiliser d'autres voies métaboliques pour compenser le manque d'activité de la cible primaire et enfin, la stratégie de la protection physique, qui consiste soit à empêcher l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie, soit à l'expulser, c'est le phénomène d'efflux actif (Mesaros *et al.*, 2005).

- La plus part des transporteurs peuvent être surproduits sous l'effet de mutations. Si la mutation affecte un transporteur à large spectre, elle peut conférer une multirésistance atteignant de nombreuses classes d'antibiotiques souvent non apparentées (Le *et al.*, 2001)
- Les mécanismes d'efflux peuvent coopérer avec d'autres mécanismes pour déterminer un haut niveau de résistance. Par exemple, la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux β lactamines résulte le plus souvent de la combinaison d'une faible perméabilité, de la présence et la surexpression du transporteur MexAB-OprM et de l'activité d'une β -lactamase de type AmpC (Okamoto *et al.*, 2001).
- L'expression concomitante de plusieurs pompes à efflux reconnaissant le même antibiotique peut entraîner une résistance de haut niveau, et la co-expression de plusieurs pompes entraîne une multi-résistance (Llanes *et al.*, 2004).
- Les gènes codant pour des pompes à efflux sont parfois situés sur des plasmides ou des transposons. Ces éléments peuvent être facilement transférés d'une bactérie résistante à une bactérie sensible, ce qui entrainera la dissémination de la résistance non seulement au sein d'une espèce, mais aussi entre des espèces différentes (Mesaros *et al.*, 2005).

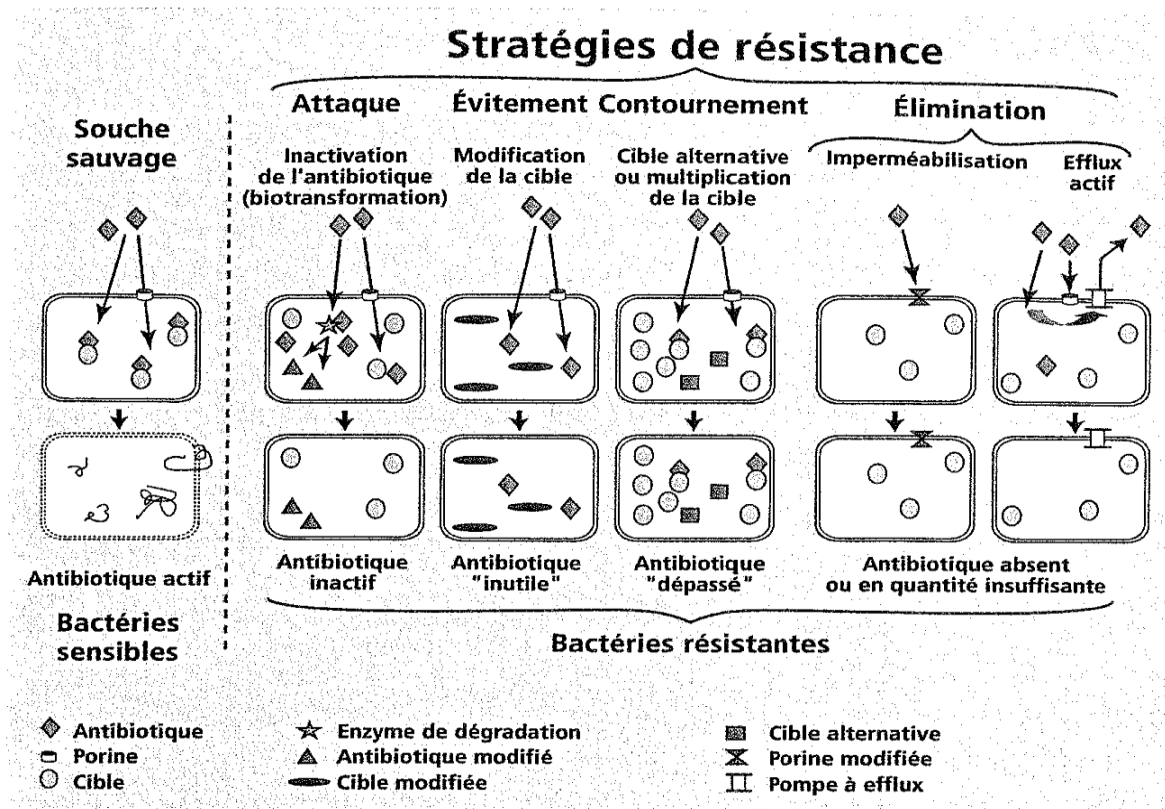


Figure 15. Principales stratégies mises par les bactéries pour résister à l'action des antibiotiques (Mesaros *et al.*, 2005).

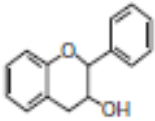
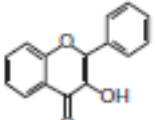
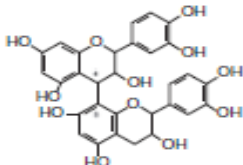
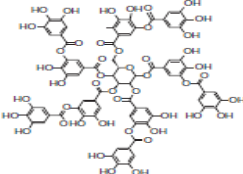
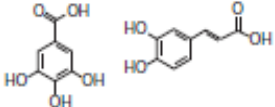
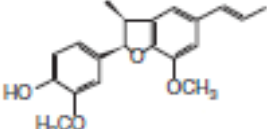
III. 3. Antimicrobiens naturels

L'accroissement des résistances bactériennes rend la thérapeutique empirique des infections bactériennes de plus en plus difficile. Pour cela, les recherches sont orientées vers la caractérisation de nouveaux agents antimicrobiens d'origine naturelle, plus précisément d'origine végétale qui peuvent substituer les antibiotiques classiques ou agir d'une manière synergique avec ces derniers. Les plantes synthétisent différents métabolites secondaires comme les phénols et leurs dérivés. Ces substances qui constituent un moyen de défense pour les plantes contre leurs différents prédateurs sont souvent pourvues de remarquables activités antimicrobiennes (Nitta *et al.*, 2002 ; Kordali *et al.*, 2008). Parmi ces substances on peut citer:

III. 3. 1. Polyphénols

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, cette diversité est probablement reliée à leurs diversités structurales (**tableau 3**).

Tableau 3. Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Daglia, 2011).

Structures des composés phénoliques	Microorganismes sensibles	Exemples
 <p>Flavane-3-ol</p>	Bactéries	<i>V.cholerae</i> , <i>S.mutans</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>C.perfringes</i> , <i>E.coli</i> , <i>B. Cereus</i> , <i>H. pylori</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>C. pneumonia</i>
	Virus	Adénovirus, Entérovirus, Flu virus.
 <p>Flavonole</p>	Champignons	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
 <p>Tannins condensés</p>	Bactéries	<i>S.mutans</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> .
	Virus	Virus de l'influenza A, type -1 herpes simplex virus (HSV).
 <p>Tannins hydrolysables</p>	Bactéries	Différentes souches de: <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Campylobacter</i>
	Virus	Le virus Epstein-Barr, les virus Herpes HSV-1 et HSV-2.
	Champignons	<i>Candida parapsilosis</i> .
 <p>Acides phénoliques</p>	Bactéries	<i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> .
 <p>Néolignane</p>	Bactéries	Différentes souches de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .

III. 3. 1. 1. Phénols simples et acides phénoliques

Les phénols sont généralement bactéricides vis-à-vis des bactéries Gram⁺ et Gram⁻. Cet effet est probablement dû à l'inhibition de certaines enzymes (Elzaawely *et al.*, 2005; Taguri *et al.*, 2006). L'hydrophobie des polyphénols est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens (Daglia, 2011). La déstabilisation de la membrane cytoplasmique pour la rendre perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries (Daglia, 2011).

III. 3. 1. 2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve. En effet, ils sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Babayi *et al.*, 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska *et al.*, 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis*... etc. (Didrak 1999, Okigbo *et al.*, 2005). Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. L'apigénine n'a montré qu'une faible activité sur *Staphylococcus aureus*, tandis que la galangine l'a inhibé (Basile *et al.*, 1999, Cushnie *et al.*, 2003, Martini *et al.*, 2004).

Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (Ulanowska *et al.*, 2006). Certaines études ont donné l'explication de cette activité antibactérienne, on peut citer l'exemple de la quercétine qui agit sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli*, soit par fixation sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité ou par blocage du site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase. (Dadi *et al.*, 2009). La rutine inhibe les topoisomérases de décaténation de l'ADN chez *Escherichia coli* et stimule leur clivage (Bernard *et al.*, 1997). Les catéchines inhibent la synthèse de l'ADN et de l'ARN chez *Protéus vulgaris* et *Staphylococcus aureus* (Mori *et al.*, 1987).

Les flavonoïdes sont capables aussi de détruire la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes (Kusuda *et al.*, 2006) ou de changer sa fluidité (Tsuchiya et Linuma, 2000). Les catéchines provoquent une perte de biomolécules intracellulaires chez *Staphylococcus mutans* via le changement de la perméabilité membranaire (Cushnie *et al.*, 2005). Les flavonoïdes peuvent aussi interférer avec le métabolisme énergétique des bactéries. En effet, les

retrochalcones et le flavanone lonchocarpole A inhibent fortement la consommation de l'oxygène (Haraguchi *et al.*, 1998).

III. 3. 1. 3. Tannins

Les tannins sont des molécules polyphénoliques. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les graines des plantes. La plupart des propriétés biologiques des tannins sont liées à leur pouvoir de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines (Mc Manus *et al.*, 1981) .

Les tannins ont la capacité d'éliminer un nombre de facteurs de virulence microbienne. Ils peuvent inhiber la formation de biofilms, réduire l'adhésion aux ligands de l'hôte et neutraliser des toxines bactériennes, comme ils peuvent établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia, 2011).

IV. PLANTAGO LANCEOLATA L.

Plantago lanceolata L. est une plante vivace de la famille des *plantaginaceae*, communément appelé plantain lancéolé, bonne femme, herbe à cinq côtes, herbe à cinq coutures, oreille de lièvre, petit plantain (Girre, 2001), localement il est appelé lissan-el-haml. Le nom *Plantago* est issu du latin *planta* (plante à pieds) qui rappelle la forme des feuilles (Ghedira *et al.*, 2008)

IV.1. Classification botanique de *Plantago lanceolata* (Ghedira *et al.*, 2008)

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta

Superclasse : Tricolpées

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Superordre : Euastéridées I

Ordre : Lamiales

Famille : Plantaginaceae

Tribu : Plantaginae

Genre : *Plantago*

Espèces : *Plantago lanceolata* L.

IV.2. Aspect botanique de *Plantago lanceolata*

Plantago lanceolata L. est une plante herbacée vivace à fleurs se reproduisant par des graines (**figure 16**). Le rhizome est court et comporte de nombreuses racines, petites, fines et pivotantes qui confèrent à la plante une certaine tolérance à la sécheresse (Moore *et al.*, 2006). La tige est simple, nue sans feuilles, florifère. Les feuilles sont vertes, opposées et disposées en rosettes à la base de la plante. Les fleurs sont de 10 à 20 cm de long, rassemblées en épis denses et cylindriques. Chaque fleur est à pétales libres, séparés les uns des autres jusqu'à la base et se détachant un par un. Son épi est très serré de petites fleurs sans couronne de bractées; 4 pétales verts ou bruns, scarieux, 4 étamines pendant hors de l'épi, à long filet (Ghedira *et al.*, 2008).



Figure 16. Photographie de *Plantago lanceolata*.

IV.3. Composition chimique

Plusieurs études phytochimiques ont montré que *P. lanceolata* contient une amalgame de métabolites secondaires dans les diverses parties de la plante. Selon Fons et ses collaborateurs (1998), *P. lanceolata* renferme plusieurs groupes de molécules actifs comme les mucilages, les iridoïdes, les tannins, les coumarines et les flavonoïdes. Plus récemment, il a été apporté la richesse du genre *Plantago* en polysaccharides, lipides, dérivés d'acides caféiques, iridoïdes glucosylés, terpènes, alcaloïdes et acides organiques (Jamilah *et al.*, 2012).

IV.4. Propriétés biologiques

Les métabolites secondaires du *P. lanceolata* confèrent à cette plante plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques. Il a été montré que l'extrait éthanolique de cette plante exerce une activité anti-spasmodique. La lutéoline, l'actéoside, plantamajoside et le peracetate de catalpol sont responsables de cet effet (Fleer et verspohl, 2007). Une étude portant sur un extrait alcoolique de *P. lanceolata* a prouvé son pouvoir anti-inflammatoire qui est dû à l'inhibition de la production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages (Vigo *et al.*, 2005). Une autre étude a attribué l'activité anti-inflammatoire de *Plantago major* et *P. lanceolata*, *in vitro*, à leur activité anti COX-1 et anti LOX (Beara, *et al.*, 2010). Les extraits de *plantago lanceolata* et *plantago major* sont des antiphlogistiques dans les systèmes d'inflammation induits par la carragénine et le PGE1 chez des rats (Shipochliev *et al.*, 1981).

Les polysaccharides isolés de *Plantago* augmentent la phagocytose de 15 à 50 % dans des modèles *in vitro* (Wichtl et Anton, 1999).

L'effet antitussif de *plantago lanceolata* a été démontré par Boskabady *et al.* (2006), qui ont trouvé que l'extrait méthanolique est doté d'un effet antitussif comparable à celui de la codéine. Cette activité, serait due aux propriétés anti-inflammatoires de la plante. L'extrait méthanolique des feuilles de *plantago major* favorise la production de TNF alpha et de NO dans des macrophages péritonéaux de rats (Gomez, 2000). Ce même extrait contenant de la lutéoline-7-O-glucoside possède une activité antiproliférative des cellules cancéreuses humaines. La lutéoline a une bonne activité cytotoxique envers la topoisomérase I (Galvez *et al.*, 2003).

Hassawi et Kharma (2006) ont montré une activité antimicrobienne des extraits du *Plantago lanceolata* contre *Candida albicans*. AL-Jumaily *et al.* (2012) ont identifié chez le *Plantago lanceolata* deux types d'acides tanniques doués d'activité antibactérienne contre *E. coli*. D'après ces auteurs, cette activité serait due à l'habilité des tannins d'inactiver l'adhésion microbienne, les enzymes et le transport des protéines membranaires.

Plantago a aussi un pouvoir cicatrisant dû à la présence d'allantoïnes et de tanins (Ticli, 1999).

L'extrait aqueux de *plantago major* a une activité contre le virus de l'herpès (Chiang *et al.*, 2002).

IV.5. Usage traditionnel

Plantago lanceolata est l'une des plantes médicinales les plus employées dans le monde (Kolak *et al.*, 2011). Elle est connue pour ces vertus astringentes, cicatrisante et propriétés ophtalmiques. La tradition attribue à cette plante des propriétés anti-inflammatoires et antitussives. La plante fraîche est également appliquée sur les contusions et les piqûres d'insectes, de même, le suc de la plante fraîche est utilisé lors du saignement de nez. Des propriétés antiseptiques, émolliente et vulnéraires justifient son usage sur les plaies, les contusions et les ulcères cutanés (Ticli, 1999 ; Tutel *et al.*, 2005 ; Hassawi et Kharma, 2006 ; Kolak *et al.*, 2011). En infusion, cette plante est utilisée en cas d'entérite, diarrhée, toux, troubles des voies respiratoires, rhume, amygdalite. Les feuilles de *plantago* sont utilisées, en usage externe, dans l'irritation des paupières. *Plantago* est parfois utilisé pour soigner l'hypertension artérielle, les ulcères et les tumeurs, comme il est utilisé comme agent analgésique et antirhumatismal (Kolak *et al.*, 2011; AL-Jumaily *et al.*, 2012).

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La plante *Plantago lanceolata* a été récoltée entre mai et juin 2012 de la région de Bougaa, au Nord de Sétif. L'identification a été faite par Dr. Boulaachab N. (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Sétif 1). La partie aérienne a été nettoyée, séchée à température ambiante et à l'ombre puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

I.2. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris *Swiss albinos*, mâles et femelles pesant entre 25 et 30g, et des rats femelles *Albino Wistar* pesant entre 170 et 195g, procurés aux près de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux repartis en groupes comportant 7 rats ou 10 souris sont hébergés dans des cages en polypropylène à température ambiante et à cycle naturel de la lumière, avec accès libre à l'eau et à l'alimentation. Les aliments sont fournis par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'El-Ksar -Bejaia. Après une période d'adaptation de 7 jours, les animaux sont pesés, marqués, et soumis à jeun pendant une nuit avant leur utilisation.

I.3. Bactéries

Dix souches bactériennes ATCC Gram⁻ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) et Gram⁺ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) nous ont été fournies par le laboratoire de Substances Naturelles de Tlemcen ont été utilisées pour tester l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique de la plante. Ces bactéries sont conservées dans le milieu MHB (Muller Hinton Broth) additionné de 10% (V/V) de glycérol à -20°C.

Pour la réalisation des antibiogrammes, les bactéries sont cultivées sur un milieu solide de Mueller Hinton (Bio Rad).

I.4. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH), 3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1, 2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt (Ferrosine), β -carotène, Tween 20, Tween 40, acide trichloracétique (TCA), acide

ethylenediamine tétraacétique (EDTA), thiocyanate de potassium (KCN), FeCl₃, réactif de Folin-Ciocalteu, acide gallique, acide tannique, quercétine, ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆], Na₂CO₃, Indométacine, λ carragénine, acide acetylsalicylique (Aspirine) et l'huile de croton, qui proviennent tous de Sigma (Allemagne). Le chlorure ferreux (FeCl₂), Acide linoléique et 2, 6 di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) proviennent de Fluka (France). Les sels utilisés pour la préparation des tampons ainsi que les solvants sont obtenus de Panreac, Riedel-de Haën et Prolabo. Les disques d'antibiotiques de références utilisés dans cette étude comportant l'amoxicilline (Amox) à 25µg/disque.

I.5. Solutions de travail

- Acide gallique (200 µg/ml), préparé dans l'eau distillée.
- Carbonate de sodium Na₂ CO₃ (7,5 %), préparé dans l'eau distillée.
- Réactif de Folin (10%) dans l'eau distillée.
- Quercétine (100 µg/ml), préparée dans le méthanol.
- AlCl₃ (2%), préparé dans le méthanol.
- Acide tannique (1mg/ml), préparé dans le méthanol.
- Solution de DPPH (0,1mM) dilué par l'éthanol.
- BHT (1 mg/ml pour le test DPPH, 2mg/ml pour les autres tests), préparé dans le méthanol.
- Solution de FeCl₂ (0,6mM), préparée dans l'eau distillée (test de chélation du fer ferreux).
- Ferrosine (5 mM), préparée dans le méthanol 80%
- EDTA (100 µg/ml), préparé dans l'eau distillée.
- β-carotène (0,5 mg/ml) : préparée dans le chloroforme.
- Thiocyanate de potassium (30%), préparé dans l'eau distillée.
- FeCl₂ (0,4%), préparé dans de l'HCl 3,5% (test de peroxydation de l'acide linoléique).
- FeCl₃ (0,1%), préparé dans l'eau distillée.
- TCA (10%), préparé dans le tampon phosphate (0.2M, pH 6,6).
- K₃Fe(CN) 1%, préparé dans le tampon phosphate (0.2M, pH 6,6).
- Solution de l'huile de Croton 5,33 mg/ml, préparée dans acétone-eau (1:1).
- Aspirine (200 mg/kg) dissoute dans du NaCl 0.9% contient 0.5% du CMC.
- Carragénine (1%) dans du NaCl 0.9% stérile.
- Les solutions des extraits aqueux et méthanolique de *Plantago lanceolata* et d'indométacine utilisées dans les essais *in vivo* sont préparées dans du NaCl 0.9%.
- Milieu Mueller Hinton (38g/l), préparé dans de l'eau distillée.
- Bouillon nutritif Mueller Hinton (26g/l), préparé dans de l'eau distillée.

II. Méthodes

II.1. Extraction

II.1.1. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux (E. Aq) de la partie aérienne de *P. lanceolata* est préparé selon la méthode de Motamed et Naghibi (2010) avec quelques modifications. Brièvement, 100 g de poudre de la partie aérienne de *P. lanceolata* sont mis à bouillir pendant 20 minutes dans 1000 ml d'eau distillée. Après filtration sur papier filtre, une centrifugation à 3000t/min pendant 15min est réalisée. Le surnageant obtenu est séché par étuvage à 40°C jusqu'à l'obtention d'une poudre brune qui sera conservée à -32°C jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Préparation de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique (E. Met) est préparé selon la méthode de Motamed et Naghibi (2010) avec de légères modifications. Une pesée de 100 g de la partie aérienne de *P. lanceolata* broyée est mise à une macération dans 1000 ml du mélange méthanol/eau (8:2 V/V) sous agitation pendant 24 heures, à l'ombre et à température ambiante. Après filtration, le filtrat est récupéré cependant, le résidu est remis pour une seconde macération dans 1000 ml de méthanol 50% pendant 24 heures et sous agitation. Après filtration, le méthanol est évaporé sous pression réduite à 40°C dans un rotavapeur (BÜCHI). La solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre brune qui sera conservée à -32°C jusqu'à son utilisation.

II.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en composés phénoliques solubles des deux extraits de *P. lanceolata* est estimée par le réactif du Folin-Ciocalteu selon la méthode de Li et ses collaborateurs (2007). Brièvement, 100µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de l'acide gallique sont mélangés avec 500µl du réactif du Folin-Ciocalteu dilué au 1/10. Après 4min, 400µl de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 7.5%) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765nm après 1h 30min d'incubation contre un blanc dépourvu de l'échantillon à tester qui a été remplacé par le solvant. La concentration en polyphénols dans chaque extrait est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait), et calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**figure 17**).

II.3. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des extraits de *P. lanceolata* a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) décrite par Bahorun *et al.* (1996). Brièvement, 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'extrait à différentes concentrations préparées dans le méthanol. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. La

concentration des flavonoïdes dans les extraits est déduite à partir d'une droite d'étalonnage établie avec de la quercétine (**figure 18**), et est exprimée en µg d'équivalents de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

II.4. Dosage des tannins

La méthode de Bate-Smith (1973) qui se base sur la précipitation de l'hémoglobine du sang frais des ovins est utilisée pour déterminer la teneur en tannins des extraits de *P.lanceolata*. Brièvement, un volume de sang hémolysé est mélangé avec un volume d'échantillon à différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 20 min à température ambiante. Après une centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C, l'absorbance du surnageant est lue à 576 nm contre l'eau distillée. Une gamme d'étalonnage est établie avec de l'acide tannique (**figure 19**). La teneur en tannins des extraits est exprimée en µg d'équivalents d'acide tannique par mg d'extrait (µg EAT/mg d'extrait). Le taux de précipitation de l'hémoglobine des deux extraits est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de précipitation (\%)} = [(Ac - At)/Ac] \times 100$$

Ac: absorbance du contrôle.

At: Absorbance du test.

II.5. Activité anti-inflammatoire

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *P. lanceolata*, deux modèles d'inflammation aigue ont été utilisés: l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton et l'œdème de la patte induit par la carragénine.

II.5.1. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

L'effet anti-œdémateux des deux extraits de *P. lanceolata* a été examiné en utilisant l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton (Manga *et al.*, 2004). Afin de provoquer une inflammation cutanée, les souris reçoivent sur la face interne de l'oreille droite 15µl d'une solution acétone-eau (1:1) contenant 80 µg d'huile de Croton comme agent irritant.

Les souris traitées reçoivent localement 2 mg/oreille d'E. Aq, ou d'E. Met ou 0,5 mg d'indométacine, simultanément avec l'agent phlogogénique. L'épaisseur de l'oreille est mesurée par un pied à coulisse digital avant le traitement et 6 heures après l'induction de l'inflammation (Delaporte *et al.*, 2004). La différence de l'épaisseur avant et après l'application de l'agent phlogogénique est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin (qui reçoit uniquement la solution de l'huile de croton) selon la formule suivante :

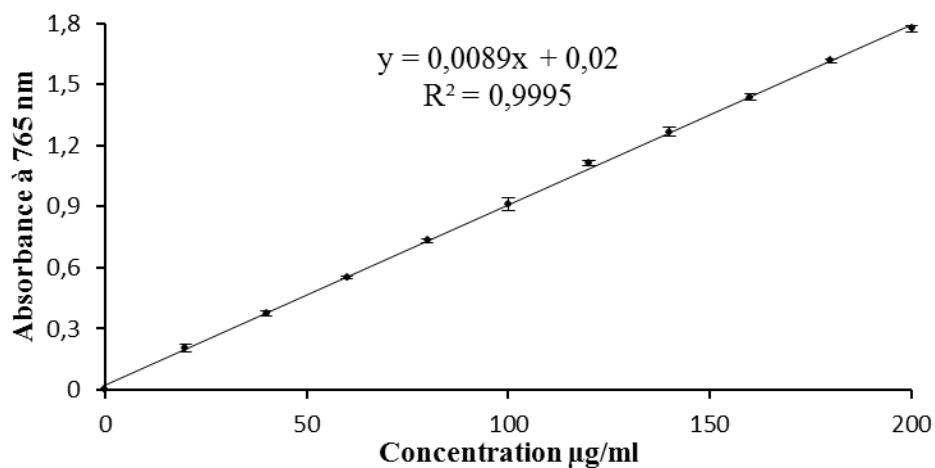


Figure 17. Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

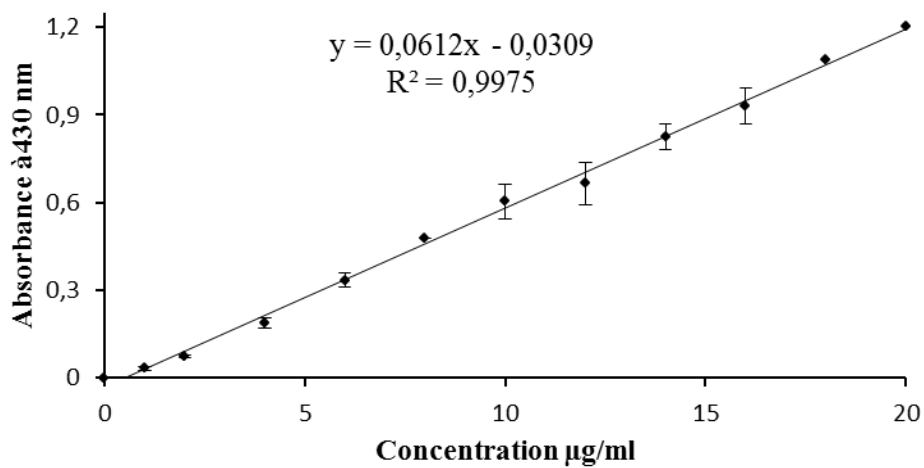


Figure 18. Droite d'étalonnage de la quercétine.

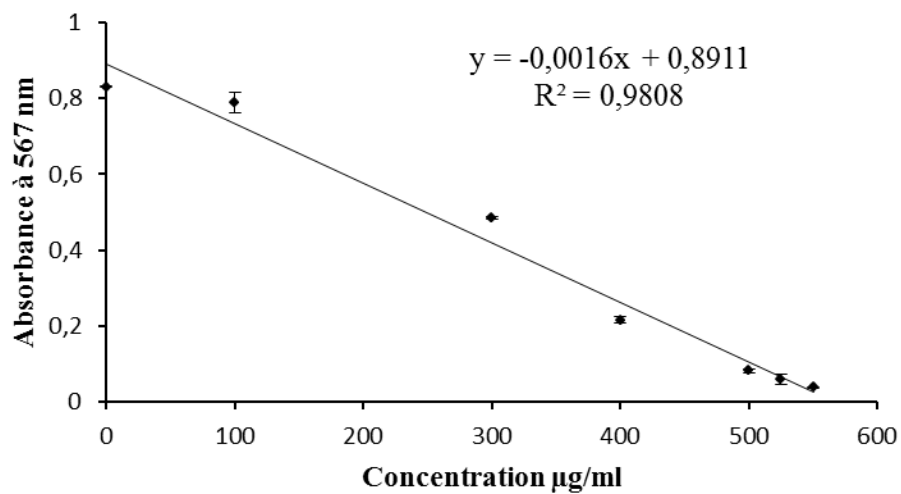


Figure 19. Droite d'étalonnage de l'acide tannique.

Taux d'inhibition = $(\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ Traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$

$\Delta \text{ Témoin}$: différence d'épaisseur pour le groupe témoin.

$\Delta \text{ Traité}$: différence d'épaisseur pour le groupe traité.

II.5.2. Œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat

L'inflammation aigüe a été provoquée par l'injection de 0,1 ml de carragénine (1%) sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite du rat (Khabbal *et al.*, 2006). Les rats traités reçoivent oralement deux doses (200 et 400 mg/kg) de l'E. Aq ou de l'E. Met de *P. lanceolata* 1 heure avant l'induction de l'œdème. L'aspirine (200 mg/kg) est utilisé comme anti-inflammatoire de référence. Les rats des groupes témoins (contrôle positif et contrôle négatif) n'ont reçu qu'une solution saline isotonique (NaCl 0.9 %). La solution de carragénine a été remplacée chez les témoins négatifs par 0.1 ml de NaCl 0.9 %. Le volume des pattes enflammées est mesuré à l'aide d'un pléthysmomètre (Hugo Basile, Germany) avant l'administration de la carragénine et 30 min après traitement, puis chaque 1 heure jusqu'à 6h. . Le pourcentage de l'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

Taux d'inhibition = $(\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ Traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$

$\Delta \text{ Témoin}$: différence de volume pour le groupe témoin.

$\Delta \text{ Traité}$: différence de volume pour le groupe traité.

II.6. Activité antioxydante

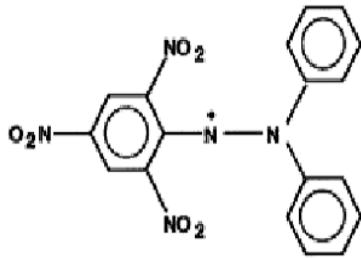
II.6.1. Test de DPPH

L'activité anti-radicalaire des extraits a été évaluée par le test de DPPH (Que *et al.*, 2006) qui est un radical libre stable caractérisé par une couleur violette en solution dans l'éthanol. Il présente une forte absorbance à 517 nm. L'ajout d'un antioxydant dans une solution de DPPH, conduit à sa réduction (**Figure 20**) et sa transformation en un composé jaune. Cette décoloration est directement proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel (Mosquera *et al.*, 2007). Elle permet d'évaluer le taux de réduction du DPPH et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir anti-oxydant des extraits étudiés.

Pratiquement, 2 ml d'extrait ou de l'antioxydant standard BHT à différentes concentrations sont mis dans 2 ml de solution éthanolique de DPPH (0.1mM). Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 30 min. et la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm contre un blanc d'éthanol. L'activité anti-radicalaire est déterminée selon l'équation suivante : $\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$

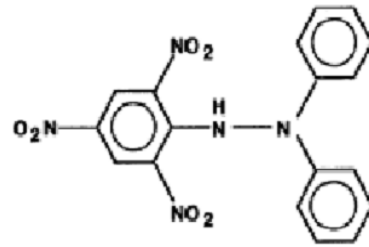
Ac: absorbance du contrôle.

At: Absorbance du test.



1: Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)

Pourpre



2: Diphenylpicrylhydrazyl (non radicalaire)

Jaune

Figure 20. La forme radicalaire et la forme réduite de DPPH.

La concentration ayant la capacité de piéger 50% du radical DPPH (IC_{50}) a été déterminée.

II.6.2. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits a été évaluée selon la méthode décrite par Le et ses collaborateurs (2007). Sept cent microlitres de solutions d'extraits à différentes concentrations sont mélangées avec 50 μ l de $FeCl_2$ (0.6 mM). Après 5 min d'incubation, 50 μ l de ferrozine (5mM) sont ajoutées au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé réagir à température ambiante pendant 10 min, le temps nécessaire à la complexation du fer résiduel et la formation d'un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrosine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. L'EDTA est utilisé comme chélateur de référence, le contrôle négatif est préparé de la même manière en remplaçant l'échantillon à tester par l'eau distillée. La lecture est effectuée contre un blanc de méthanol.

L'activité chélatrice des extraits étudiés est exprimée en pourcentage et calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle à 562 nm.

At : Absorbance de l'échantillon à 562 nm.

Les concentrations (EC_{50}) des deux extraits qui produisent 50% d'activité chélatrice ont été calculées.

II.6.3. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *P.lanceolata* est déterminé selon le protocole décrit par Rohit *et al.* (2012) avec quelques modifications. Des solutions d'extraits et de l'antioxydant de référence à différentes concentrations sont initialement mélangées avec 2.5 ml du tampon phosphate (200mM, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanide de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). Après 20 minutes d'incubation à 50°C, 2.5 ml de TCA (10%) sont additionnés au milieu réactionnel, le mélange est centrifugé à 800 rpm pendant 10

minutes. Ensuite, 2.5 ml de surnageant sont mélangés avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de FeCl₃ (0.1%) et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc sans FeCl₃. L'absorbance est directement proportionnelle au pouvoir réducteur. La valeur EC₅₀ est calculée à partir de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

II.7. Technique de diffusion sur l'agar pour l'évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique de *P. lanceolata* a été évaluée par la technique de diffusion sur l'agar (Falleh *et al.*, 2008) vis-à-vis de 6 souches bactériennes Gram⁻ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) et 4 souches Gram⁺ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313). Les différentes espèces bactériennes sont d'abord repiquées par la méthode des stries sur milieu Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure sont prélevées et transférées dans l'eau physiologique à une turbidité équivalente à 0.5 Mc Farland, ce qui est traduit par une absorbance comprise entre 0.08 et 0.1 à 625 nm (Rahal, 2005). Un prélèvement à partir de cet inoculum sert à ensemercer de nouvelles boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton par la technique d'écouvillonnage. Des disques Wattman n°1 stérile de 6 mm de diamètre sont chargés avec 15 µl d'extraits aqueux ou méthanolique puis placés sur les boîtes. Les disques des contrôles négatifs sont imprégnés d'eau distillée. Des disques standards contenant l'antibiotique de référence (Amoxicilline) servent de contrôle positif. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h. La lecture des antibiogrammes est faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibition au tour de chaque disque.

II.8. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne ± SD et en moyenne ± SEM pour les tests *in vivo*. Les valeurs des IC₅₀ et des EC₅₀ sont déterminées à partir de la courbe [% inhibition = *f* (concentration)]. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA univarié suivi du test de Tukey. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 (p < 0.05).

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

I. Préparation des extraits, dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins

Après extraction aqueuse (usage traditionnel) et par l'alcool, les filtrats obtenus sont séchés et deux poudres fines hygroscopiques de couleur brune sont obtenues.

L'extrait aqueux de la partie aérienne de *P. lanceolata* a donné un rendement de 20%, qui est relativement élevé par rapport à celui de l'extrait méthanolique (17 %).

Le contenu des deux extraits aqueux et méthanolique en composés phénoliques, flavonoïdes et en tannins est résumé dans le **tableau 4**. Les résultats montrent que l'E. Met de *P. lanceolata* est plus riche en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins que l'E. Aq.

L'acide tannique induit une précipitation totale de l'hémoglobine à une concentration de 550 µg/ml. L'extrait aqueux a des effets tannants de 3%, 7% et 8% à des concentrations de 1, 1.5 et 2 mg/ml respectivement. A ces concentrations, l'extrait méthanolique exerce des effets tannants de 15%, 20% et 25% respectivement.

Tableau 4. Teneur des extraits aqueux et méthanolique de *P. lanceolata* en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

Extrait	Polyphénols (µg d'équivalent d'acide gallique/mg d'extrait)	Flavonoïdes (µg d'équivalent de quercétine/mg d'extrait)	Tannins (µg d'équivalent d'acide tannique/mg d'extrait)
Extrait aqueux	32.99 ± 3.47	11.40 ± 0,70	23.88 ± 4.07
Extrait méthanolique	86.50 ± 2.10	31.02 ± 1.15	48.71± 7.78

II. Activité anti-inflammatoire des extraits de *Plantago lanceolata*

II.1. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

L'effet anti-œdémateux d'un traitement local par l'extrait aqueux et méthanolique de *P. lanceolata* a été évalué en utilisant l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris comme modèle d'inflammation aigue. Les souris du groupe témoin ayant reçu uniquement la solution d'huile de croton ont développé au bout de 6 heures un œdème caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de l'oreille de 90 ± 9.7 µm.

Le traitement par 2 mg/oreille de l'extrait méthanolique a induit une atténuation très significative (p<0.001) de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin.

L'augmentation de l'épaisseur est de $10 \pm 3.00 \mu\text{m}$ seulement. L'inhibition est donc de 89%. Ce pourcentage d'inhibition est supérieur à celui obtenu avec l'indométacine utilisé comme anti-inflammatoire de référence. En effet, l'augmentation de l'épaisseur 6 heures après l'induction de l'inflammation par 0.5 mg/oreille d'indométacine est de $26 \pm 3,7 \mu\text{m}$, ce qui correspond à une inhibition de 72%. De même, une diminution très significative de l'œdème est observée chez les souris du groupe traité par 2 mg/oreille de l'extrait aqueux par rapport aux souris du groupe témoin. L'augmentation de l'épaisseur est de $22 \pm 2,5 \mu\text{m}$, soit un taux d'inhibition de 77%, un taux très proche à celui de l'indométacine mais significativement ($p < 0.01$) inférieur à celui exercé par l'extrait méthanolique (**figure 21**).

II.2. Effet des extraits sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat

Pour confirmer l'activité anti-inflammatoire des deux extraits de *P. lanceolata*, l'œdème de la patte a été induit chez les rats.

L'injection sous-plantaire de la carragénine a provoqué un œdème dont le maximum du volume est de $0.53 \pm 0.11 \text{ ml}$, 4 heures après l'induction de l'inflammation, soit un taux d'œdème de 79 %.

Les deux extraits de *P. lanceolata* ont exercé des effets anti-œdémateux d'une manière dose-indépendante. En effet, le prétraitement des rats par l'extrait aqueux de *P. lanceolata* aux doses de 200 et 400 mg/kg prévient de façon significative ($p < 0.01$) l'œdème. A 4 heures, les pourcentages de l'œdème étaient 18% et 16% pour les deux doses respectivement (**figure 22**). Les taux d'inhibition sont de 82% et 84% successivement.

L'extrait méthanolique a également diminué l'œdème après 4 heures à 32 % et 39% par les doses de 200 et 400 mg/kg respectivement, ce qui correspond à des taux d'inhibition de 67% et 54% respectivement (**figure 23**).

L'aspirine utilisée comme anti-inflammatoire de référence (200 mg/kg) a inhibé l'œdème après 4 heures avec un taux de 80%.

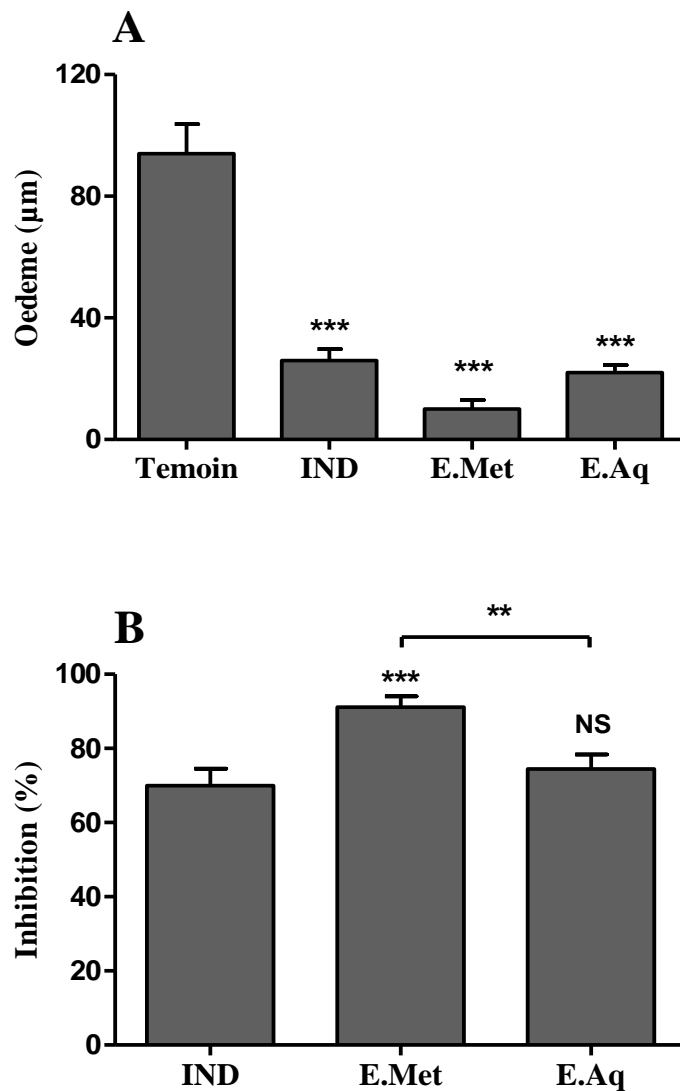


Figure 21. Effet de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de la partie aérienne de *P. lanceolata* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. L'œdème est induit par application topique de 80 µg de l'huile de croton sur la face interne de l'oreille droite. Les groupes de souris sont traités localement par 2 mg/oreille d'E. Aq ou E. Met ou par 0.5mg/oreille d'indométacine (IND). Le groupe de souris témoin reçoit uniquement la solution de l'huile de croton. **A** : Différence de l'épaisseur de l'oreille avant et six heures après l'induction de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à celle du groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n=10). *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, NS : non significatif (ANOVA univarié suivie du test de tukey).

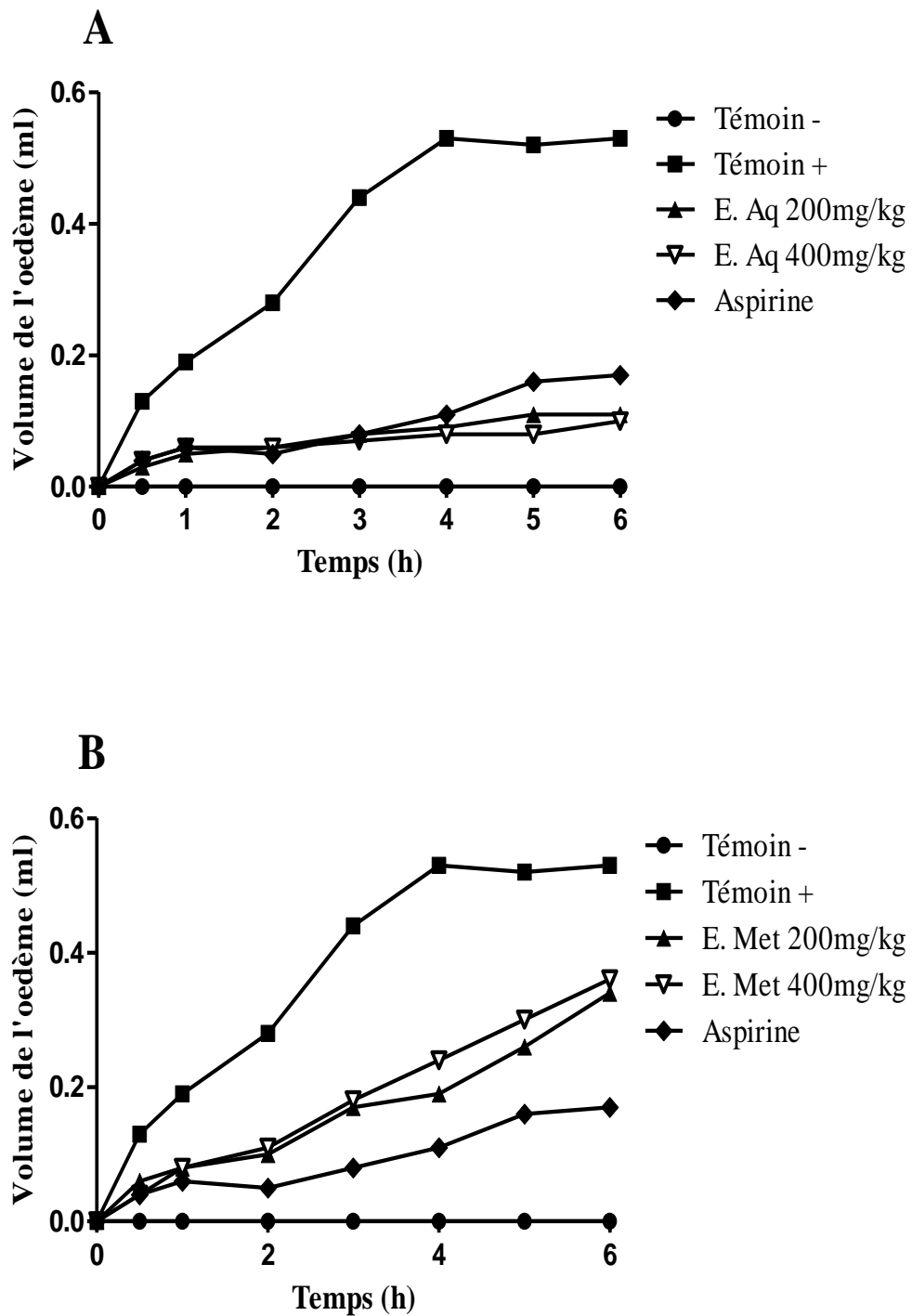


Figure 22. Effet de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de la partie aérienne de *P. lanceolata* sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat. L'œdème est induit par l'injection sous-plantaire de 0.1 ml de carragénine à 1% chez les rats prétraités oralement par le véhicule, l'aspirine (200 mg / kg), l'E. Aq (200 et 400 mg/kg) (A) ou l'E. Met (200 et 400 mg/kg) (B). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=7).

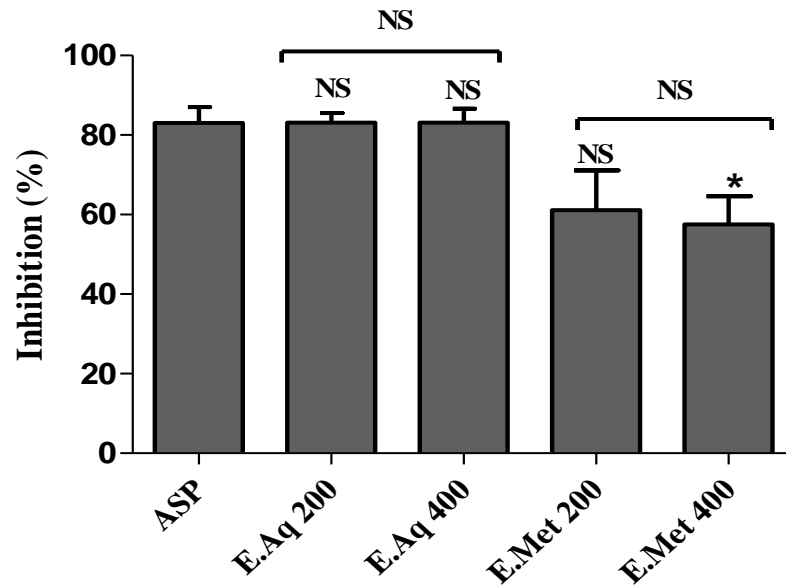


Figure 23. Effet de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de *P. lanceolata* sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat 4 heures après l'induction. L'œdème a été créé après le traitement orale des rats par 200 ou 400 mg/kg de l'E. Aq ou l'E. Met, ou par 200 mg/kg de l'aspirine. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition. La comparaison est faite par rapport au groupe de l'aspirine. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n = 7). * : $p < 0,05$, NS : non significatif (ANOVA univarié suivie du test de tukey).

III. Activité antioxydante des extraits de *Plantago lanceolata*

III.1. Activité antiradicalaire

Les résultats de la présente étude montrent que l'extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *P. lanceolata* possèdent un effet piègeur remarquable vis-à-vis du radical DPPH (**figure 24**). L'effet de l'E.Met est très proche de celui obtenu par l'antioxydant standard (BHT), alors que l'E. Aq a montré un effet relativement supérieur.

Les IC_{50} obtenus sont représentées dans le **tableau 5**. Les différences entre les extraits et le BHT et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatives ($p < 0.05$).

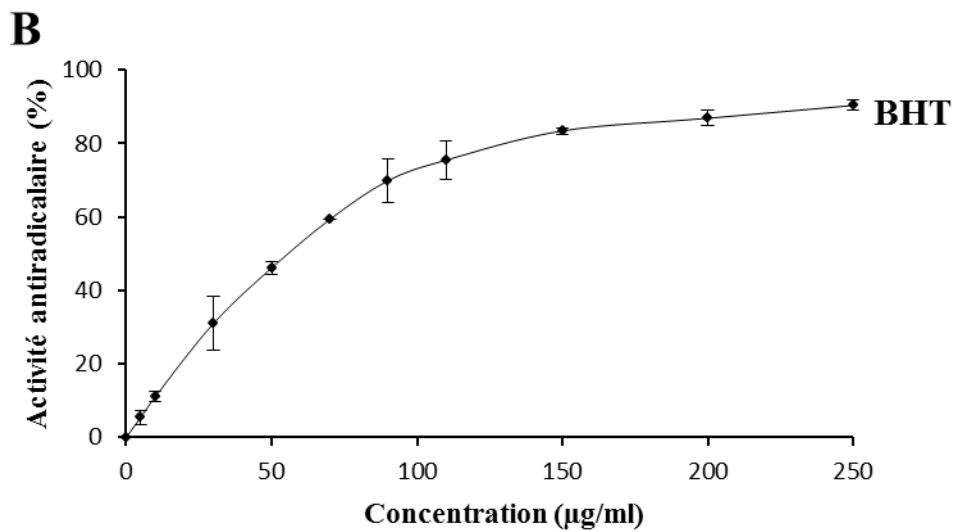
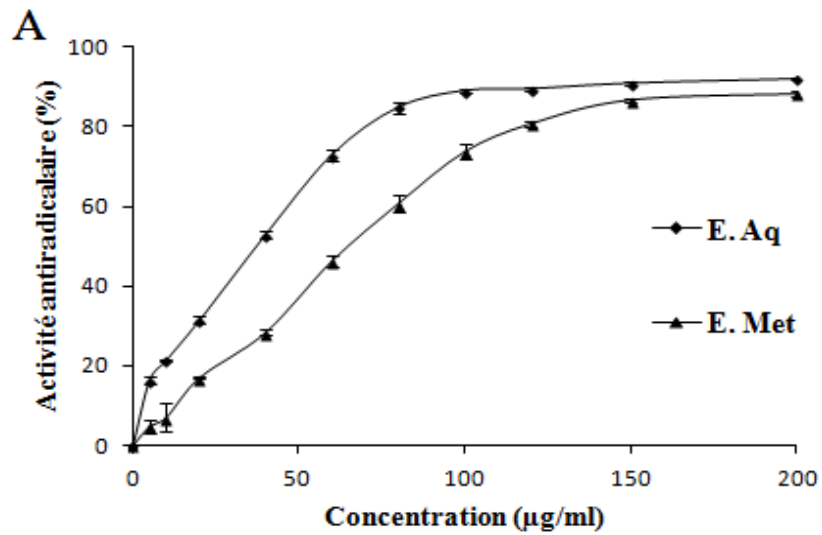


Figure 24. Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de la partie aérienne de *P. lanceolata* (A) et du BHT (B) vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Tableau 5. Valeurs des IC₅₀ des extraits de *P. lanceolata* et de BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

Echantillon	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait aqueux	38.94 ± 0,83
Extrait méthanolique	66,44 ± 1.04
BHT	58.64 ± 1,89

II.2. Effet chélateur du fer ferreux

Les effets chélateurs envers les ions ferreux des 2 extraits de *P. lanceolata* sont statistiquement significatifs ($p < 0.01$) et sont concentration dépendants (**figure 25**).

A 200µg/ml, l'E. Aq a montré un effet chélateur plus important (95%) que celui obtenu par l'E. Met (71%). L'EDTA utilisé comme chélateur de référence a exercé une chélation maximale de 100% à la concentration de 14µg/ml.

Le **tableau 6** montre les valeurs d'EC₅₀ obtenues avec l'E. Aq, l'E. Met de *P. lanceolata* et l'EDTA ainsi que les activités chélatrices exprimées en mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait.

III.3. Pouvoir réducteur

Les résultats montrent que les deux extraits de *P. lanceolata* possèdent un pouvoir réducteur remarquable ($p < 0.05$), concentration-dépendant (**figure 26**).

A la concentration de 250µg/ml, l'E. Met a montré un meilleur pouvoir réducteur que celui obtenu avec l'E. Aq. Le BHT montre une activité réductrice maximale à 50 µg/ml. Les EC₅₀ sont représentées dans le **tableau 7**.

Tableau 6. Valeurs EC₅₀ et l'activité chélatrice en termes d'équivalents d'EDTA des extraits de *P. lanceolata* et de l'EDTA. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

Echantillon	EC ₅₀ (µg/ml)	Activité chélatrice (mg E-EDTA/g d'extrait)
Extrait aqueux	53.61±1.51	111.42 ± 0.34
Extrait méthanolique	105.78 ± 14.56	57.08 ± 6.74
EDTA	5,97 ± 0,17	---

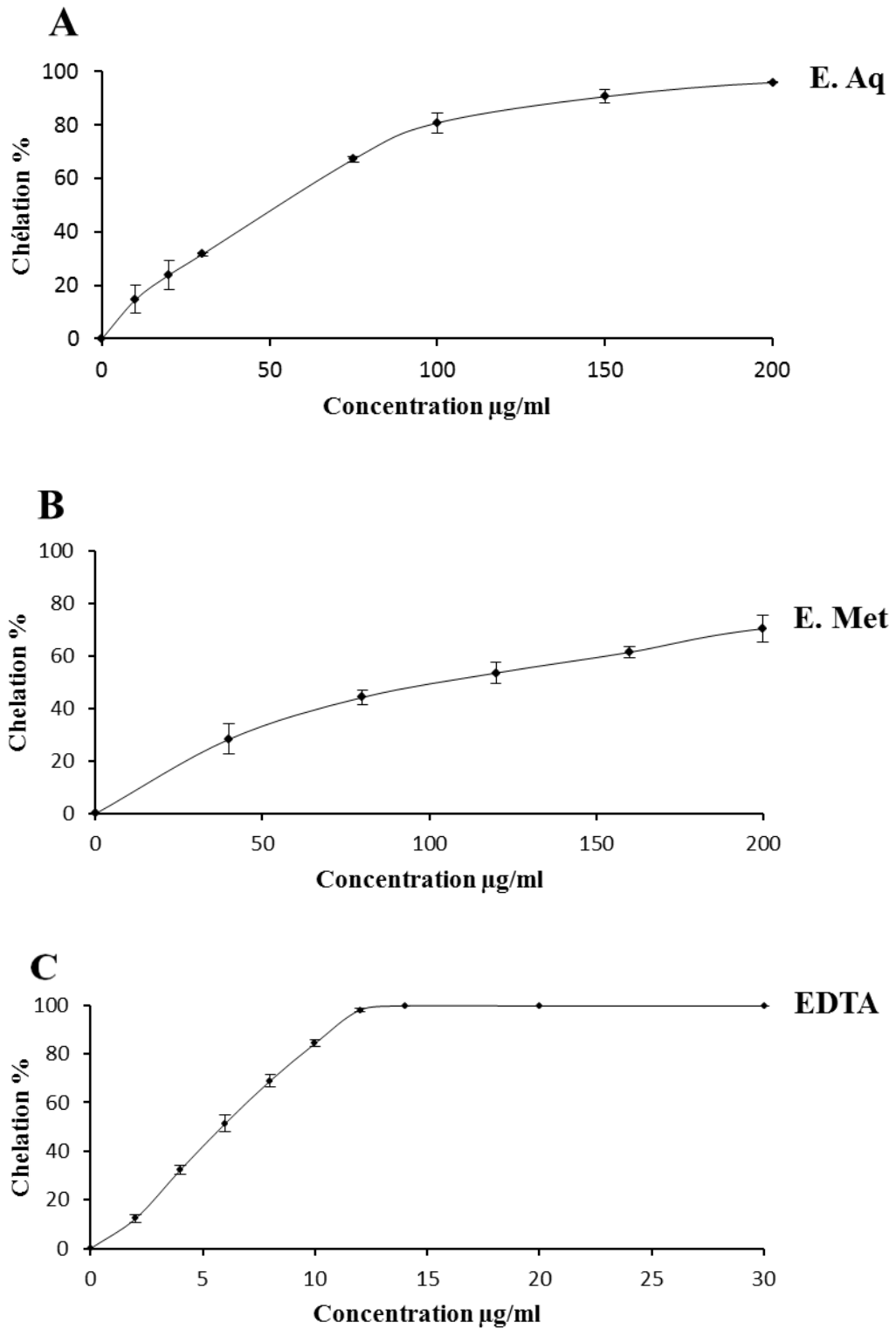


Figure 25. Activités chélatrices de l'extrait aqueux, E. Aq (A) et méthanolique, E. Met (B) de la partie aérienne de *P. lancéolata* et de l'EDTA (C) vis-à-vis du fer ferreux, exprimée en pourcentage de chélation. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Tableau 7. Les EC_{50} des extraits de *P. lanceolata* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

Echantillon	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Extrait aqueux	52.27 ± 5.64
Extrait méthanolique	$54.54 \pm 0,82$
BHT	15.95 ± 0.61

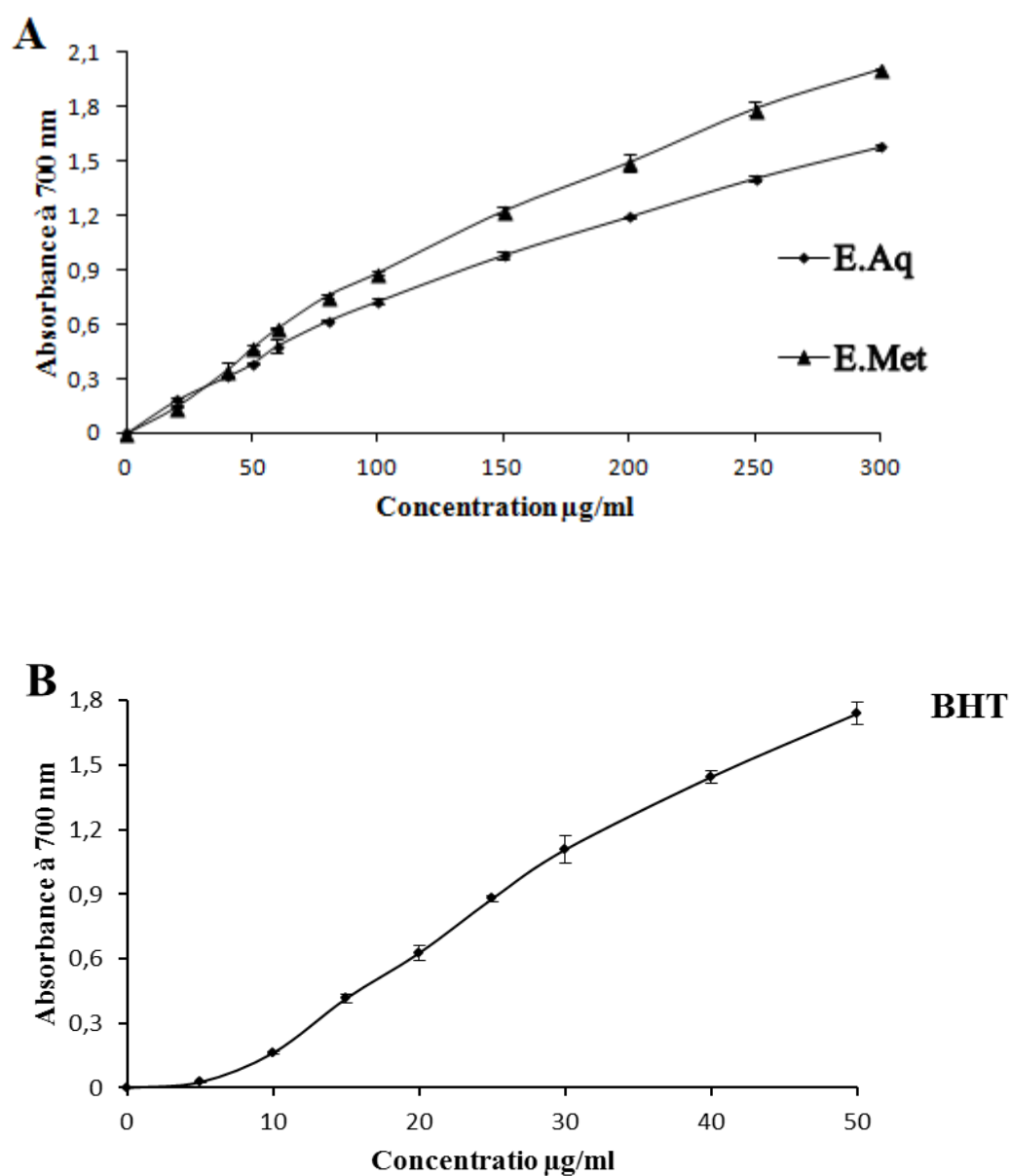


Figure 26. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique (A) de *P. lanceolata* et du BHT (B) à 700 nm. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

IV. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne révèlent que l'extrait aqueux à 100 et à 200 mg/ml exerce un effet antibactérien considérable sur 4 souches bactériennes (*Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Bacillus cereus* ATCC 10876) parmi les dix souches testées. L'effet de l'E. Aq est plus important que celui de l'amoxicilline (Amox), utilisé comme référence. L'extrait méthanolique a montré un effet antibactérien plus faible que celui de l'E. Aq, mais très proche de celui de l'amoxicilline pour les deux souches : *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 (**figure 27**). L'E. Met exerce un effet inhibiteur modéré sur *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, tandis que l'extrait aqueux et l'amoxicilline n'ont aucun effet sur cette souche (**tableau 8**).

Tableau 8. Zones d'inhibition de la croissance bactérienne induite par les extraits aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de *P. lanceolata* et par l'amoxicilline. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3).

Bactéries	Zone d'inhibition (mm)				
	E. Aq		E. Met		Amoxicilline
	100mg/ml	200mg/ml	100mg/ml	200mg/ml	30 μ g/disque
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	13.11 \pm 0.38	14.09 \pm 0.38	11.44 \pm 0.20	12.11 \pm 0.17	10.32 \pm 0.58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8.0 \pm 0.0	7.32 \pm 0.58	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	19.78 \pm 0.19	22.11 \pm 0.38	16.72 \pm 1.68	15.13 \pm 1.26	19.66 \pm 0.58
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	7.32 \pm 0.58	8.32 \pm 0.58	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	-	-	-	-	12.0 \pm 0.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	-	8.0 \pm 0.0	8.0 \pm 0.0	-

(-) : sans effet

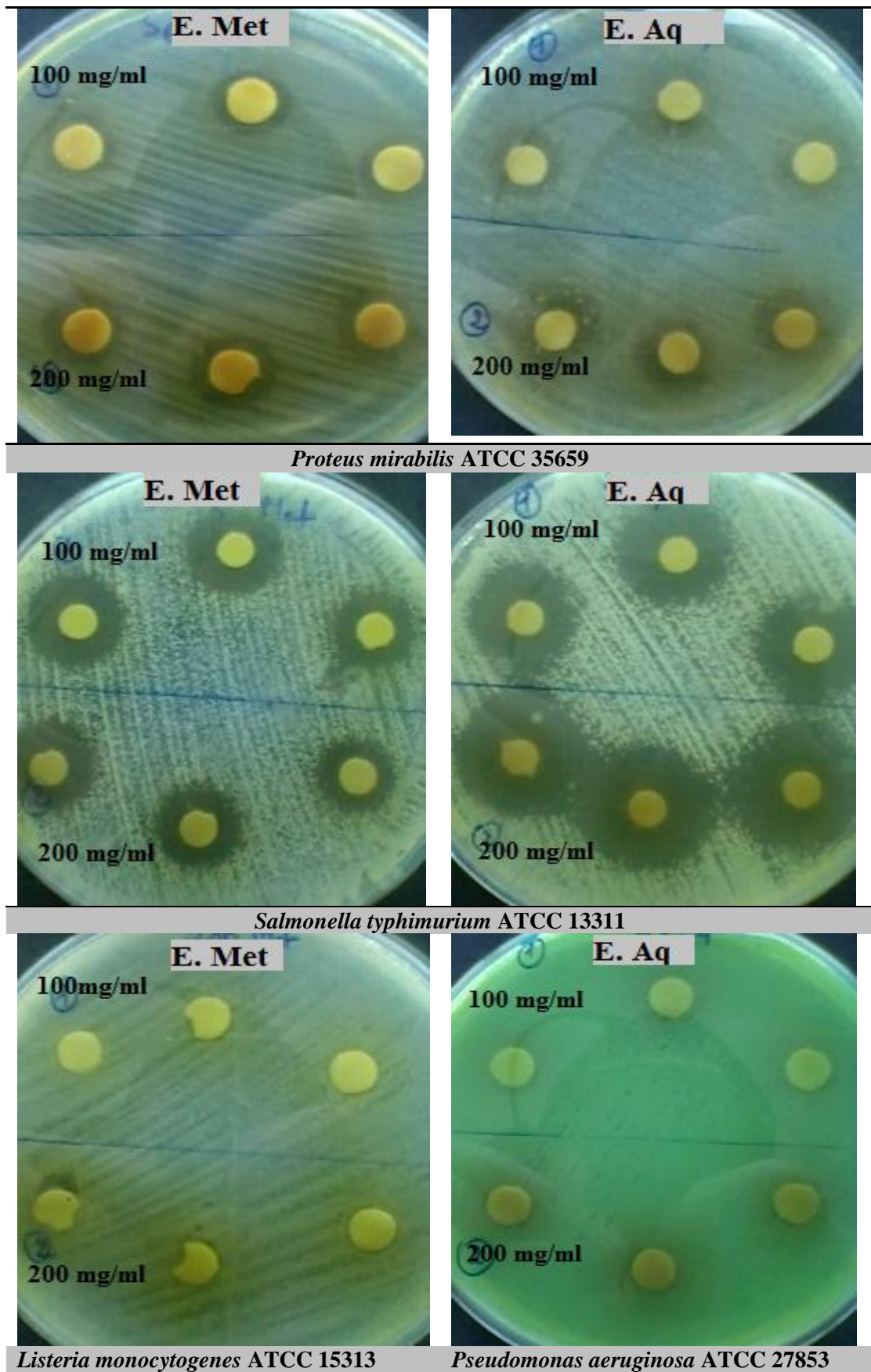


Figure 27. Photographies des zones d'inhibition de la croissance bactérienne de quelques souches induites par l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de *P. lanceolata*. Les résultats sont représentés en triplicata.

DISCUSSION

I. Préparation des extraits de *P. lanceolata*

L'extraction par les solvants organiques est souvent la méthode la plus pratiquée pour la préparation des extraits de plantes. Cependant, Sahreen *et al.* (2010) ont montré que le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure récupération de composés phénoliques.

Deux procédés d'extraction ont été utilisés dans la présente étude. L'extraction aqueuse, par décoction (ébullition pendant 20 minutes) et qui correspond à l'usage traditionnel de la plante. Toutefois, l'eau n'est pas le solvant idéal pour plusieurs constituants bioactifs des plantes. Elle permet d'extraire préférentiellement les composés polaires, mais à température élevée, elle peut aussi extraire quelques composés amphiphiles (Jones et Kinghorn, 2005).

Dans la deuxième méthode d'extraction, un mélange hydroalcoolique (méthanol/eau) est utilisé vu la capacité du méthanol d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires et de faciliter l'extraction d'un grand nombre de composés polaires ainsi que des composés de moyenne et de faible polarité. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet de prévenir leur dénaturation ou modification probable due à la température élevée utilisée (Seidel, 2005).

Avant son utilisation, la plante a été séchée à l'abri de la lumière puis broyée, pour éviter une éventuelle dégradation enzymatique des flavonoïdes, particulièrement les glycosides (Marston et Hostettmann, 2006), ou microbiennes (Seidel, 2005). Le séchage de la plante à l'obscurité prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et la dégradation causées par les radiations UV (Jones et Kinghorn, 2005). L'utilisation de la plante sous forme de poudre rend l'extraction plus efficace, en effet, l'échantillon devient plus homogène, la surface de contact avec le solvant est plus grande, la pénétration à l'intérieur des cellules est plus facile.

Le rendement de l'extraction dépend de plusieurs facteurs, à savoir la méthode d'extraction, le temps, la température, le solvant utilisé et la nature chimique de l'échantillon (Su *et al.*, 2006 ; Tabart *et al.*, 2007). Dans la présente étude, l'extraction aqueuse a donné un rendement de 20% tandis que l'extraction méthanolique a donné 17%. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant ainsi la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010). La chaleur peut, cependant, conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Seidel, 2005), c'est la raison pour laquelle, le temps de décoction a été réduit à 20 min.

L'origine géographique de la plante (climat et sol), la saison de la récolte, la durée et les conditions de stockage influencent le rendement de l'extraction. En effet, Beara *et al.* (2012)

qui ont travaillé sur la même espèce mais originaire de la Serbie ont obtenu un rendement de 10% seulement avec l'alcool contre 17% obtenu dans cette étude.

II. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins

Le dosage de polyphénols, des flavonoïdes et des tannins ont été effectués, car la majorité des effets pharmacologiques des plantes sont attribués à ces substances (Gulcin *et al.*, 2010).

L'extrait méthanolique de la partie aérienne du *P. lanceolata* est plus riche en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins que l'extrait aqueux. Cela est attribué probablement à la différence de solubilité de ces composés dans le méthanol et l'eau. Selon Falleh *et al.* (2008) une meilleure récupération de polyphénols et de flavonoïdes est obtenue avec le méthanol. Cependant, l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins (Seidel, 2005), tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou le mélange eau-alcool (Marston et Hostettmann, 2006). Ce qui explique en grande partie la richesse de l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux.

Selon Jankovic et ses collaborateurs (2012), *P. lanceolata* est considéré parmi les espèces du genre *Plantago* la plus riche en polyphénols totaux et en phenylpropanoid glycosides.

Nos résultats sont différents de ceux de Sebnem *et al.* (2012) qui ont obtenu 79.94 mg d'EAG/g d'extrait méthanolique de la partie aérienne de *P. lagopus* et ceux obtenus par Dalar et Konczak (2013) qui ont estimé cette teneur à 80.4 ± 1.8 mg EAG/g d'extrait hydroalcoolique de *P. lanceolata*. Cependant, nos extraits sont plus riches en polyphénols que ceux de *P. major* (Pourmorad *et al.*, 2006).

La teneur en flavonoïdes de cette étude est meilleure que celle obtenue par Mohamed *et al.*, (2011) qui ont trouvé que l'extrait des feuilles de *P. major* renferme seulement 6.41 ± 0.04 µg d'EQ/mg d'extrait.

Les résultats de notre étude montrent que les teneurs en polyphénols sont plus importantes que celles des flavonoïdes. Ceci est logique car les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols. Les conditions de culture et le climat peuvent en être la cause de cette différence (Djeridane *et al.*, 2005; Boizot et Charpentier, 2006).

Les différences notées peuvent-être dues à la différence entre les procédés et les conditions d'extraction (type de solvant et temps d'extraction) d'une part et aux périodes de récolte du matériel végétal d'autre part. En effet, Tamura et Nishibe (2002) ont démontré que le taux des phenylpropanoid glucoside et des acteosides dans les feuilles de *P. lanceolata* augmentent durant la saison de plantation pour atteindre le maximum au milieu de l'automne.

III. Activité anti-inflammatoire des extraits de *P. lanceolata*

L'inflammation est un processus complexe dans lequel divers médiateurs sont impliqués. Elle est caractérisée par quatre symptômes cardinaux, chaleur, rougeur, œdème et douleur. Le développement de l'œdème a été décrit par Vinegar, *et al.* (1969) comme événement biphasé dont la phase précoce (d'environ 1 heure) est attribuée à la libération de l'histamine et de la sérotonine, et à une augmentation de la synthèse des prostaglandines dans les tissus endommagés. La deuxième phase de l'œdème (1h30 à 3 heures) est due à la libération des substances prostaglandin-like à savoir la bradykinine et les leucotriènes. Au-delà de la troisième heure les prostaglandines sont synthétisées par les macrophages tissulaires (Wantana *et al.*, 2009; Perazzo *et al.*, 2013). Selon Cuzzoerea *et al.* (1998), la phase tardive de la réponse inflammatoire est liée à la migration des neutrophiles et leur accumulation dans le site enflammé, où elles libèrent des espèces réactives de l'oxygène, des enzymes protéolytiques et d'autres médiateurs. La mesure de l'œdème est donc un excellent outil pour la quantification de l'inflammation cutanée, induite par les agents phlogistiques. Dans la présente étude, deux modèles d'inflammation aigue ont été utilisés pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *P. lanceolata*.

L'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris et l'œdème de la patte induit par la carragénine chez les rats sont des modèles expérimentaux largement utilisés pour le criblage d'anti-inflammatoires synthétiques ou naturels qui agissent à différents niveaux (Winter *et al.*, 1962 ; Altinier *et al.*, 2007 ; Cabrini *et al.*, 2011 ; Ouédraogo *et al.*, 2012). L'huile de croton est un agent phlogistique extrait de *Croton tiglium*, son effet irritant est dû au TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) qu'elle contient. L'application topique de cette huile induit une réponse inflammatoire aigue caractérisée par une surproduction de médiateurs pro-inflammatoires à savoir TNF- α , IL-1b, IL-6, MPO, NO synthase inductible (iNOS), COX-2 et PGE2 (Xian *et al.*, 2012). Le TPA provoque l'augmentation de la perméabilité vasculaire et un œdème qui atteint son maximum 6 heures après l'application (Michel *et al.*, 2012), une infiltration de neutrophiles et une prolifération des cellules épidermiques après 24-48 heures (Delaporte *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2007). Comme elle augmente l'activité de la xanthine oxydase et de peroxydation lipidique (Rahman *et al.*, 2009).

Ces événements sont déclenchés d'après Murakawa et ses collaborateurs (2006) par la protéine kinase C (PKC), qui favorise une augmentation de l'activité de la phospholipase A2, COX et LOX avec l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Aquila et ses collaborateurs (2009) suggèrent que le TPA stimule l'expression de la COX 2 et de la iNOS

via l'activation de la PKC. En outre, la PKC favorise également la sécrétion et l'activation de plusieurs médiateurs immunitaires comme les cytokines et les chemokines qui augmentent et maintiennent la réponse inflammatoire de la peau (Denning, 2004).

Le traitement local des souris par l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *P. lanceolata* réduit significativement le volume de l'œdème induit par le TPA chez les souris. Cet effet est supérieur à celui exercé par l'indométacine (anti-inflammatoire de référence). A la même dose, l'extrait aqueux exerce une inhibition significative très proche de celle induite par l'indométacine, mais inférieure à celle de l'extrait méthanolique.

L'important effet anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique est probablement dû à la présence de substances lipophiles douées d'activités anti-inflammatoires et qui sont capables de traverser la barrière cutanée (Manga *et al.*, 2004). Tandis que, l'extrait aqueux ne contient que des substances hydrosolubles qui ne peuvent traverser la barrière cutanée (Seidel, 2005).

L'effet anti-inflammatoire des extraits de *P. lanceolata*, pourrait être dû à la présence d'antagonistes de l'histamine, d'inhibiteurs de la phosphodiesterase, de piègeurs de radicaux libres et d'autres composés ayant des propriétés anti-inflammatoires (Crummey *et al.*, 1987).

Les tannins et les polyphénols présents dans les espèces du genre *Plantago* peuvent avoir un effet anti-inflammatoire. En effet, l'application topique de certains flavonoïdes comme la quercétine et la myricétine exerce une forte inhibition sur la COX et la LOX (Kim *et al.*, 1993). L'actéoside, le phenylethanoid principal de *P. lanceolata*, inhibe l'œdème de l'oreille induit par l'acide arachidonique chez la souris (Murai *et al.*, 1995). De même, certains flavonoïdes aglycones tels que l'apigénine, la quercétine, la morine ainsi que les flavones et les flavonoïdes glycosides exercent une activité anti-inflammatoire, lors d'une application topique et orale *in vivo* (Lee *et al.*, 1993).

L'injection sous-plantaire de la carragénine a induit un œdème local qui atteint son maximum après 4 h. Le mécanisme cellulaire et moléculaire de l'inflammation induite par la carragénine est bien caractérisé. Elle provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont à l'origine du processus inflammatoire (Ouédraogo *et al.*, 2012). L'activation des mastocytes libèrent la sérotonine et l'histamine, stimulant ainsi une cascade d'événements qui produisent plusieurs facteurs chimiotactiques tels que le C5a, les chimiokines et LTB4, ce qui conduit à une migration leucocytaire intense (Laurent., 1987 ; Botting et Botting, 2000).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux du *P. lanceolata* est légèrement plus efficace que l'extrait méthanolique. L'inhibition de l'œdème de la patte est dose-indépendante durant les deux phases de l'inflammation. La forte inhibition de l'œdème a été observée après 4 heures de l'induction de l'inflammation. Cela suggère que l'activité inhibitrice des extraits

s'exerce davantage sur les COX qui sont responsables de la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires durant la deuxième phase de l'inflammation (Ouedraogo *et al.*, 2012). En effet, Palmeiro et ses collaborateurs (2002) ont trouvé que le traitement des rats par voie orale par des extraits hydroalcooliques des feuilles, des fruits et des racines de *Plantago australis*, inhibe l'œdème de la patte induit par la carragénine de façon dose indépendante. Ces auteurs ont expliqué cet effet par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines. Cependant, Beara *et al.* (2010), ont attribué l'effet anti-inflammatoire des extraits de *P. lanceolata* et de *P. major* à l'inhibition de la COX-1 et du 12-LOX.

La richesse des espèces du genre *Plantago* en phénols et en flavonoïdes (Samuelsen, 2000; Beara *et al.*, 2009) explique en partie l'effet anti-inflammatoire de leurs extraits. En fait, *P. lanceolata* contient des phényléthanoïdes (actéoside, cistanoside, lavandulifolioside...), des flavonoïdes (apigénine, quercétine, plantaginine...), l'hétéroside iridoïdique et des catalpols (Murai *et al.*, 1995). Les phénols et les flavonoïdes sont d'après Schneider et Bucar (2005) de puissants inhibiteurs de la 12-LOX. Selon Kim et ses collaborateurs (2006), l'acide gallique et ses dérivés sont responsables de l'inhibition de l'activation du p38 MAPK, et l'inhibition de la fixation du NF- κ B, essentiels pour l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que l'histamine, TNF- α et IL-6. En plus, les tanins ont la capacité d'inhiber la phospholipase A2 ce qui conduit à l'inhibition des prostaglandines et des leucotriènes (Glaser *et al.*, 1995; Chandra *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008).

Les ROS produits au cours de l'inflammation par les cellules phagocytaires interviennent dans le métabolisme de l'acide arachidonique pour produire des médiateurs pro-inflammatoires (Linda *et al.*, 2004; Geronikaki et Gavalas, 2006). Il ressort donc que l'effet anti-inflammatoire des extraits naturels est en partie dû à la présence d'antioxydants.

IV. Activité antioxydante des extraits de *P. lanceolata*

L'activité antioxydante se manifeste par diverses actions, telles que, l'inhibition des enzymes d'oxydation, la chélation des métaux de transition, le transfert d'un hydrogène, la désactivation de l'oxygène singulet ou la détoxification enzymatique des ROS. L'ensemble des activités antioxydantes devraient être évalués par différentes méthodes afin de caractériser le potentiel antioxydant de principes actifs ou d'extraits (Prior *et al.*, 2005). Dans le présent travail, trois tests ont été réalisées pour évaluer l'effet antioxydant des extraits de *P. lanceolata*: le test de DPPH, la chélation des métaux et le test du pouvoir réducteur.

IV. 1. Activité antiradicalaire des extraits de *P. lanceolata*

Les extraits de la partie aérienne de *P. lanceolata* possèdent un effet piègeur remarquable vis-à-vis du radical DPPH. En effet, les IC₅₀ des extraits aqueux et méthanolique sont très faibles (38 et 66µg/ml respectivement). En comparaison avec le BHT (antioxydant de référence), l'extrait aqueux montre un effet plus puissant alors que l'extrait méthanolique montre un effet relativement plus faible. Plusieurs études ont montré le pouvoir antiradicalaire de l'extrait méthanolique de *P. major* (Poumorad *et al.*, 2006; Kolak *et al.*, 2011).

Ce pouvoir antioxydant est probablement attribué aux composés phénoliques, connus comme des antioxydants ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Hennebelle *et al.*, 2004 ; Kelly *et al.*, 2002). Plusieurs études sur les activités antioxydantes des extraits de plantes ont montré la corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antiradicalaire (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2007 ; Falleh *et al.*, 2008 ; Ranilla *et al.*, 2010). La récente étude de Dalar et ses collaborateurs (2012) a montré la forte activité antioxydante de *P. lanceolata* et sa corrélation avec la teneur en composés phénoliques, constituants majeurs des extraits hydroalcooliques. Plusieurs études ont montré que les extraits du genre *Plantago* ont d'importantes propriétés antioxydantes (Mohamed *et al.*, 2011; Gálvez *et al.* , 2005; Beara *et al.* , 2009).

La différence d'activité notée entre les extraits aqueux et organiques est souvent attribuée au fait que les extraits à base de solvants organiques sont plus riches en métabolites secondaires polaires, de moyenne et de faibles polarité (Kintzios *et al.*, 2010). Dans notre étude l'extrait aqueux a donné un effet meilleur que celui de l'extrait alcoolique. Il semble que la nature et la quantité de solvant utilisé pour solubiliser l'antioxydant influencent le test du DPPH, et montre la complexité de l'estimation de l'activité antioxydante. Plusieurs auteurs confirment la nécessité de standardiser et de normaliser la méthode de DPPH (Andrzej *et al.*, 2012).

IV. 2. Activité chélatrice des extraits de *P. lanceolata*

Les métaux de transition principalement les ions Fe²⁺ qui jouent un rôle important dans le processus d'oxydation sont capables de générer des radicaux OH[•] à partir des peroxydes par la réaction de Fenton. Ainsi, les chélateurs efficaces des ions ferreux peuvent fournir une protection contre les dommages générés lors du stress oxydant. Les agents chélateurs qui forment des liaisons avec le métaux agissent comme des antioxydants secondaires qui réduisent le potentiel redox des ions métalliques et par conséquent stabilisent leur forme oxydée (Gulcin *et al.*, 2005).

L'activité chélatrice des métaux des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *P. lanceolata* a été évaluée par le test de la ferrozine, dans lequel la complexation entre le fer

résiduel et la ferrozine forme un chromophore rouge (c'est le complexe Fe^{2+} -Ferrozine), ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Le virage de la coloration rouge vers une solution transparente indique l'activité chélatrice du fer résiduel (Gulcin *et al.*, 2005). La réaction est affectée à la fois par les constantes de formation des deux complexes : antioxydant- Fe^{2+} et ferrozine- Fe^{2+} et donc par la compétition entre les deux chélateurs. Ainsi, un chélateur faible sera sérieusement sous-estimé lors d'une détermination quantitative. Néanmoins, cette réaction convient pour la détermination de l'activité chélatrice d'un agent antioxydant (Le *et al.*, 2007).

La capacité chélatrice est très importante du fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxy et alcoxy qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique (Elmastas *et al.*, 2006). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique (Suresh-Kumar *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que les deux extraits de *P. lanceolata* possèdent une activité chélatrice dose dépendante en capturant les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine. Les EC_{50} obtenues (53.61 $\mu\text{g/ml}$ et 105.78 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux et méthanolique respectivement) indiquent que les deux extraits possèdent une forte activité chélatrice. En effet, des activités chélatrices maximales de 95% et 92% sont obtenues avec les concentrations de 0,2 mg/ml d'extraits aqueux et 0,6 mg/ml d'extrait méthanolique respectivement. La linéarité des profils du pouvoir chélateur avant la saturation est plus importante dans le cas de l'EDTA par rapport aux deux extraits étudiés. Cela reflète la nature complexe des extraits contenant différents chélateurs ayant différentes affinités pour le fer, en compétition avec la ferrozine. En comparaison avec l'EDTA qui est un ligand hexadénate ayant une constante de liaison avec le fer très élevée de l'ordre de $4,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Kolayli *et al.*, 2004), les extraits de *P.lanceolata* ont donné une activité plus faible. Mais la comparaison de ces résultats avec ceux d'autres plantes éclaire l'importance de la capacité des extraits étudiés à établir des liaisons avec les ions ferreux. En effet, l'étude menée par Hinneburg et ses collaborateurs (2006) montre que l'effet chélateur de l'extrait éthanolique du gingembre sur les métaux de transition est très faible, voire même négligeable par rapport à l'EDTA, malgré qu'il exhibe d'excellents effets antioxydants. Par ailleurs, Chan et ses

collaborateurs (2007) ont montré que l'infusion du thé vert, connue par son potentiel antioxydant, ne donne qu'une faible activité chélatrice.

L'activité chélatrice élevée de l'extrait aqueux par rapport à l'extrait méthanolique peut être due à la présence de composés solubles dans l'eau ayant un effet chélateur. Les groupements hydrosolubles possèdent un caractère nucléophile élevé qui leur confère la capacité chélatrice (Ozen *et al.*, 2011). En effet, Sahreen et ses collaborateurs (2010) ont montré que les extraits de plantes induisent des effets chélateurs directement proportionnels à la polarité de leurs solvants. Les mucilages qui sont des polysaccharides solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool sont caractérisés par leurs propriétés chélatrices (Watanabe, 2008). Les acides aminés et les acides organiques sont aussi doués de capacités de séquestration des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006). L'activité de chélation des ions métalliques est aussi attribuée à quelques flavonoïdes (Le *et al.*, 2007; Přemysl *et al.*, 2011) et acides phénoliques (Capecka *et al.*, 2005). Le genre *Plantago* étant très riche en polysaccharides, dérivés d'acides caféiques, flavonoïdes (Jamilah *et al.*, 2012), et en mucilages (Ghedira *et al.*, 2008).

IV. 3. Activité réductrice des extraits de *P. lanceolata*

Le pouvoir réducteur est la capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction, est mesuré pour évaluer l'activité antioxydante d'un principe actif. Le pouvoir réducteur des extraits de *P. lanceolata* est mesuré dans cette étude par la réduction directe du $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$ en $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$, la réaction est suivie par spectrophotométrie à 700 nm. L'intensité de la couleur, qui vire du jaune vers le vert est directement proportionnelle au pouvoir réducteur de l'échantillon étudié (Zou *et al.*, 2004). Les valeurs des EC_{50} obtenues (52.27 $\mu\text{g/ml}$ et 54.54 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux et méthanolique respectivement) montrent que ces extraits possèdent de bonnes capacités réductrices bien qu'elles sont inférieures à celle du BHT ($\text{EC}_{50}=15.95 \mu\text{g/ml}$). Cela démontre leur propriété de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux libres. Les flavonoïdes sont des principaux donneurs d'électrons (Le *et al.*, 2007).

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *P. Lanceolata* sont statistiquement identiques, malgré que leurs teneurs en polyphénols et flavonoïdes soient significativement différentes. Ceci signifie que la corrélation entre le contenu en polyphénols et le pouvoir réducteur ne se vérifie pas dans ce cas. Albano et Miguel (2010) ont rapporté que cette corrélation n'est pas toujours existante.

V. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique de *P. lanceolata* est testée vis-à-vis de 10 souches par la méthode des disques après 24h d'incubation à 37°C. Le choix des souches bactériennes étudiées s'est basé sur le caractère de résistance aux antibiotiques.

Les résultats de la présente étude révèlent que l'extrait aqueux exerce un bon effet antibactérien sur 4 souches bactériennes parmi les 10 souches testées, cependant, l'extrait méthanolique n'a montré un effet inhibiteur qu'avec 3 souches. Les effets obtenus avec les 2 doses utilisées (100 et 200 mg/ml) ne sont pas dose-dépendants.

Les résultats du présent travail concordent avec ceux de certaines études et divergent avec d'autres. AL-Ukaily (2009) a rapporté que l'extrait éthanolique de la partie aérienne du *P. lanceolata* ne représente aucun effet inhibiteur sur la croissance de : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, cependant, dans la présente étude, les 2 extraits ont donné un effet antibactérien considérable avec *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis*. Des extraits de *P. intermedia* ont exercé aussi une activité inhibitrice sur *Escherichia coli* (Uzun *et al.*, 2004). Les travaux de Hassan et Aseel (2012) montrent que l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *P. lanceolata* à la dose de 200 mg/ml exerce un effet inhibiteur sur la croissance de *Staphylococcus saprophyticus* avec un diamètre d'inhibition de 30 mm, tandis que notre extrait méthanolique à la même dose n'a exercé aucun effet sur *Staphylococcus aureus*.

En outre, Hassawi et Kharma (2006) ont montré l'effet antimicrobien de l'extrait éthanolique des feuilles du *P. lanceolata* collecté de France, mais pas celui de la plante collectée de la Jordanie. D'après ces auteurs cette différence serait due aux variations des conditions climatiques, pédologiques, environnementales et génétiques.

L'activité antibactérienne des plantes médicinales est due à leur contenu en métabolites secondaires, principalement les composés phénoliques et les huiles essentielles (Bayoub *et al.*, 2010). Selon Cowan (1999) les différentes classes de polyphénols, essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits de plantes envers les microorganismes. Al-Jumaily *et al.* (2012) ont obtenu un effet antibactérien très significatif des tannins isolés de *P. lanceolata* sur la croissance d'*Escherichia coli*. Cette activité est peut être due à la capacité des tanins à précipiter les protéines. D'autres auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne d'autres plantes à la présence d'anthraquinones (Comini *et al.*, 2011; Doughari *et al.*, 2012). Les huiles essentielles sont très efficaces dans le traitement des pathologies infectieuses (Rios et Recio, 2005). Ces huiles ont l'avantage de ne pas engendrer une résistance bactérienne, vu leur diversité en composés bioactifs (Maggi *et al.*, 2009).

La différence d'activité de nos extraits avec celles d'autres études pourrait être due à la faible fraction d'huiles essentielles qui s'est solubilisée dans le méthanol ou l'eau.

Il est certain que l'efficacité d'un extrait ne peut être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée des différents composés (Essawi et Srour, 2000).

La méthode d'extraction, le solvant utilisé, les conditions de séchage et de broyage conditionnent l'activité antibactérienne des extraits. Seidel (2005) recommande de congeler le matériel végétal riche en composés volatiles ou thermolabiles juste après sa collection. Il est aussi recommandé de le broyer sous refroidissement (Jones et Kinghorn, 2005).

Conclusion et perspectives

L'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Plantago lanceolata* L. est plus riche en tannins en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait aqueux. Il ressort donc que Le méthanol est le solvant approprié grâce à sa capacité d'extraire les molécules polaires et apolaires.

Le présent travail s'est intéressé aux effets anti-inflammatoires, antioxydants et antibactériens des extraits étudiés. Le prétraitement par voie orale des rats par l'E Aq ou par l'E Met prévient de façon significative l'œdème de la patte induit par la λ carragénine. Ces effets sont très proches de ceux exercés par l'aspirine utilisée comme anti-inflammatoire standard. Par ailleurs, l'inhibition du développement de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris permet de conclure que les deux extraits appliqués localement exercent un effet anti-inflammatoire supérieur à celui de l'indométacine.

D'autre part, les deux extraits exhibent une forte activité antiradicalaire, une importante activité chélatrice vis-à-vis du fer ferreux et un bon pouvoir réducteur.

De même, les 2 extraits de *P. lanceolata* ont montré une activité antibactérienne considérable vis-à-vis de quelques souches testées dont l'effet majeur est celui de l'extrait aqueux.

La présente étude montre que cette plante possède un bon pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel dans la prise en charge de diverses pathologies surtout d'origine inflammatoire ou microbienne.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier et identifier les composés bioactifs dans les extraits de *Plantago lanceolata* et puis évaluer leurs effets sur les médiateurs de l'inflammation, les enzymes impliquées dans la production des espèces oxygénées réactives et sur les systèmes antioxydants.

Il serait très intéressant d'étudier l'activité antibactérienne des extraits de *Plantago lanceolata* vis-à-vis de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques conventionnels, et d'élargir l'étude aux fractions des extraits et aux huiles volatiles de la plante.

Références Bibliographiques

- Aguilaniu B, Flore P, Page E, Maitre J, Lacour J.R, Perrault H (1998). Effects of indomethacin and polyunsaturated fatty acid diet on exercise-induced hypoxaemia in master athletes. *Eur J Appl Physiol*, **77**, (1-2) 81- 88.
- Ahsan H, Ali A and Ali R (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol*, **131**, 398-404.
- Albano S.M and Miguel M.G (2010). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Ind Cro Prod*, 1-6.
- Al-Jumaily E.F, Abdul-Ratha H.A and Raheema R.H (2012). Extraction And Purification Of Tannins From *Plantago Lanceolata L.* And Assessment Their Antibacterial Activity On Pathogenesis Of Enteropathogenic *E.Coli In Vitro* And *In Vivo*. *DAMA Inter*, **1** (1), 17-21.
- Altinier G, Sosa S, Aquino R.P, Mencherini T, Della Loggia R, Tubaro A (2007). Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis L.* *J agr food chem*, **55**, 1718-1723.
- AL-Ukaily I.A.A (2009). Effect of Supernatant Antigen of *Lactobacillus* and some plants Extracts on the Immune, Enzyme and Pathological picture with *E.coli* isolated from children. Ph.D thesis, Baghdad University, College of Veterinary Medicine.
- Ames, B.N (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res*, **206**, 3-32.
- Andrzej L.D, Dorota W, Małgorzata O (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH_ method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chem* , **131**, 1037-1043.
- Aquila S, Giner R.M, Recio M.C, Spegazzini E.D, Rios J.L (2009). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. *J Ethnopharmacol*, **121**, 333-337.
- Aruoma O.I (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr*, **8** (1), 53-63.
- Ashcroft G.S, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni A.B, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song X.Y and Wahl S.M (2000). Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med*, **6**, 1147-53.
- Autier J, Miyara M, Buyse S (2004). Module 8 : immunopathologie, réaction inflammatoire. item 112, editor. Issy-les-Moulineaux: Estem, 192.
- Azzi A (2007). Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radic Biol Med*, **43**, 16-21.
- Babayi H, Kolo I, Okogum JI (2004). The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri*, **16** (2), 102-105.

- Bae Y.S, Kang S.W, Seo M.S, Baines I.C, Tekle E, Chock P.B, Rhee S.G (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J.Biol. chem*, **272**, 217-221.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin J.C, Pinkas M, Luycky M and Gazin M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, **46**, 1086-1089.
- Balaban S, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*, **120**, 483-495
- Barnes P.J (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Sci*, **94**, 557-572.
- Barton G.M (2008) A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, **118**, 413-20.
- Basile A, Giordano S, Lopez Saez J.A, Cobianchi B.C (1999). Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. *Phytochem*, **2 (8)**, 1419-82.
- Bate-Smith E.C (1973). Haemanalysis of tannins, the concept of relative Astringency. *phytochemistry*, **12**, 907-912.
- Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A (2010). Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *Afr J Biotch*, **9**, (27).
- Beara I.N, Lesjak M.M, Jovin E.Đ, Balog K.J, Anačkov G.T, Orčić D.Z, Mimica-Dukić M.N (2009). Plantain (*Plantago L.*) species as novel sources of flavonoid antioxidant. *J Agric Food Chem*, **57**, 9268-9273.
- Beara I.N, Marija M Lesjak, Dejan Z Orcic, Natasa Đ Simin , Dragana D Cetojević-Simin , Biljana N Bozin, Neda M Mimica-Dukic (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima L.* and *Plantago lanceolata L.* *LWT - Food Sci Tech* , **47**, 64-70.
- Beara I.N, Orčić Dejan Z, Lesjak Marija M, Mimica-Dukić Neda M, Peković Biljana A, Popović Mira R (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago L.*) species. *J Pharm Biomed Anal*, **52**, 701-706.
- Beckman K.B and Ames B.N (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, **78**, 547-581.
- Belkner J, Wiesner R, Kuhn H, Lankin V.Z (1991). The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. *FEBS. Lett*, **279**, 110-114.
- Berger M.M (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nut Clin Metabol*, **20**, 48-53.

- Bernard F.X , Sablé S , Cameron B , Provost J , Desnottes J.F , Cruzet J and Blanche F (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 992-998.
- Beta T, Nam S, Dexter J.E, Sapirstein H.D (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chem*, **82**, 390-393.
- Biesalski HK, Grimm P (2001). Atlas de poche de Nutrition. Maloine: Paris.
- Blain H, Jouzeau J.Y, Netter P, Jeandel C (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev Med Interne*, **21**, 978-88.
- Bloomer R.J and Fisher-Wellman K.H (2008). Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. *Gen Med*, **5**, (3) 218-28.
- Boizot N, Charpentier J.P (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration, génétique et physiologie forestières, laboratoire d'analyses biochimiques. Le Cahier des Techniques de l'Inra, pp:79-82
- Bonnefont-Rousselot D, Peynet J, Beaudoux J.L, Thérond P, Legrand A and Delattre J (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nut Clin Metabol*, **16**, 260-267.
- Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Beaudoux J.L, Peynet J, Legrand A and Delattre J (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels. *Ann. Biol Clin*, **59**, (4), 453-459.
- Borovikova L.V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina G.I, Watkins L.R, Wang H, Abumrad N, Eaton J.W and Tracey K.J (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nat Med*, **405**, 458-62.
- Borrel T (2000). Les infections nosocomiales, cours Maladie. L'homme et son environnement. Université Lumière Lyon II.
- Boskabady M.H, Rakhshandah H, Afiat M, Aelami Z, Amiri S (2006). Antitussive Effect of *Plantago lanceolata* in Guinea Pigs. *Iran J Med Sci*, **31**(3), 143-146.
- Botting R.M, Botting J.H (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clin Drug Investig*, **19**, 1-7.
- Bourkhiss M, Hnach M, Paolini J, Costa J, Farah A et Satrani B (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata* (vahl) masters du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **79**, 141-154.
- Bruneton J (1999). Pharmacognosie, phytochimie : plantes médicinales, 3^{ème} édition, technique et documentation, (Paris), pp : 299, 301, 540, 1076-1079.
- Cabrini D.A, Henrique H, Priscila I, Da Silva C.D, Pietrovski E.F, Gasparin Buenomendes D.A, Da Silveira A, Pizzolatti M.G, Costa Brighente I.M and Otuki A F (2011). Analysis

- of the potential topical anti-inflammatory activity of *averrhoa carambola* l. In mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2011**, 1-7
- Capecka E, Mareczek A and Leja M (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chem*, **93**, 223-226.
- Capron F (1998). Formes anatomo-cliniques de l'inflammation, in Trouble de la motricité et de la sensibilité digestive. *Rev Prat*, **20**, 2273-2276.
- Chambers H.F and Sande M.A (1998). Médicaments antimicrobiens. In: Hardman J.G, Limbird L.E, Molinoff P.B, Rudon R.W and Gilman A.G. Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. *New York: Mc Graw Hill*, 1027-1029.
- Chan E.W.C, Lim Y.Y and Chew Y.L (2007). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chem*, **102**, 1214-1222.
- Chan K.L (2003). Role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury. *Curr Med Chem*, **1**, 1-13.
- Chandra J, Ponnappa K, Sadashiva C, Priya B, Nanda B, Gowda T, Vishwanath B and Rangappa K (2007). Chemistry and structural evaluation of different phospholipase a2 inhibitors in arachidonic acid pathway mediated inflammation and snake venom toxicity. *Curr Top Med Chem*, **7**, 787-800.
- Chebaibil A, Filali F.R, Amine A, Zerhouni M (2011). Effet bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum* L.) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Rev Phytother*, **9**, (3), 158-164.
- Chiang L.C, Chiang W, Chang M.Y, Ng L.T and Lin C.C (2002). Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*, *Antiviral Res*, **55**, 53-62.
- Chu W.L, Lim Y.W, Radhakrishnan A.K and Lim P.E (2010). Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complement Altern Med*, **10** (53), 2-8.
- Clarkson P.M and Thompson H.S (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *Am J Clin Nutr*, **72**, (2) 637-646.
- Comini L.R, Nez Montoya S.C, PÉez P.L, Argello G. A, Albesa I and Cabrera J. L (2011). Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (*Rubiaceae*). *J. Photochem. Photobiol B*, **102**, 108-114.
- Corrado B, Marco T, Rocchina C, Matteo F, Luca A, Narcisa G, Mario D.T (2009) Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. *Pharm Res*, **59**,90-100.
- Cowan M.M (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol*, **12**, 564-582.
- Coyen Y (1990). Les médiateurs chimiques de l'inflammation, in Abrégé de pharmacologie. Ed. 3 Masson, Paris, 333-350.
- Crane F.L (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*, **20**, (6) 591-598.

- Crummey A, Harper G.P, Boyle E.A and Mangan F.R (1987). Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. *Agents Actions*, **20**, (1-2), 69-76.
- Cushnie T.P, Hamilthoh V.E.S, Lamb A.J (2003). Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res*, **158**, (4), 281-9.
- Cushnie T.P.T and Lamb A.J (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrobial agents*, **26**, 343-356.
- Cuzzocrea S, Riley D.P, Caputi A.P, Salvemini D (2001). Antioxidant Therapy: A New pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol*, **53** (1), 135-159.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman A.L and Zabo C (1998). Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med*, **24**, 450-459.
- Da Silva S, Calgarotto A, Chaar J and Marangoni S (2008). Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia Sylvestris* Sw aqueous extract with antipla2 activity. *Toxicon*, **52**, 655-666.
- Dadi P.K, Ahmad M, Ahmad Z (2009). Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol*, **45** (1), 72-9.
- Daglia M (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*, **23**, 1-8.
- Dalar A, Izabela K (2013). Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Ind Crops Prod*, **44**, 383-390
- Dalar A, Tu'rkler M, Konczak I (2012). Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. *J Herb Med*, **2**, 42 -51.
- Dambrine E, Dupouey J.L, Laut L, Humbert L, Thinon M, Beaufile T, and Richard H (2007) Present forest biodiversity patterns in France related to former Roman agriculture. *Ecology*, **88** (6): 1430-1439.
- Dangoumau J (2006). Pharmacologie générale. Edition 2006 Département de pharmacologie. Université.Victor.Segalen.Bordeaux.2.<http://www.scribd.com/doc/24947187/pharmacologie-generale>
- De Souza C.F, Fernandes L.C, Cyrino E.S (2006). Produção de Espécies Reativas de Oxigênio Duranteo Exercício Aerobie e Anaerobie. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*, **8**, (2) 102-109.
- Demoly P (2007). Les hypersensibilités aux anti-inflammatoires non stéroïdiens anciens et nouveaux concepts. Quelles explorations Non-steroidal anti-inflammatory drug hypersensitivities: old or new concepts. Some exploring. *Allergol Immunol clin*, **47**, 60-63

- Denning M.F (2004). Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase c isoforms. *Int J Biochem Cell Biol*, **36** (7), 1141-1146.
- Didrak M (1999). Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, *Salvia sp* and *Phlomis sp*). *J. Biol*, **23**, 241-8.
- Diouf A (1991). La réaction inflammatoire, étude des médiateurs et leurs rôles physiopathologiques. *Thèse de pharmacie*, Dakar, 44.
- Djeridane M, Yousfi B, Nadjemi D, Boutassouna P and Stocker N (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, **97**, 654-660.
- Doughari J.H, Ndakidemi P.A, Human I.S and Benade S (2012). Antioxidant, antimicrobial and antiverotoxic potentials of extracts of *Curtisia dentata*. *J Ethnopharmacol*, **141**, 1041-1050.
- Droge W (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, **82**, (1) 47-95.
- Duarte T.L, Jones G.D.D (2007). Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radic Biol Med*, **43**, 1165–1175.
- Dufour C, Loonis M, Dangles O (2007). Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radic Biol Med*, **43**,(2) 241-252.
- Duwiejua M, Zeitlin I.J, Waterman P.G, Chapman J, Mhango G.J, Provan G.J (1993). Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family *Burseraceae*, **59**(1),12-6.
- Elmastas M, Gulcin Đ, Isildak O, Kufrevioğlu O.Đ, Đbaoğlu K, Aboul-Enein H.Y (2006). Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *J Iran Chem Soc*, **3**, 258-266.
- El-Mesery M.E, Al-Gayyar1 M.M, Salem H.A, Darweish M.M and El- Mowafy A.M (2009). Chemopreventive and renal protective effects for docosahexaenoic acid (DHA): implications of CRP and lipid peroxides. *Cell Div*, **4**, (6), 1-17.
- Elzaawely A.A, Xuan T.D and Tawata S (2005). Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* HOUTT, aerial parts. *Biol Pharm Bull*, **28**(12), 2225-2230.
- Eming S.A, Krieg T, Davidson J.M (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J Invest Dermatol*, **127**, 514–525.
- Essawi T and Srour M (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*, **70**, 343-349.
- Fauve R.M, Hevin M (1998). Reaction inflammatoire et réactions immunitaires. *Inflammation*. Russo-Marie F, Peltier A, Polla B S. John Libbey Eurotext (France), 10-19.
- Favier A (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* **55**, 9-16.

- Favier A (2003). Le stress oxydant, interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel therapeutique. *Actual Chim*, **11**, (12) 108-115.
- Ferguson L.R (2010). Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res*, **690**, 3-11.
- Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports Med*, **36** (4), 327-358.
- Fisher-Wellman K, and Bloomer R.J (2009). Acute exercise and oxidative stress: A 30 year history. *Dyn Med*, **8**, 1-25.
- Fleer H and verspohl E.J (2007). Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds, *Phytomed*, **14**, 409-15.
- Fons F, Rapior S, Gargadennec A, Claude A and Jean-marie B (1998). Volatils components of *Plantago lanceolata* (plantagenaceae). *Acta Bot Gallica*, **145** (4), 265-269.
- Gálvez M, Martín-Cordero C, Houghton P. J, and Ayuso M. J (2005). Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *J Agric Food Chem*, **53**, 1927-1933.
- Galvez M, Martin-Cordero C, Lopez-Lazaro M, Cortes F and Ayuso M. J (2003). Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines, *J Ethnopharmacol*, **88**, 125-30.
- Geronikaki A.A and Gavalas A.M (2006). Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Combl Chem High Throughput Screen*, **9**, 425-442.
- Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R (2008). *Plantago major* L. et *Plantago lanceolata* L. (*Plantaginaceae*). *Phytother*, **6**, 367-371.
- Girre L (2001). Les plantes et les médicaments, *Editions Delachaux et Niestlé*.
- Glaser K.B, Sung M.I, Hartman D, Lock Y.W, Bauer J, Walter T, Carlson R.P (1995). Cellular and topical in vivo inflammatory murine models in the evaluation of inhibitors of phospholipase A2. *Skin Pharmacol*, **8**, 300-308.
- Glomb M.A, Monnier V.M (1995). Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem*, **270**, (17) 10017-26.
- Gobert M, Martin B, Ferlay A, Chilliari, Y, Graulet B, Pradel P, Durand D (2009). Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Dairy Sci*, **92**, 6095-6104.
- Gomez C (2000). Immunoenhancing properties of *Plantago major*, leaf extract. *Phytother Res*, **14**, 617-22.
- Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T, Kanazaw K (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radic Biolo Med*, **45**, 1318-1325.
- Gulcin I, Alici HA and Cesur M (2005). Determination of in Vitro Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. *Chem Pharm Bull*, **53**(3), 281 -285.

- Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H.Y (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian J Chem*, **3**(1), 43-53.
- Guzik T.J, Korbout R and Adamek-Guzik T (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, **54** (4), 469-487.
- Hagerman A.E, Butler L.G (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J Agr Food Chem*, **26**, 809-812.
- Hale A.L (2003). Screening potato genotypes for antioxidant, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah Strains using aflp and microsatellite marker analysis. Genetics. Office of Graduate Studies of Texas A&M University. 260.
- Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, **52**, 253-265.
- Halliwell B, and Gutteridge J. M (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, **18**, 125-126.
- Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K and Kinoshita T (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochem*, **48**, 125-129.
- Harrison R (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now. *Free Radic Biol Med*, **33**, 774-797.
- Hassan A, Abdul-Ratha and Aseel J Mohammad (2012). Study the therapeutic role of Alcoholic Extract of *Plantago lanceolata* against infection with *Staphylococcus saprophyticus*. *Proc Vet Sci Conf*, 8-15.
- Hassawi D and kharma A (2006). Antimicrobial Activity of Some Medecinal Plants Against *Candida Albicans*. *J Biol Sci*, **6** (1), 109-114.
- Haxhe J.J, Zumofen M (1999). Notions d'hygiène hospitalière. Faculté de Médecine. Université Catholique de Louvain.
- Hellsten Y, Apple F.S, and Sjodin B (1996). Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, **81**, 1484-1487.
- Hellsten Y, Svensson M, Sjödin B, Smith S, Christensen A, Richter E.A, Bangsbo J (2001). Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radic Biol Med*, **31**, (11) 1313-22.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F (2004). Polyphenols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytoter*, **1**, 3-6.
- Henrotin Y, Deby-Dupont G, Reginster J.Y (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Rev Med Liege*, **566**, 433-442.
- Hinneburg I, Dorman H.J.D and Hiltunen R (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem*, **97**, 122 -129.
- Ho Y.S, Lai C.S, Liu H.I, Ho S.Y, Tai C, Pan M.H, Wang Y.J (2007). Dihydrolipoic acid inhibits skin tumor promotion through anti-inflammation and anti-oxidation. *Biochem Pharmacol*, **73**, 1786-1795.

- Hosford D, Braquet P (1990). The potential role of platelet activating Factor in shock and ischemia. *J Crit Care*. **5**, 115-136.
- Jamilah J, Sharifa A.A and , Sharifah N.R.S (2012). GC-MS Analysis of Various Extracts from Leaf of *Plantago major* Used as Traditional Medicine. *World Appl Sci J*, **17**, 67-70.
- Jankovic T, Zduni G, Beara I, Balog K, Pljevljakusi D, Danijela S, Katarina S (2012). Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species. *Biochem Syst Ecol*, **42** , 69-74.
- Johnson R.J, Sautin Y.Y, Oliver W.J, Roncal C, Mu W, Gabriela S.L, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner S.A (2009). Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society. *J Comp Physiol B*, **179**, (1) 67-76.
- Jones W.P and Kinghorn A.D (2005). Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), 323-411.
- Jovanovic S.V, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B and Simic M.G (1994). Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc*, **116**, 4846-4851.
- Kanter M, Meral I, Dede S, Cemek M, Ozbec H, Uygan I, and Gunduz H (2003). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄- treated rats. *J Vet Med A*, **50** (5), 264-268.
- Kelly E.H, Anthony R.T and Dennis J.B (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, **13**, 572-584.
- Khabbal Y, Ait El Cadi M, Alaoui K, Mg A, Faouzi Y (2006). Cherrah Activit anti-inflammatoire de *Zygophyllum goetulum*. *Phytother*, **5**, 227-229.
- Kim H.K, Namgoong S.Y, Kim H.P (1993). Antiinflammatory Activity of Flavonoids: Mouse Ear Edema Inhibition. *Arch Pharm Res*, **16**, 18-24.
- Kim S.H, Jun C.D, Suk K, Choi B.J, Lim H, Park S, Ho Lee S, Shin H.Y, Kim D.K and Shin T.Y (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci*, **91** (1), 123-131.
- Kintzios S, Papageorgiou K, Yiakoumettis I, Baricevic D and Kusar A (2010). Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *J Pharm Biomed Anal*, **53**, 773-776.
- Kirschvink N, De Moffarts B, Lekeux P (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veter J*, **177**, 178-191.
- Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *J Toxicol Pathol*, **30**, 620-650.
- Kolak U, Boćga M, Akalin U, AK E, Ulubele A (2011). Constituents of *Plantago major* subsp. *intermedia* with antioxidant and anticholinesterase. capacities, *TUBITAK*, **35**, 637-645.

- Kolayli S, Ocak M, Kucuk M, Abbasoglu R (2004). Does caffeine bind to metal ions. *Food chem*, **84**, 383-388.
- Koolman J, Rohm K.H (1999). Atlas de Poche de Biochimie. Flammarion: Paris.
- Kordali S, Cakir A, Ozer AH, Cakmakci R, Kesdek M and Mete E (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol*, **99** (18), 8788-8795.
- Koren H.S (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect*, **103**, 235-242.
- Kusuda M, Inada K, Ogawa T.O, Yoshida T, Shiota T, Tsuchiya T and Hatano T (2006). Polyphenolic constituents structures of *Zanthoxylum piperitum* fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70(6)**, 1423-1431.
- Lahmidani N, Mellouki I, El Yousfi M, Aqodad N, El Abkari M, Ibrahim A, Benajah D (2012). L'ulcère bulbaire hémorragique et les anti-inflammatoires non stéroïdiens: quelle gravité de l'accident hémorragique Bleeding peptic ulcer and Non steroidal Anti Inflammatory Drugs: what severity of bleeding. *J Afr Hépatol Gastroentérol*, **6**, 193-195
- Lamprecht M, Greilberger J, Oettl K (2004). Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. *J Nutr*, **20**, (7-8) 728-730.
- Laurent P.E and Perrin L.F (1987). L'inflammation, Physiopathologie. *Objectif médical*, No spécial.
- Le K, Chiu F and Ng K (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem*, **105**, 353-363.
- Le T.I, Couetdic G, Clermont O, Brahimi N, Plesiat P, Bingen E (2001). In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother*, **48**, 553-5.
- Lechat P, Calvo F, De Crémoux P, Giroud J-P, Lagier G, Lechat Ph, Rouveix B, Weber S (1990). Les médicaments de l'inflammation, in Abrégé de pharmacologie. *Masson, Paris*, 288-319.
- Lee S.J, Kun H.S, Hyeun W.C, lae C.D, Keun Y.J, Sam S.K and Hyun P.K (1993). Antiinflammatory Activity of Naturally Occurring Flavone and Flavonol Glycosides. *Arch. Pharm. Res*, **16 (1)**, 25-28.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F and Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, **102**, 771-776.
- Linda S, Einbonda, Kurta R, Xiao-Dongluoa, Margaretj B, Edward J and Kennelly (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem*, **84**, 23-28.

- Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P (2004). Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OpeM and MesXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother*, **8**, 1797-802.
- Lugasi A, Hóvári J, Sági K.V and Bíró L (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biol Szeged*, **47**, 119-125.
- Lyn Patrick N.D (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern Med Rev*, **11**, (2) 114-127.
- Madamanchi N.R, Vendrov A, Runge M.S (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 29.
- Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman M.M, Cresci A, Cristalli G, Lupidi G, Papa F, Quassinti L, Sagratini G and Vittori S (2009). Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia*, **80**, 313-319.
- Manga H.M, Brkic D, Marie D.E.P, Quetin-Leclercq J (2004). In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*, **92**, 209-214.
- Marfak A (2003). Radiolyse gamma des flavonoides, Etude de leur reactive avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'universite de Limoges, 187.
- Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise- induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr*, **22**, (2) 147-156.
- Marston A, Hostettmann K (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications , Edited by Oyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham, published by Taylor and Francis Group, ISBN:0-8493-2021-6 , 1-36.
- Martinez-Cayuela M (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**, 147-161.
- Martini A, Katerere D.R, Eloff J.N (2004). Seven flavonoïds with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol*, **93** (2-3), 207-12.
- Mc Manus J.P, Davis K.G, Lilley T, Haslam E (1981). The association of proteins with polyphenols. *J Chem Soc Chem Co*, 309-311.
- Mesaros N, Bambeke F.V, Avrain L, Glupczynski Y, Vanhoof R, Plesiat P, Tulkens P.M (2005). L'efflux actif des antibiotiques et la résistance bactérienne : état de la question et implications. *La lettre de l'infectiologue-Tome xx-n°4*.
- Michel Y.F, Lin Z.X, Xin Y.X, Zi R, Jian N.C, Xiao P.L, Siu P (2012). Effect of *RhizomaPolygonati* on 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate-induced ear edemaimice. *J Ethnopharmacol*, **142**, 851-856.

- Mohamed I, Kobeasy O, Abdel-Fatah M, Samiha M, Abd El-Salam and Zahrat El-Ola M, Mohamed M (2011). Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, **3(3)**, 83-91.
- Moore G, Sanford P and Wiley (2006). Perennial pastures for Western Australia, Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth.
- Mori A, Nichino C, Enoki R and Twata S (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *ptoteus vulgaris* and *staphylococcus aureus*. *Phytochem*, **26**, 2231-2234.
- Mosquera O.M, Correa Y.M, Buitrago D.C, Nino J (2007) Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**, 631-634.
- Motamed S.M and Naghibi F (2010). Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chem*, **119**, 1637-1642.
- Moulin M (1998). Médicaments antiinflammatoires, *Abrégé de pharmacologie* . Masson, Paris, 332-336.
- Murai M, Tamayama Y, Nishibe, S (1995). Phenylethanoids in the herbs of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on an arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Planta Med*, **6**, 479-480.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, Fukuda Y (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-a in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem pharmacol*, **71**, 1331-1336.
- Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, **420**, 846-52.
- Nathan C.F, Root R.K (1977). Hydrogen peroxide realize from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. *J exp Med*, **146**, 1648-1662.
- Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and s-carotene. *Am J Clin Nutr*, **62**, 1322-1326.
- Nitta T, Arai T, Takamatsu H, Inatomi Y, Murata H, Linuma M, Tanaka T, Ito T, Asai F, Ibrahim I, Nakanishi T and Watab K (2002). Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin resistance *staphylococcus aureus*. *J health sci*, **48** (3), 273- 276.
- Okamoto K, Gotoh N, Nishino T (2001). Pseudomonas aeruginosa reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 964-71.
- Okigbo R.N, Mbajinka C.S, Njoku C.O (2005). Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopi aethopica* and *Occinum gratissimum* L. some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci*, **1** (4), 392-7.
- Ouédraogo N, Lompo M, Sawadogo R.W, Tibiri A, Hay A.E, Koudou J, Dijoux M.G, Guissou I.P (2012). Étude des activités anti-infl ammatoire, analgésique et antipyrétique

- des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytother*, **10**, 286-292.
- Ozen T, Demirtas I and Aksit H (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem*, **124**, 58-64.
- Palmeiro N.S, Almeida C.E , Ghedini P.C, Goulart L.S and Baldisserotto B (2002). Analgesic and Anti-inflammatory Properties of *Plantago australis* Hydroalcoholic Extract . *Acta Farm*, **21** (2), 89-92.
- Parham P (2003). Le système immunitaire (Edited by Boeck D.).
- Peluso M.R (2006). Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp. Biol. Med*, **231**, 1287-1299.
- Perazzo F.F, Rodrigues I.V, Maistro E.L, Souza S.M, Nanaykkara N.P.D, Bastos J.K, Carvalho J.C.T, De Souza G.H.B (2013). Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L. (Piperaceae). *Pharmacogn J*, **5**, (1),13-16.
- Pietta P.G (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod*, **63**, 1035-1042.
- Pincemail J, Jacques L, Emmanuel C, Castiaux J.P, Defraigne J.O (2001). Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, **6**, N°5, 1-3.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R and Defraigne J.O (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, **4** (5).
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne J.O (1998). Fumee de cigarette: une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Medi Sphere*, **78**, 37-39.
- Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, Collette G, Haleng J, Cheramy-Bien J.C, Charlier C, Chapelle J.P, Giet D, Albert A, Limet R and Defraigne J.O (2007). Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Liège, Belgium. *Hum Reprod*, **22**, (8) 2335-2343.
- Poitou C, Clément K (2005). Le tissu adipeux : un acteur majeur du syndrome inflammatoire de l'obésité. *Cah Nut Diét*, **42**, (2), 90-96.
- Poprzecki S, Zajac A, Chalimoniuk M, Waskiewicz Z, Langfort J (2009). Modification of blood antioxidant status and lipid profile in response to highintensity endurance exercise after low doses of omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in healthy volunteers. *Int J Food Sci Nut*, **26**, 1-13.
- Pourmorad F, Hosseinimehr S.J, Shahabimajd N (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol*, **5** (11), 1142-1145.
- Prakash D, Upadhyay G, Brahma N, Singh H.B (2007). Singh antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chem*, **104**, 783-790.

- Přemysl Mladěnka, Kateřina Macáková, Tomáš Filipický, Libuše Zatloukalová, Luděk Jahodář, Paolo Bovicelli, Ilaria Proietti Silvestri, Radomír Hrdina and Luciano Saso (2011). In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem*, **105**, 693-701.
- Prescott L.M, Harley J.P and Klein D.A (2003). La chimiothérapie antimicrobienne. In: *Microbiologie, 2ème édition* (Bruxelles), 806-811.
- Prin L, Hachulla E, Hennache B, Bonnotte B, Dubucquoi S, Abbal M, Faure G, Bouletreau P (2009). Available from: http://w3med.univlille2.fr/inflammation/documents/Immuno_1.pdf
- Prior R.L, Wu X, Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, **53**, 4290-302.
- Psotová J, Lasovský J and Vicar J (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed Pap*, **147**, 147-153.
- Que F, Mao L and Pan X (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int*, **39**, 581-587.
- Rahal K (2005). Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, *4ème édition*, éd Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.
- Rahman I, Adcock I.M (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*, **28**, 219-242.
- Rahman S, Ansari R.A, Rehman H and Parvez S (2009). Raisuddin, nordihydroguaiaretic acid from creosote bush (*Larrea Tridentata*) mitigates 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammatory and oxidative stress responses of tumor promotion cascade in mouse skin, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2011**, 1-10.
- Ranilla L.G, Kwon Y.I, Apostolidis E and Shetty K (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour Technol*, **101**, 4676-4689.
- Regnault J.P (1992). Reactions immunitaires. In *Agression et défense du corps humain*. Vigot, (Paris), 202 -225.
- Richter C, Park J.W and Ames B.N (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6465-6467.
- Rios J.L and Recio M.C (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, **100**, 80-84.
- Rohit Y, Saurabh R, Ajay S (2012). Review On Antioxidants Activity And Its Evaluation. *J Pharma Res*, **1** (2), 41-58.
- Roifman I, Beck P.L, Anderson T.J, Eisenberg M.J, Genest J (2011). Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. *Can J Cardiol*, **27**, 174-182.

- Russo-Marie F, Peltier A, Polla B.S (1998). L'inflammation. Paris: John Libbey Eurotext,565.
- Sahreen S, Khan M.R and Khan R.A (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem*, **122**, 1205-1211.
- Samaniego-Sánchez C, Gonzalez A.M.T, Garcia-Parrilla M.C, Granados J.J.Q, Serrana H.L, Martínez M.C.L (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, **593**, 103-107.
- Samuelsen A.B (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review, *J. Ethnopharmacol*, **71**, 1-21.
- Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A and Yamamoto-Furusho J.K (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, **14**, 4280-4288.
- Sayre L.M, Moreira P.I, Smith M.A, Perry G (2005). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità*, **41**, (2) 143- 164.
- Schneider I, Bucar F (2005). Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2. Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists. *Phytother. Res*, **19**, 263-272.
- Schoroderet M (1992). Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Volume 2. Eds, Office des publications universitaires (Alger), 523-530.
- Sebnem H.U, Yasin G, Iclal S (2012). Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food Chem Toxicol*, **50**, 1554-1559.
- Seidel V (2005). Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds. *Humana Press (Totowa)*, 27-37.
- Serhan C. N (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*, **25**, 101-37.
- Serhan C.N and Savill J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* , **6**, 1191-7.
- Shils M.E, Shike M, Ross A.C, Caballero B, Cousins R.J (2006). Modern Nutrition in Health and Disease. 10^{ème} Edition. Lippincott Williams and Wilkins.
- Shipochliev T, Dimitrov A, Aleksandrova E (1981). Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Vet Med Nauki*, **18**, 87-94.
- Simon H.U, Haj-Yehia A and Levi-Schaffer F (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in the apoptosis induction. *Apoptosis*, **5**, 415-418.
- Slavica B, Ilic S.S.K, B. Zoran B.T (2004). Flavonoids from flower of *Linum capitatum* kit. *Phys Chem Technol*, **3**, 67-71.
- Spiteller G (2006). Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med*, **41**, (3) 362-387.

- Steinbeck M.J, Khan A.U, Karnovsky M.J (1993). Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9, 10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J. Biol. Chem*, **268**, 15649-15654.
- Steinhubla S.R, Badimonb J.J, Bhattc D.L, Herbertd J.M and Lüscher T.F (2007). Clinical evidence for anti-inflammatory effects of antiplatelet therapy in patients with atherothrombotic disease. *Vasc Med*, **12**, 113-122.
- 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 Compost Anal*, **19**, 348-353.
- Suresh-Kumar K, Ganesan K, Subba Rao P.V (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - an edible seaweed. *Food Chem*, **107**, 289-295.
- Tabart J, Kevers C, Sipel A, Pincemail J, Defraigne J.O. et Dommes J (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chem*, **105**, 1268–1275.
- Taguri T, Tanaka T and Kouno I (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol Pharm Bull*, **29(11)**, 2226-2235.
- Tamura Y, Nishibe S (2002). Changes in the concentrations of bioactive compounds in plantain leaves. *J. Agric. Food Chem*, **50**, 2514-2518.
- Tanaka T, Danno K, Ikai K, Kiichiro K, Imamura, Sadao, Toshihiro (1988). Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratino-cytes. *J Invest dermatol*, **90**, 399-401.
- Tang S.Y and Halliwell B (2010). Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies. *Biochem Biophys Res Commun*, **394**, 1-5.
- Tapiero H, Tew K.D, Nguyen B.G. and Mathé G (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed. Pharmacother*, **56**, 200-207.
- Tenover F.C (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The Am J Med*, **119** (6), 3-10.
- Thierry Eberlin (1997), Les infections microbiennes, Tome 2 physiopathologie, *Edition NATHAN*, 66-67.
- Ticli B (1999). *Les herbes médicinales les plus puissantes et les plus efficaces*, Milan, Editions De Vecchi S.A.
- Tony H and Paul Sh (1997). Atlas de poche de microbiologie. *Flammation*, ISBN:**2-257-10125-1**, 206.
- Traber M.G, Atkinson J (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*, **43**, 4-15.
- Tracey K.J (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, **420**, 853-859.

- Tsai K, Hsu T.G, Hsu K.M, Cheng H, Liu T.Y, Hsu C.F and Kung C.W (2001). Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med*, **31**, (11) 1465-72.
- Tsuchiya H and Linuma M (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, **7**, 161-165.
- Tutel B.I, Kandemür Ü, Kuş S et Kence A (2005). Classification of Turkish *Plantago L.* Species Using Numerical Taxonomy. *Turk J Bot*, **29**,50-51.
- Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch Microbiol*, **184** (5), 271-8.
- Uzun E, Sariyar G, Adsersen A, Karakoc B, Ötük G, Oktayoglu E, and Pirildar S (2004). Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *J Ethnopharmacol*, **95**, 287-296.
- Van Helden Y.G.J, Keijer J, Knaapen A.M, Heil S.G, Briedé J.J, van Schooten F.J, Godschalk R.W.L (2009). β -Carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, **46**, 299–304.
- Vasconcelos S.M.L, Goulart M.O.F, Moura J.B.F, Manfredini V, Benfato M.S, Kubota L.T (2007). Espécies reativas de oxigênio et de nitrogênio, antioxydants e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analiticoa para sua determinação. *Quim Nova*, **30**, (5) 1323-1338.
- Verdan A.M, Wang H.C, García C.R, Henry W.P and Brumaghim J.L (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *J Inorg Biochem*, **105**, 1314-1322.
- Vigo E, Cepeda A, Gualillo O, Perez-Fernandez R (2005). In-vitro anti-inflammatory activity of *Pinus sylvestris* and *Plantago lanceolata* extracts: effect on inducible NOS, COX-1, COX-2 and their products in J774A.1 murine macrophages. *J Pharm Pharmacol*, **57**, 383-391.
- Vinegar R, Schreiber W and Hugo R (1969). Biphasic development of carrageenin- induced oedema in rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **166**, 96-103.
- Wantana R, Tassanee N, Subhadhirasakul S (2009). Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals. *J Nat Med*, **63**, 290-296.
- Watanabe T, Misawa S, Hiradate S and Osaki M (2008). Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytol*, **178**, 581-589.
- Watterson J.J, Butler L.G (1983). Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. *J Agr Food Chem*, **31**, 41-45.

- Weill B, Batteux F, Dhainaut J (2003). Immunopathologie et reactions inflammatoires. Eds, De Boeck Universite (Paris), 12-23.
- Wells-Knecht K.J, Zyzak D.V, Litchfield J.E, Thorpe S.R, Baynes J.W (1995). Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochem*, **34** (11) 3702-3709.
- Wichtl M, Anton R (1999) Plantes thérapeutiques. Ed. Tech & Doc, Paris, pp. 415-8
- Winter C.A, Risley E.A, Nuss G.W (1962). Carrageenin-induced oedema in hind paws of rats as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, **111**, 544-547.
- Wong S.P, Leong L.P and William Koh J.H (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem*, **99**, 775-783.
- Yala D, Merad A.S, Mohamedi D, Ouar Korich M.N (2001). Resistance Bacterienne Aux Antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°**91**, 13-14
- Zhang D.X, Gutterman D.D (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **292**, 2023-2031.
- Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi C.A (1990). Substance P stimulates neovascularization *in vivo* and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*, **40**, 264-278.
- Zou Y.P, Lu Y.H and Wei D.Z (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *J Agr Food Chem*, **52**, 5032-5039.